

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Veselin D. Draganić

**Identifikacija i genotipizacija kolekcije *Bacillus*
spp. izolata: karakterizacija bakteriocina
liheniocina 50.2**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Veselin D. Draganić

**Identification and genotyping of the collection
of *Bacillus* spp. isolates: Characterisation of
the bacteriocin licheniocin 50.2**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentori:

dr Tanja Berić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

dr Eliana Garalejić, vanredni profesor
Univezitet u Beogradu
Medicinski fakultet

Članovi komisije:

dr Slaviša Stanković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

dr Jelena Lozo, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

dr Dragana Božić, docent
Univerzitet u Beogradu
Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

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

Mentorki prof. dr Tanji Berić na iskrenom, nesebičnom i neprocenjivom zalaganju kako prilikom eksperimentalne izrade ove disertacije tako i prilikom pisanja ove disertacije. Dugujem Vam veliku zahvalnost na svemu.

Mentorki i načelnici prof. dr Eliani Garalejić se posebno zahvaljujem na iskreno pruženoj ruci i otvorenom prijemu u kolektiv. Hvala Vam što ste iskreno verovali u mene od početka i uveli me u prelepi svet IVF-a.

Prof. dr Slaviši Stankoviću dugujem neizmernu zahvalnost za sve još od studentskih dana. Uveli ste me u svet nauke i bili uvek tu kada je bilo teško. Hvala Vam na svemu.

Prof. dr Jeleni Lozo se zahvaljujem na velikoj pomoći prilikom eksperimentalne izrade ove disertacije, kao i za posebno detaljnu i kritičku ocenu teze.

Prof. dr Đorđu Firi se zahvaljujem na ukazanom poverenju i šansi da postanem član jednog važnog naučnog projekta, bez koga ne bi ni bilo ove disertacije.

Prof. dr Slobodanki Đukić, prof. dr Ivani Ćirković i doc. dr Dragani Božić dugujem neizmernu zahvalnost i posebno divljenje za iskrenu i prijateljsku pomoć prilikom eksperimentalne izrade velikog dela ove disertacije. Hvala Vam od srca.

Posebno želim da se zahvalim i velikom kolektivu odeljenja A.R.T. Ginekološko akušerske klinike „Narodni front“ (Bilji A., Dragani L., Neši, Dekiju, Milanu, Dragani B.J., Maji, Bilji M., Dini) na predivnom druženju i uvek nesebičnoj pomoći, pogotovo kada je trebalo razumeti vreme posvećeno izradi ove disertacije.

Kolektivima Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta i Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju IMGGI zahvaljujem se na velikoj pomoći i razumevanju tokom eksperimentalne izrade ove teze.

Mojim kolegama Ivici Dimkiću i Goranu Vukotiću za veliki trud, rad i prijateljsku pomoć koju su mi pružili tokom celokupnog rada na ovoj disertaciji a i van toga, olakšavajući tako vreme koje smo se „mučili“ zajedno.

Na kraju ali ne i na poslednjem mestu, najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, mojim roditeljima Miku i Jadranki što su uz mene od mojih prvih trenutaka na svetu. Hvala vam što ste uvek bili pravi roditelji! Podjednako hvala mojoj sestri Bojani, zetu Radovanu i bratu Radu jer su uvek tu gde treba da budu. Ne mogu a da se ne zahvalim tetki Milojoj i stricu Mićku jer su uvek verovali da će doći ovaj dan!

Mojoj Daliborki hvala za svu ljubav, veru i poverenje koje svakoga dana mi pruža. Bez tebe ništa ne bi bilo ovako lepo.

Ovaj rad posvećujem mojim bakama Gagi i Rasi, jer bi one sigurno bile u prvom redu, da mogu...

Identifikacija i genotipizacija kolekcije *Bacillus* spp. izolata: karakterizacija bakteriocina liheniocina 50.2

Rezime

Filogenetska raznovrsnost kolekcije 166 izolata roda *Bacillus* je analizirana upotrebom PFGE metode profilisanja kombinovane sa sekvenciranjem *tuf* gena odabranih izolata. Analiza PFGE profila je pokazala veliku genetičku raznovrsnost izolata koja je grupisana u 21 grupu. Po jedan izolat, predstavnik svake grupe, identifikovan je na osnovu sekvence *tuf* gena. Pokazano je veoma jasno i nedvosmisleno grupisanje izolata. Ukupno je identifikovano osam vrsta: *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus safensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* i *Bacillus anthracis*. Posebno zadovoljavajući rezultati su postignuti u razdvajanju *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* izolata kao i *B. thuringiensis* i *B. cereus* u posebne klade na filogenetskom stablu.

Ispitivanje antibakterijske aktivnosti čitave kolekcije *Bacillus* spp. je pokazalo da samo izolat VPS50.2, tada identifikovan kao *B. licheniformis*, proizvodi antimikrobno jedinjenje tipa bakteriocina aktivno protiv indikatorskog soja *B. subtilis* 168 (Berić, 2010). U ovom radu je bakteriocin liheniocin 50.2 okarakterisan kao termostabilni protein, koji zadržava svoju aktivnost i na visokim temperaturama (30 min na 121°C); tolerantan je na vrlo širok opseg pH vrednosti (najveću aktivnost pokazao je na pH 9); delimično je otporan na dejstvo proteolitičkih enzima i zadržava aktivnosti i u prisustvu različitih katjona. Na osnovu određenih osobina, liheniocin 50.2 predstavlja novi bakteriocin koji pripada klasi II.3.

Sinteza liheniocina 50.2 zavisi od faze rasta soja producenta *B. licheniformis* VPS50.2 i koincidira sa početkom sporulacije. Testiranjem je utvrđeno da su optimalni uslovi za proizvodnju bakteriocina: gajenje 42h od početka inkubacije, u LB hranljivom medijumu na 37°C, uz aeraciju. Antibakterijski spektar liheniocina 50.2 pokriva samo Gram-pozitivne bakterije, ali pokazuje aktivnost protiv velikog broja različitih vrsta, uključujući i *Listeria monocytogenes*, meticilin-rezistentne *Staphylococcus aureus*, β-hemolitičke streptokoke i koagulaza negativne stafilokoke (KNS). Sirovi ekstrakt liheniocina 50.2 je, pri koncentracijama od 2×MIC i 4×MIC, pokazao značajnu

baktericidnu aktivnost protiv *L. monocytogenes* već u prvom času aplikacije. Taj rezultat, kao i već opisane osobine liheniocina 50.2 preporučuju ga kao kandidata za biokonzervans za kontrolu patogenih mikroorganizama, kao i onih koji izazivaju propadanje hrane.

Za ispitivanje aktivnosti liheniocina 50.2 protiv formiranja biofilma i na već formirani biofilm KNS iz uretralnih briseva i patogenih *L. monocytogenes* iz vaginalnih briseva, u istraživanje je uključena i ekstrakt bakteriocina koji proizvodi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4, zbog toga što prepoznaju različite receptore na površini osjetljivih bakterija. Značajna inhibicija na formiranje biofilma je detektovana pri $\frac{1}{2} \times$ i $\frac{1}{4} \times$ MIC za liheniocin 50.2 na KNS i $\frac{1}{2} \times$ i $\frac{1}{4} \times$ MIC za BGBU1-4 na *L. monocytogenes*, ukazujući tako da su funkcije relevantne za formiranje biofilma bile ometene pri subinhibitornim koncentracijama bakteriocina liheniocina 50.2 i ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4. Bakteriocin liheniocin 50.2 i ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-4 su pokazali statistički značajnu aktivnost i na već formiran biofilm četiri izolata koagulaza negativnih stafilokoka i četiri izolata *L. monocytogenes* pri koncentracijama od 100 AU/ml i 200 AU/ml.

Efekat dobijen kombinacijom bakteriocina liheniocina 50.2 i ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 sa antibioticima (gentamicinom i ampicilinom) ide od sinergizma, aditivnosti i indiferentnog efekta do antagonizma. Najznačajniji sinergizam je utvrđen u kombinaciji liheniocina 50.2 sa gentamicinom protiv *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 sa gentamicinom protiv izolata *S. epidermidis* 24 i u kombinaciji liheniocina 50.2 sa ekstraktom bakteriocina soja BGBU1-4 protiv izolata *S. hominis* 10.

Ključne reči: *Bacillus*; PFGE; *tuf* gen; bakteriocin; liheniocin 50.2; biofilm; stafilokoke; *Listeria monocytogenes*.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija mikroorganizama

UDK broj: [579.852.11+577.18] :577.181.5 (043.3)

**Identification and genotyping of the collection of *Bacillus* spp. isolates:
Characterisation of the bacteriocin licheniocin 50.2**

Abstract

The phylogenetic diversity of the *Bacillus* collection, containing 166 isolates, was analyzed by using the PFGE fingerprinting method combined with the sequencing of the *tuf* gene of the selected isolates. According to the PFGE analysis which showed a high genetic diversity, the isolates were grouped into 21 clusters. A representative of each group was identified based on the sequence of the *tuf* gene. Very clear and unambiguous grouping of the isolates was demonstrated. In total, eight species were identified: *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus safensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. Particularly satisfactory results have been achieved in the separation of *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* isolates, as well as *B. thuringiensis* and *B. cereus*, into the individual clades on the phylogenetic tree.

Examination of the antibacterial activity of whole collection of *Bacillus* spp. showed that only isolate VPS50.2, identified as *B. licheniformis* produces a bacteriocin which has antimicrobial activity against indicator strain *B. subtilis* 168 (Berić, 2010). In this research, the bacteriocin licheniocin 50.2 was characterized as the thermostable protein, which retains its activity even at the higher temperatures (30 min at 121 ° C); tolerates a very wide range of pH values (the highest activity was shown at pH 9); it is partially resistant to the action of proteolytic enzymes and it also maintains activity in the presence of various cations. Based on certain properties, licheniocine 50.2 represents a new bacteriocin belongs to the II.3 bacteriocin class.

Production of the licheniocine 50.2 depends on the stage of the growth of the *B. licheniformis* VPS50.2 strain and it coincides with the onset of sporulation. The optimal conditions for the production of this bacteriocin were as followed: 42h cultivation in the LB medium at 37° C, with aeration. The antibiotic spectrum of licheniocine 50.2 covers only Gram-positive bacteria. However, it shows activity against the large number of different species, including *Listeria monocytogenes*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, β -hemolytic streptococci and coagulase-negative staphylococci (CNS). Within the first hour of application, 2×MIC and 4×MIC concentrations of the crude extract of

licheniocin 50.2 showed significant bactericidal activity against *L. monocytogenes*. Due to the described properties, licheniocin 50.2 could be considered as a good candidate as a bio-conservative for pathogenic microorganisms control, as well as for the control of the microorganisms that cause food degradation.

In order to investigate the activity of licheniocin 50.2 against the formation of the CNS biofilm and against the already formed biofilm of the CNS from urethral swabs, as well as the pathogenic *L. monocytogenes* from vaginal swabs, this study also includes a mixture of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4, because they use different receptors on the surface of the sensitive bacteria. Significant inhibition of biofilm formation was detected at $\frac{1}{2} \times$ and $\frac{1}{4} \times$ MIC for licheniocin 50.2 against CNS, but also at $\frac{1}{2} \times$ and $\frac{1}{4} \times$ MIC for extract of BGBU1-4 against *L. monocytogenes*, indicating that functions relevant for biofilm formation were impaired at subinhibitory concentrations of bacteriocin licheniocin 50.2 and extract of bacteriocins from BGBU1-4. Bacteriocin licheniocin 50.2 and extract of bacteriocins from BGBU1-4 showed statistically significant activity against the already formed biofilm of four isolates of coagulase-negative staphylococci and four *L. monocytogenes* isolates at concentrations of 100 AU/ml and 200 AU/ml.

The obtained results showed that combination of bacteriocin licheniocin 50.2 and extract of bacteriocins from BGBU1-4 with different antibiotics (gentamicin and ampicillin) on CNS and *L. monocytogenes* could have distinct effects - synergism, additivity, indifferent effect as well as antagonism. The most significant synergism was determined in combination of licheniocin 50.2 with gentamicin against *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, in combination of extract of bacteriocins from BGBU1-4 with gentamicin against isolate *S. epidermidis* 24 and in combination of licheniocins 50.2 with extract of bacteriocins from BGBU1-4 against isolate *S. hominis* 10.

Keywords: *Bacillus*; PFGE; *tuf* gene; bacteriocin; licheniocin 50.2; biofilm; staphylococci; *Listeria monocytogenes*.

Research field: Biology

Specific research field: Microbial biology

UDK No.: [579.852.11+577.18] :577.181.5 (043.3)

1. UVOD	1
1.1. Raznovrsnost roda <i>Bacillus</i>	1
1.2. Identifikacija bakterija i interspecijska genetička raznovrsnost	3
1.2.1. Genotipizacija kao metoda izbora	3
1.2.2. Sekvenciranje gena	5
1.3. Proizvodnja antimikrobnih supstanci	6
1.3.1. Bakteriocini	6
1.3.1.1. Bakteriocini roda <i>Bacillus</i> i njihova klasifikacija	7
1.3.1.2. Bakteriocinu-slične inhibitorne supstance (BLIS) roda <i>Bacillus</i>	12
1.3.2. Primena bakteriocina koji proizvode <i>Bacillus</i> spp.	13
1.3.3. Klinička primena bakteriocina koji proizvode <i>Bacillus</i> spp.	14
1.4. Patogene bakterije koje formiraju biofilm	15
1.4.1. Bakteriocini u kontroli formiranja biofilma i njihov sinergizam sa antibioticima	18
2. CILJEVI	21
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. MATERIJAL	23
3.1.1. Bakterijski sojevi	23
3.1.2. Prajmeri i restrikcioni enzimi	24
3.1.3. Izolacija i prečišćavanje ekstrakta bakteriocina BGBU1-4	25
3.1.4. Medijumi za kultivisanje bakterija	25
3.2. METODE	28
3.2.1. METODE RADA SA BAKTERIJAMA	28
3.2.1.1. Identifikacija bakterijskih sojeva iz kliničkih uzoraka	28
3.2.2. METODE ZA RAD SA DNK	30
3.2.2.1. Izolovanje ukupne DNK iz <i>Bacillus</i> spp.	30
3.2.2.2. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metoda („Polymerase Chain Reaction“)	30
3.2.3. ELEKTROFOREZA DNK	31
3.2.3.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu	31
3.2.3.2. Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)	31
3.2.4. SEKVENCIRANJE DNK I FILOGENETSKA ANALIZA	32
3.2.4.1. Sekvenciranje DNK	32
3.2.4.2. Kompjuterska analiza PFGE profila	32
3.2.4.3. Filogenetska analiza sekvenci <i>tuf</i> gena	33
3.2.5. METODE RADA SA BAKTERIOCINIMA	33

3.2.5.1. Bakteriociński test.....	33
3.2.5.2. Testiranje termostabilnosti i pH opsega bakteriocina	34
3.2.5.3. Efekat delovanja različitih enzima na bakteriocin	34
3.2.5.4. Efekat katjona na bakteriocińsku aktivnost.....	35
3.2.5.5. Određivanje antibakterijskog spektra delovanja bakteriocina.....	35
3.2.5.6. Izolovanje bakteriocina amonijum-sulfatom.....	35
3.2.5.7. Prečiščavanje bakteriocina hloroformom.....	36
3.2.5.8. Ultrafiltracija.....	36
3.2.5.9. Kinetika proizvodnje bakteriocina u različitim medijumima i u različitim uslovima....	36
3.2.5.10. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija i dinamike antibakterijske aktivnosti.....	37
3.2.5.11. Ispitivanje uticaja bakteriocina na produkciju biofilma.....	37
3.2.5.12. Ispitivanje uticaja bakteriocina na već formiran biofilm.....	38
3.2.5.13. Ispitivanje efekta kombinovane primene bakteriocina i antibiotika sa različitim mehanizmima delovanja na rast izolovanih sojeva	39
4. REZULTATI.....	41
4.1. Izolovanje ukupne DNK iz <i>Bacillus</i> spp.	41
4.2. Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE).....	41
4.3. Filogenetska analiza skevenci <i>tuf</i> gena	43
4.4. Bakteriociński test.....	45
4.5. Biohemijska karakterizacija liheniocina 50.2	46
4.6. Kinetika proizvodnje bakteriocina u različitim medijumima i u različitim uslovima.....	47
4.7. Određivanje antibakterijskog spektra delovanja bakteriocina.....	49
4.8. Identifikacija bakterijskih sojeva iz kliničkih uzoraka.....	51
4.9. Određivanje dinamike antibakterijske aktivnosti	51
4.10. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija	52
4.11. Ispitivanje uticaja liheniocina 50.2 i ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 na produkciju biofilma	54
4.12. Ispitivanje uticaja bakteriocina na već formiran biofilm.....	59
4.13. Ispitivanje efekta kombinovane primene bakteriocina liheniocina 50.2, ekstrakta soja BGBU1-4 i antibiotika na rast izabranih izolata	62
5. DISKUSIJA.....	69
6. ZAKLJUČCI.....	81
7. LITERATURA.....	84
8. DODACI	105

1. UVOD

1. UVOD

1.1. Raznovrsnost roda *Bacillus*

Gibbons i Murray (1978) su opisali filum *Firmicutes* obuhvatajući sve Gram-pozitivne *Bacteria*. Po trenutnoj klasifikaciji filum *Firmicutes* obuhvata tri klase i to: *Bacilli*, *Clostridia* i *Erysipelotrichia*. Po Vos i saradnicima (2009) najnovije rRNK analize podržavaju u okviru klase *Bacilli* podelu na dva reda: *Bacillales* i *Lactobacillales*. Red *Bacillales* je zadržao 8 od 10 prethodno opisanih familija. Rod *Bacillus* pripada familiji *Bacillaceae* (Slika 1).

Phylum XIII. *Firmicutes*
Class I. "Bacilli"
Order I. *Bacillales*^{AL (1)}
Family I. *Bacillaceae*^{AL}
Genus I. *Bacillus*^{AL (1)}
Genus II. *Alkalibacillus*^{VP}
Genus III. *Amphibacillus*^{VP}
Genus IV. *Anoxybacillus*^{VP}
Genus V. *Cerasibacillus*^{VP}
Genus VI. *Filobacillus*^{VP}
Genus VII. *Geobacillus*^{VP}
Genus VIII. *Gracilibacillus*^{VP}
Genus IX. *Halobacillus*^{VP}
Genus X. *Halolactibacillus*^{VP}
Genus XI. *Lentibacillus*^{VP}
Genus XII. *Marinococcus*^{VP}
Genus XIII. *Oceanobacillus*^{VP}
Genus XIV. *Paraliobacillus*^{VP}
Genus XV. *Pontibacillus*^{VP}
Genus XVI. *Saccharococcus*^{VP}
Genus XVII. *Tenuibacillus*^{VP}
Genus XVIII. *Thalassobacillus*^{VP}
Genus XIX. *Virgibacillus*^{VP}

Slika 1. Familija *Bacillaceae* (Vos i sar., 2009)

Većina opisanih i okarakterisanih vrsta *Bacillus* spp. filogenetski su grupisane u subklasterne. Filogenetski klasteri roda *Bacillus* po Vos i sar. (2009) su:

1: *Bacillus subtilis*, *amyloliquefaciens*, *atrophaeus*, *mojavensis*, *licheniformis*, *sonorensis*, *vallismortis*, *Paenibacillus popilliae*.

2: *Bacillus farraginis*, *fordii*, *fortis*, *lentus*, *galactosidilyticus*

3: *Bacillus asahii, bataviensis, benzoovorans, circulans, cohnii, firmus, flexus, fumarioli, infernus, jeotgali, luciferensis, megaterium, methanolicus, niacini, novalis, psychrosaccharolyticus, simplex, soli, vireti*

4: *Bacillus anthracis, cereus, mycoides, thuringiensis, weihenstephanensis*

5: *Bacillus aquimaris, marisflavi*

6: *Bacillus badius, coagulans, thermoamylovorans, acidicola, oleronius, sporothermodurans*

7: *Bacillus alcalophilus, arsenicoselenatis, clausii, gibsonii, halodurans, horikoshii, krulwichiae, okhensis, okuhidensis, pseudoalcaliphilus, pseudofirmus*

8: *Bacillus arsenicus, barnaricus, gelatini, decolorationis,*

9: *Bacillus carboniphilus, endophyticus, smithii,*

10: *Bacillus pallidus,*

11: *Bacillus funiculus, panaciterrae.*

Vrste roda *Bacillus* su oblika štapića, Gram-pozitivne, aerobne, formiraju endospore koje im omogućavaju preživljavanje ekstremnih uslova u spoljašnjoj sredini. Pronalaze se u različitim okruženjima, zemljištu, glini, stenama, vodenim staništima, kao i u hrani i gastrointestinalnom traktu različitih insekata i životinja. Vrste roda *Bacillus* su genotipski i fenotipski različite (Priest, 1993). To se ogleda u velikom diverzitetu njihovih fizioloških svojstava, kao što su mogućnosti degradacije različitih supstrata (prečišćenih iz biljnih i životinjskih izvora): celuloza, skrob, proteini, agar i dr. (Lutz i sar., 2006). Ovakva fiziološka raznovrsnost dozvoljava ovim bakterijama naseljavanje širokog spektra staništa. Pored toga, ekološki diverzitet staništa koja naseljavaju bakterije iz ovog roda je omogućen i produkcijom spora. Formiranje spora je najvažnije za identifikaciju na nivou roda. Endospore ovog roda su dobile takvo ime zbog svog načina formiranja – unutarćelijski i predstavljaju najotpornije forme života na Zemlji. Razlikuju se od vegetativnih ćelija, veoma su rezistentne na hemijski i fizički stres koji je letalan za vegetativne ćelije zbog svog hemijskog sastava i ultrastrukture (Madigan i sar., 2012).

Stanište većine vrsta ovog roda je zemljište i to kako kisela, tako neutralna ali i alkalna zemljišta, topla i hladna, od plodnih oranica do pustinja. Iako su izolati mnogih opisanih vrsta izolovani iz zemljišta ili iz sredine koja je bila kontaminirana direktno ili indirektno zemljištem, spektar sredina je veoma širok. Pored zemljišta uključuje i slatke i slane vode, hranu kao i kliničke uzorke. Tako je na primer u vazduhu izolovan *Bacillus*

carboniphilus; u sedimentima bogatim arsenikom *Bacillus arseniciselenatis* (Switzer Blum i sar., 1998); u kompostu: *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*; geotermalno zemljište *Bacillus fumarioli*; unutrašnja tkiva biljaka: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus endophyticus*; invertebrate: *Bacillus oleronius*, *Bacillus sphaericus*; prirodno zagrejane vode: *Bacillus methanolicus*, *Bacillus okuhidensis*; reciklirana papirna pulpa *Bacillus pumilus*; slana i hiperslana staništa: *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus halodenitrificans*, *Bacillus halophilus* (Khan i sar., 2001).

Prisustvo ovih vrsta u hrani ne mora da podrazumeva nužno i kvaranje hrane i trovanje. Neke vrste, kao npr. *B. subtilis* koriste se u pripremi tradicionalnog istočno azijskog jela „Natto“ (Hosoi i Kiuchi, 2003). Specifični *B. subtilis* sojevi se koriste kao starter kulture za fermentaciju soje kod tradicionalnih zapadno afričkih začina „dawadawa“ (Terlabie i sar., 2006) ili u fermentaciji semena afričkog gvođenog drveta za proizvodnju nigerijskog začina „okpehe“ (Oguntoyinbo i sar., 2007). Sa druge strane, ipak, neke vrste ili sojevi mogu izazvati trovanja hranom ili kontaminaciju hrane: *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* i *B. sphaericus* (Jay i sar., 2005). Zbog toga, da bi neki *Bacillus* spp. izolat bio razmatran kao kandidat za probiotsku ili starter kulturu, mora da prođe rigorozne selekzione procese (Senesi i sar., 2001).

Većina vrsta roda *Bacillus* pokazuje mali ili nikakav patogeni potencijal i veoma retko je povezano sa oboljenjima kod ljudi ili drugih životinja. Glavni izuzeci od ovog pravila su: *Bacillus anthracis* (izazivač antraksa), *Bacillus thuringiensis* (patogen za invertebrate), ali i *Bacillus licheniformis* kod trovanja hranom kao i prethodno pomenuti sojevi.

1.2. Identifikacija bakterija i interspecijska genetička raznovrsnost

1.2.1. Genotipizacija kao metoda izbora

Genotipizacija kao i filogenetske analize korišćene na rodu *Bacillus* do sada su uključivale nekoliko metoda. Pored analize gena za 16S rRNK, sekvenciranja „core“ gena, analiza nasumično amplifikovanih regiona (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RADP), najčešće korišćene strategije u analiziranju genetičke srodnosti među *Bacillus* vrstama su bazirane na genomskom „fingerprinting“-u, npr. polimorfizam dužine

amplificiranih fragmenata (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (AFLP) (Ticknor i sar., 2001) ili PCR repetitivnih ponovaka DNK sekvenci (rep-PCR) (Cherif i sar., 2003).

Još od ranih 1980-ih godina, od kada je elektroforeza u pulsirajućem polju (Pulse Field Gel Electrophoresis – PFGE) počela da se koristi za profilisanje DNK fragmenata većih od 40 kb (Schwartz i Cantor, 1984), ova tehnika je ostala jedna od najinformativnijih, najpouzdanijih i najefikasnijih alatki za determinaciju genetičkog diverziteta mnogih mikroorganizama (Goering, 2010), ali i zlatni standard za genetičku karakterizaciju bakterija (Dobbs i sar., 2014). PFGE se pokazala kao veoma praktična tehnika u epidemiološkim studijama kod infektivnih bolesti i epidemija prenosivih hranom (Dobbs i sar., 2014; Meltzer i sar., 2014).

Određivanje dužine DNK fragmenata je nesumnjivo najčešće korišćen analitički metod u molekularnoj biologiji, biohemiji i mikrobiologiji. Konvencionalna gel elektroforeza, kod koje se koriste čvrsti polimeri (agaroza ili poliakrilamid) i polje statičkog elektriciteta, je prisutan u svim današnjim laboratorijama koje se bave molekularnom biologijom. Ovaj metod rutinski se koristi za razdvajanje DNK fragmenata manjih od 20 kb. Elektroforeza u pulsirajućem polju razvijena od Schwartz i Cantor (1984) vrši razdvajanje fragmenata veličine i preko 1 Mb (Birren i Lai, 1993). Popularna primena PFGE je kod bakterijskog profilisanja („fingerprint”). Ova metoda se zasniva na sečenju genomske DNK restriktivnim endonukleazama i razdvajanju DNK fragmenata različite veličine (Murchan i sar., 2003). Ovakva vrsta bakterijskog profilisanja je našla primenu u kontroli javnog zdravlja i kontroli u prehrambenoj industriji. Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) u SAD-u je formirao PulseNet, Nacionalnu molekularnu mrežu za nadzor bolesti koje se prenose hranom (Swaminathan i sar., 2001; <http://www.cdc.gov/pulsenet>).

Dok je PFGE generalno primenjiv za rutinsku bakterijsku identifikaciju, poseduje i neka praktična ograničenja. Kao npr., PFGE zahteva relativno veliku količinu DNK (≥ 200 ng DNK) ili 10^7 bakterijskih ćelija (Larson i sar., 2000) i relativno dugo traje te se zbog metodoloških ograničenja PFGE smatra sporom analizom. Genomska DNK posmatrane bakterije se, prvo izoluje u agaroznim blokčićima, potom se podvrgava digestiji restriktivnim enzimima (Tenover i sar., 1995). Enzimi koji se najčešće koriste u genotipizaciji roda *Bacillus* su *SmaI* i *NotI*, jer *SmaI* seče DNK bacila u trake iste veličine, dok *NotI* generiše fragmente različite veličine, što daje informativniji „fingerprint“

(Kaminska i sar., 2015). Tako dobijeni profili ukazuju najčešće na individualne razlike između sojeva, a na osnovu posedovanja ili gubitka restrikcionih mesta. U genotipizaciji odabranih izolata, nužno je koristiti i komercijalno dostupne standardne referentnih sojeva (Tenover i sar., 1995).

1.2.2. Sekvenciranje gena

Analiza sekvenci 16S rRNK je najjednostavniji i najčešće korišćeni metod za identifikaciju mikroorganizama (Amann i sar., 1995). 16S i 23S rRNK su najčešće korišćeni molekuli za određivanje prokariotske filogenije. Analiza ovih sekvenci je donela ogromnu ekspanziju u poznavanju prokariotskog diverziteta (Ludwig i Klenk, 2001). Međutim prve studije rađene sa izolatima iz *Bacillus cereus* grupe otkrile su da 16S rRNK sekvence vrsta iz ove grupe pokazuju sličnost od 99 do 100%, te su pokazale da ova metoda ne može biti pouzdana u razdvajanju članova ove grupe (Ash i sar., 1991).

Što je duže metoda bila u primeni, otkriven je sve veći broj genetičkih homologija u okviru određenih bakterijskih vrsta što je ukazivalo na to da 16S rRNK nema dovoljnu rezoluciju za bliže određivanje blisko srodnih vrsta, kao npr. u okviru *B. cereus* i *B. subtilis* grupe. Vrsta *B. cereus* je blisko srodna vrstama kao što su *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis* (Daffonchio i sar., 2006), *Bacillus mycoides* (Drobniewski, 1993). *B. subtilis* grupa sadrži bliske taksone kao npr. *B. subtilis* subsp. *subtilis* (Nakamura i sar., 1999), *B. licheniformis* (Skerman i sar., 1980), *B. vallismortis* (Roberts i sar., 1996). Dakle, ukazala se potreba za boljim i preciznijim određivanjem u okviru roda. Pored 16S rRNK gena, geni za: 23S rRNK, subjedinicu DNK žiraze β (*gyrB*) (Chen i Tsen, 2002), subjedinicu RNK polimeraze β (Drancourt i Raoult, 2002) i TU elongacioni faktor (*tuf*) (Ghebremedhin i sar., 2008) su se pokazali kao potencijalno dovoljno visoke rezolucije da bi mogli da posluže u preciznijoj identifikaciji bakterijskih taksona.

Elongacioni faktor Tu (EF-Tu) je ključan za bakterijsku sintezu proteina, te je gen koji ga kodira (*tuf*) veoma konzerviran kod prokariota (Filer i Furano, 1980). EF-Tu je GTP vezujući protein koji igra centralnu ulogu u sintezi proteina. Kod prokariotskih ćelija elongacioni faktor Tu igra glavnu ulogu u elongacionom ciklusu sinteze i to kroz promociju vezivanja aminoacil-tRNK za A mesto na ribozomu. EF-Tu je jedan od najzastupljenijih proteina u ćeliji, procenjuje se da je njegov molarni odnos EF-Tu : ribozomi 5:1 (Subramanian, 1975). Procenjeno je da u ćeliji *B. subtilis* tokom

eksponencijalnog rasta postoji oko 100000 molekula EF-Tu po ćeliji (Maass i sar., 2011). Gen *tuf* je rasprostranjen uniformno kod većine Gram-pozitivnih bakterija i najčešće postoji samo jedna njegova kopija u genomu te ga to čini idealnim kandidatom za filogenetske studije (Sela i sar., 1989). Gen *tuf* pripada većem transkripcionom regionu, *str* operonu, koji kodira više ribozomalnih proteina kao i regulatornih proteina (Krasny i sar., 2000). *str* operon *Escherichia coli* je sastavljen od četiri gena: *rpsL* (koji kodira ribozomalni protein S12), *rpsG* (ribozomalni protein S7), *fus* (elongacioni faktor G) i *tufA* (EF-Tu). Raspored ovih gena u transkripcionom operonu je sličan za mnoge vrste, uključujući *Enterococcus* spp., *Bacillus subtilis* i *Neisseria meningitidis* (Lathe i sar., 2001). Kod miksobakterija, EF-Tu je genetički organizovan u tRNK-*tufB* operon, gde *tuf* gen prethodi četiri tRNK gena koji su kotranskribovani sa *tuf* genom (Bremaud i sar., 1995).

1.3. Proizvodnja antimikrobnih supstanci

Gram-pozitivne bakterije imaju razvijenu sposobnost za proizvodnju antimikrobnih supstanci. Grupa *Bacillus sensu lato* obuhvata najviše producenata antimikrobnih supstanci, koje obuhvataju lipopeptide, kao što su iturini, surfaktini, fengicini, bakteriocine i bakteriocinima slične supstance - BLIS (Stein, 2005). Glavna grupa antimikrobnih supstanci roda *Bacillus* uključuju peptide koji su ribozomalno sintetisani i posttranslaciono modifikovani (lantibiotici i lantibioticima slični peptidi) ili neribozomalno sintetisani, kao i nekoliko nepeptidnih jedinjenja kao što su poliketidi, amino šećeri i fosfolipidi (Stein, 2005). Ove supstance najčešće imaju antimikrobno delovanje na druge mikroorganizme, pa na taj način daju prednost za same producente.

1.3.1. Bakteriocini

Bakteriocini su ribozomalno sintetisane supstance koje iako pokazuju specifičnu aktivnost prema srodnim vrstama, utiču i na vrste koje nisu iz iste ekološke niše (Keymanesh i sar., 2009). Bakteriocini se uobičajeno ne nazivaju antibioticima, upravo da bi se izbegla konfuzija i da ne bi došlo do zabune sa terapeutskim antibioticima (Cleveland i sar., 2001). Bakteriocini se razlikuju od terapeutskih antibiotika po svojoj proteinskoj strukturi, ali i po uskoj specifičnosti delovanja na blisko srodnim vrstama i

ispoljavaju svoje delovanje u malim koncentracijama. Gratia je još 1925. prvi opisao bakteriocin kolicin izolovan iz *E. coli*. Na evolutivnoj osnovi, pokazalo se da sinteza jednog ili više bakteriocina daje veliku prednost. Prilika za preživljavanjem mikroorganizma može biti uvećana ukoliko se eliminišu kompetitivni mikroorganizmi u ekološkoj niši, gde nadmetanje može biti veoma intenzivno obzirom na diverzitet i brz rast bakterija (Montesinos, 2007). Bakteriocini igraju fundamentalnu ulogu u dinamici bakterijskih populacija iako je nivo bakteriocinskih interakcija veoma kompleksan na ekološkom i evolutivnom nivou kod mešoviti populacija. Ispitivanja bakteriocina u prirodnom okruženju (*Leuconostoc plantarum* kod fermentacije zelenih maslina, *E. coli* kod zamoraca i *Streptococcus mutans* u usnoj duplji kod ljudi) su pokazala da se postepeno povećava kompetitivna prednost za bakteriocin produkujuće ćelije nasuprot bakteriocin senzitivnim bakterijama u istom okruženju (Riley, 1998). Njihova proteinska priroda omogućava degradaciju u gastrointestinalnom traktu ljudi i životinja, ukazujući tako na njihovu potencijalnu upotrebu kao prirodnih konzervanasa hrane (Cleveland i sar., 2001).

1.3.1.1. Bakteriocini roda *Bacillus* i njihova klasifikacija

Bakteriocini Gram-pozitivnih bakterija se razlikuju od bakteriocina Gram-negativnih bakterija u dve fundamentalne osobine. Prva je da proizvodnja bakteriocina nije obavezno letalni događaj za producenta kao što je slučaj kod Gram-negativnih bakterija. Ova kritična razlika je posledica transportnog mehanizma za sekreciju bakteriocina. Neke bakterije su razvile bakteriocin-specifični transportni sistem, dok druge koriste *sec*-zavisni način eksporta. Druga osobina je da su Gram-pozitivne bakterije razvile bakteriocin-specifičnu regulaciju, dok se bakteriocini Gram-negativnih bakterija oslanjaju isključivo na regulatornu mrežu domaćina (Riley i Wertz, 2002).

Bakteriocini bakterija mlečne kiseline (BMK) spadaju u najizučavanije zbog mogućnosti da se koriste kao biokonzervansi u prehrambenoj industriji. Mnogi njihovi sojevi imaju status „Generally Recognised As Safe“ (GRAS) po O'Sullivan (2002). Međutim, kada nije potvrđena peptidna priroda antimikrobnih jedinjenja (Abriouel i sar., 2010), ove supstance se karakterišu kao bakteriocinu-slične inhibitorne supstance (Bacteriocin Like Substances - BLIS). Do danas, ne postoji jasna i sveobuhvatna klasifikaciona šema osmišljena za bakteriocine roda *Bacillus*, uprkos svim naporima napravljenim u klasifikacijama u slučaju bakteriocina BMK. Ovo je najverovatnije

posledica nedostatka informacija o mnogim bakteriocinskim aminokiselinskim sekvencama ili zbog značajnog diverziteta peptida/proteina proizvedenih od strane *Bacillus* spp. Neki od njihovih antimikrobnih peptida su već uključeni u prethodno opisane grupe ili klase BMK bakteriocina. Primeri za takav slučaj su lantibiotici, jedinstvena klasa vezana za antimikrobne peptide roda *Bacillus* koji su pridruženi Klasi I bakteriocina BMK u sklopu njihove klasifikacione šeme (Abriouel i sar., 2010). Lantibiotici se ribozomalno sintetišu kao prekursori peptida. Oni se posttranslaciono modifikuju dehidratacijom serinskih i treoninskih ostataka i kasnijim intramolekularnim dodavanjem cisteina, što dovodi do formiranja (β -metil) lantionin-tioetarskih mostova, karakterističnih strukturnih elementa za lantibiotike (Bierbaum i Sahl, 2009). Pored toga, nekoliko bakteriocina/BLIS koje proizvode *Bacillus* vrste spadaju u Klasu II BMK bakteriocina (Nes i sar., 2007), koja obuhvata pediocinu-slične bakteriocine (Klasa IIa) i dvo-peptidne bakteriocine (Klasa IIb).

Geni koji kodiraju produkciju bakteriocina i imunost na njih su obično organizovani u operonske klastere (Abriouel i sar., 2010). Kod linearnih nemodifikovanih bakteriocina, pokazana je sinteza na istom genskom klasteru (Lohans i sar., 2013). Bakteriocinski genski klasteri mogu biti locirani na hromozomu, kao u slučaju subtilina (Banerjee i Hansen, 1988), plazmidu kao u slučaju divergicina A (Worobo i sar., 1995) ili na transpozonu kao u slučaju nizina (Rauch i de Vos, 1992).

Biosintetski operon za lantibiotike sadrži najčešće gene koji kodiraju prepetide, enzime odgovorne za modifikacione reakcije, proteaze odgovorne za uklanjanje vodič peptida, superfamiliju transport proteina uključenih u translokaciju peptida, regulatorne proteine i proteine uključene u samozaštitu. Ovi podaci su prikupljeni iz genetske analize više lantibiotika (Schnell i sar., 1992; Banerjee i Hansen, 1988, Uguen i sar., 2000).

Geni koji kodiraju biosintezu klase II bakteriocina dele mnoge sličnosti u njihovoj genetičkoj organizaciji, sastavu strukturnih gena koji kodiraju za prekursorske peptide, koji su praćeni genima koji kodiraju za imunitet na taj bakteriocin, kao i genima za ABC-transporter (Drider i sar., 2006).

Većina bakteriocina se sintetiše kao biološki inaktivni prepetidi koji imaju N-terminalni lider peptid zakačen za C-terminalni propeptid. Biosintetski put lantibiotika je predstavljen sledećim koracima: formiranje prepetida, reakcije modifikacije, proteolitičko odvajanje lider peptida i translokacija modifikovanog prepetida ili zrelog

propeptida kroz citoplazmatsku membranu. Klasa II bakteriocina se sintetišu kao prepeptidi koji sadrže konzervirani N-terminalni lider i karakteristična dvostruka glicinska proteolitička mesta (Drider i sar., 2006).

Klaenhammer (1993) je prvi uradio klasifikaciju bakteriocina BMK, koja je kasnije doživela reklasifikacije kod mnogih autora (van Belkum i Stiles, 2000; Cotter i sar., 2005; Heng i Tagg, 2006; Nes i sar., 2007; Abriouel i sar., 2010). Lantibiotici, kojima pripadaju pojedini bakteriocini roda *Bacillus* (Bierbaum i Sahl, 2009), su prethodno bili podeljeni u dve grupe ili dva tipa: tip A koji uključuje izdužene i pozitivno naelektrisane lantibiotike, dok tip B uključuje globularne i nenaelektrisane lantibiotike (Jung, 1991). Tip A lantibiotika se može dalje podeliti na podgrupe AI i AII prema enzimima koji su uključeni u sazrevanju molekula lantibiotika (Willey i van der Donk, 2007). Klasa AI lantibiotika je modifikovana enzimima LanB i LanC i obrađuje se namenskom serinskom proteazom LanP. Klasa AII lantibiotika je modifikovana samo jednim enzimom LanM i aktivira se pomoću ABC transportera LanT koji poseduje N-terminalnu proteaznu aktivnost. Dvokomponentni lantibiotici sastoje se od dva post-translaciono modifikovana peptida koji deluju sinergistički i trebalo bi ih svrstati u treću grupu (Asaduzzaman i Sonomoto, 2009). Ipak, dvokomponentni lantibiotici podsećaju na podgrupu AII lantibiotika kod kojih je svaka subjedinica obrađena tipom jednog enzima LanM. Zaista, jedna od subjedinica veoma podseća na mersacidin, koji je prototip AII podgrupe. Drugi skorije opisani lantibiotici poput penibacilina i sublacina 168 se ne uklapaju ni na koji način u okviru opisanih klasa.

U **klasu I** spadaju antimikrobni peptidi koji su na različite načine post-translatorno modifikovani. Najčešća podela se vrši na četiri podklase i to podklase I-1, I-2, I-3 koje obuhvataju peptide sa modifikacijama karakterističnim za lantibiotike (formiranje lantionina), a podklasa I-4 ima jedinstvene modifikacije.

Podklasa I-1 uključuje tip A lantibiotike sa izduženom strukturom, poput subtilina, ericina S i ericina A. Subtilin je katjonski, pentaciklični antimikrobni peptid koga proizvodi *B. subtilis* (Guder i sar., 2000). Subtilin pokazuje baktericidnu aktivnost u nanomolarnom opsegu protiv širokog spektra Gram-pozitivnih bakterija. Aktivnost je bazirana na formiranju pora na citoplazmatskoj membrani, što uzrokuje disipaciju membranskog potencijala i narušava sintezu ATP-a (Hyde i sar., 2006; Parisot i sar., 2008). Ericini S i A su dva srodna lantibiotika, vrlo slična subtilinu, koje proizvodi *B.*

subtilis A1/3 (Stein i sar, 2002). Prečišćeni ericini su aktivni protiv raznih bakterija, uključujući i uzročnika bakterijskog raka paradajza, *Clavibacter michiganensis*.

Podklasa I-2 uključuje globularni lantibiotik mersacidin tipa B koji proizvodi *B. subtilis* HIL Y-85,54728 (Bierbaum i sar., 1995), kao i ostale lantibiotike poput sublacina 168 i penibacilina, koji proizvodi *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF koji također proizvodi i peptidni antibiotik polimiksin E1 (He i sar., 2007). Sublacin 168 je hromozomalno kodirani lantibiotik *B. subtilis* 168 i pokazuje jaku baktericidnu aktivnost protiv drugih Gram-pozitivnih bakterija uključujući i važne patogene poput *B. cereus*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus* (Paik i sar., 1998; Stein, 2005).

Podklasa I-3 uključuje dvokomponentne lantibiotike, poput haloduracina, kog proizvodi alkalofilni soj *Bacillus halodurans* C-125 (Takami i sar., 2000) i lihenicidina, kog proizvode sojevi *B. licheniformis* ATCC 14580 i *B. licheniformis* DSM 13 (Begley i sar., 2009; Dischinger i sar., 2009).

Podklasa I-4 uključuje jedinstven ciklični peptid subtilozin A koji sadrži peptidnu vezu od glave do repa peptida, kao i određene sulfidne mostove formirane između cisteinskih grupa i dehidratisanih aminokiselinskih ostataka. Subtilozin A je visoko post-translaciono modifikovani makrociklični, anjonski peptid kog proizvodi soj *B. subtilis* ATCC 6633 i drugi *B. subtilis* sojevi, kao i *B. amyloliquefaciens* (Zheng i sar., 1999; Stein i sar., 2004; Sutyak i sar., 2008) i *Bacillus atrophaeus* (Stein i sar., 2004).

Ovakva klasifikacija je dobijena komparativnom analizom objavljenih aminokiselinskih sekvenci (Slika 2). Subtilin i ericin formiraju povezani klaster, koji je okarakterisan visoko konzerviranim regionima u nativnom peptidu, kao i u sekvencama vodećeg peptida. Interesantno je i to, da A1 i A2 subjedinice haloduracina i lihenicidina također formiraju povezane klasterne ukazujući da oba dvopeptidna lantibiotika dele isto poreklo. Mersacidin također pokazuje homologiju sa A1 subjedinicom dvopeptidnih lantibiotika, posebno sa A1 subjedinicom lihenicidina, sa 25 konzerviranih ostataka na identičnoj poziciji, ukazujući na povezanost sa dvopeptidnim lantibioticima (Slika 2).



Slika 2. Dendrogram odnosa bakteriocina iz roda *Bacillus* prema homologiji primarne aminokiselinske sekvence. (Abriouel i sar., 2010).

Klasa II bakteriocina obuhvata ribozomalno sintetisane, nemodifikovane i linearne peptide, male molekulske mase od 0,7-10 kDa. Podklasa II-1 uključuje pediocinu-slične peptide sa konzerviranim YGNGVXC motivom blizu N-terminalnog kraja. U ovu podklasu spadaju koagulin koga proizvodi *Bacillus coagulans* I₄ (Le Marrec i sar., 2000), kao i bakteriocini koje proizvode *Bacillus circulans* i sojevi *P. polymyxa* (SRCAM 37, SRCAM 602, SRCAM 1580) (Svetoch i sar., 2005). Podklasa II-2 uključuje turicinu-slične peptide sa konzerviranim motivom DWTXWSXL blizu N-terminalnog kraja, poput bakturicina F4 (Kamoun i sar., 2005), turincina H (Lee i sar., 2009), turicina S (Chehimi i sar., 2007) i turicina 17 (Gray i sar., 2006) kog proizvodi *B. thuringiensis* soj i cerein MRX1 kog proizvode *B. cereus* sojevi (Sebei i sar., 2007). Komparativna analiza aminokiselinskih sekvenci turicinu-sličnih peptida pokazuje koherentan klaster (Slika 1). Podklasa II-3 uključuje linearne peptide poput hromozomalno kodiranog lihenina kog proizvodi *B. licheniformis* 26L-10/3RA (Pattnaik i sar., 2001) ili cereine 7A i 7B (Oscáriz i Pisabarro, 2000; Oscáriz i sar., 2006).

Klasi III pripadaju proteini molekulske mase veće od 30kDa koji imaju fosfolipaznu aktivnost poput megacina A-216 i A-19213 kog proizvode *B. megaterium* sojevi (Ivánovics i Alföldi, 1954; Von Tersch i Carlton, 1983).

1.3.1.2. Bakteriocinu-slične inhibitorne supstance (BLIS) roda *Bacillus*

Bakteriocinu-slične inhibitorne supstance (BLIS), pronađene su kod mnogih *Bacillus* vrsta, uključuju antimikrobne peptide i proteine koji nisu do sada dobro okarakterisani, ni genetički ni na aminokiselinskom nivou. Predominantno su aktivni protiv bakterija, a u manjoj meri protiv kvasaca i gljiva (Urdaci i sar., 2004b; Bizani i sar., 2005; Korenblum i sar., 2005; Aunpad i Na-Bangchang, 2007; Sharma i Gautam, 2008; Haft, 2009; Khalil i sar., 2009; Sharma i sar., 2009; Xie i sar., 2009; Anthony i sar., 2010; Abriouel i sar., 2010).

Soj *B. amyloliquefaciens* LBM 5006, izolovan iz tropske šume na Atlanskom okeanu u Brazilu, produkuje veoma značajne BLIS sa širokim antibakterijskim spektrom, uključujući aktivnost na *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *Serratia marcescens* i *Pasteurella haemolytica* (Lisboa i sar., 2010). Spore BLIS produkjućeg soja *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 iskorišćene su u proizvodnji probiotika za hranjenje živine (Ecobiol[®], Norel and Nature Nutrition) i koji u gastrointestinalnom traktu smanjujući patogeni efekat *Clostridium perfringens*, *E. coli* i *Yersinia* spp. redukujući na taj način mortalitet živine (Diaz, 2007). Određeni izolati *B. amyloliquefaciens* poput soja RC-2 produkuju BLIS aktivne protiv *Colletotrichum dematium*, gljive dudove antraknoze, kao i protiv nekoliko drugih fitopatogenih gljiva i bakterija poput *Rosellinia necatrix*, *Pyricularia oryzae*, *Agrobacterium tumefaciens* i *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Yoshida i sar., 2001). Bacillocin 490, koga produkuje termofilni soj *B. licheniformis* 490/5 izolovan iz mlečnog proizvoda, pokazao je antibakterijsku aktivnost protiv srodnih vrsta poput *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus smithii*, *B. subtilis*, *Bacillus anthracis*, *B. cereus* i *B. licheniformis* pod aerobnim i anaerobnim uslovima (Martirani i sar., 2002). Takođe, pokazano je i da peptid niske molarne mase (1,5 kDa) izolovan iz soja *B. licheniformis* MKU3 (Kayalvizhi i Gunasekaran, 2008) pokazuje baktericidnu aktivnost protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, kao i protiv nekih filamentoznih gljiva (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus fumigatus* i *Penicillium funiculosum*) i kvasca (*Candida albicans*). Heterocikloantracin peptid vrste *B. anthracis* sadrži oxazole i/ili heterociklične tiazole (Haft, 2009) je opisan pomoću pretraživanja genoma, ali do sada nije izolovan i nije pokazano njegovo antimikrobno dejstvo. Bacillocin Bb iz vrste *B. brevis* Bb, izolovan iz zemljišta (Saleem i sar., 2009), je BLIS stabilan u pH opsegu od 1-9, otporan na toplotu i organske rastvarače. *B. firmus*

H₂O-1 izolovan iz naftnih rezervoara u Brazilu proizvodi antimikrobne peptide otporne na proteazu, stabilne na visoku temperaturu i na alkalni pH (Korenblum i sar., 2005). Ova vrsta BLIS je pokazala antimikrobnu aktivnost protiv *Desulfivibrio alaskensis* kao i na grupi sulfato-redukujućih bakterija sakupljenih u jezgru rezervoara. Komercijalni probiotik *B. polyfermenticus* SCD, koji se koristi kod dugotrajnih gastrointestinalnih poremećaja, proizvodi BLIS molekulske mase od približno 14,3 kDa (Lee i sar., 2001). Thermocin 10, izolovan iz *Geobacillus stearothermophilus* NU-10, je glikoprotein stabilan na visokim temperaturama, rezistentan na proteolitičke enzime, inhibira RNK i DNK sintezu, ćelijske pokrete kao i sintezu ATP (Fikes i sar., 1983).

1.3.2. Primena bakteriocina koji proizvode *Bacillus* spp.

Neki *Bacillus* sojevi, su iskorišćeni kao probiotici, bazirano na fiziološkim svojstvima, kao što je uvećanje telesne mase domaćih životinja i živine. Na primer BioPlus2B probiotik sadrži mešavinu *B. licheniformis* i *B. subtilis* sojeva (Mutus i sar., 2006). Bacili koji proizvode bakteriocine se mogu koristiti kao probiotici i da bi se poboljšalo zdravlje životinja i inhibirale patogene bakterije. Za soj *B. licheniformis*, koji proizvodi lichenin, je zabeležena antimikrobna aktivnost na *Streptococcus bovis* i *Eubacterium ruminantium*, kao i izvanredna hidrolitička aktivnost na razne polisaharide (Pattnik i sar., 2001). Bakteriocin proizvodi *Paenibacillus polymyxa* NRRL B-30507, NRRL B-30508 i NRRL B-30509, kao i soj *B. circulans* NRRL B-30664, se koriste u kontroli *Campylobacter jejuni* kao neantibiotska terapija kod životinjske zoonoze. Još jedna od antimikrobnih supstanci, koja je našla primenu kod zdravlja životinja, je BLIS iz *B. subtilis* LFB112 izolovan iz kineskog čaja koji je aktivan protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija izazivača bolesti kod domaćih životinja (Xie i sar., 2009).

Sojevi *Bacillus* koji proizvode bakteriocine mogu naći primenu i kao probiotici za humanu upotrebu zbog njihove inhibitorne aktivnosti na crevne patogene kao što su *C. perfringens*, *C. difficile* i drugi. Probiotski soj *B. dausii* O/C proizvodi inhibitornu supstancu koja deluje na *S. aureus*, *E. faecium* i *C. difficile* (Urdaci i sar., 2004a).

1.3.3. Klinička primena bakteriocina koji proizvode *Bacillus* spp.

Terapeutska upotreba penicilina ranih 1940-ih godina smanjila je stopu smrtnosti izazvanu infekcijama patogenih bakterija. Prvi penicilin rezistentni β -laktamazni soj stafilokoka je opisan par godina kasnije (Kirby, 1944). Decenijama kasnije, konstantni rast broja multirezistentnih sojeva stafilokoka, posebno rezistentnih na meticilin i vankomicin, ponovo rezultuju povećanjem stope smrtnosti od infekcija stafilokokama. Terapeutski efekat antibiotika, najčešće korišćenih u tretmanima infekcija, vrlo često biva umanjen usled problema sa farmakokinetikom samih lekova, adaptacijom bakterija kroz mehanizme indukovane rezistencije na antibiotike ili kroz mutacije regulatornih gena stafilokoka (Fowler i sar., 2004; Lewis i Jorgensen, 2005; Garau i sar., 2009). Antibiotika rezistencija bakterija je jedan od rastućih problema, koji zahteva obiman i širok pristup. Jedan od pristupa ovom problemu je identifikacija novih antibakterijskih agensa dok se drugi pristup zasniva na revidiranju već opisanih antimikrobnih agenasa. S tim u vezi, postoji poseban fokus na ocenivanje i preispitivanje benefita korišćenja bakteriocina u kliničkoj praksi (Cotter i sar., 2013).

Sve veća bakterijska rezistencija na konvencionalne antibiotike u kliničkoj praksi rezultovala je u sve obimnijem razmatranju bakteriocina kao alternativnih antimikrobnih supstanci u tretmanu humanih infekcija (Cotter i sar., 2013). Unakrsna rezistencija bakteriocina i konvencionalnih antibiotika u kliničkoj upotrebi je vrlo retko zabeležena jer ove dve vrste antimikrobnih jedinjenja imaju za mete različite ćelijske strukture. Nekoliko bakteriocina ili BLIS produkovanih od strane bakterija roda *Bacillus* pokazali su antimikrobnu aktivnost protiv patogenih bakterija kao što su meticilin-rezistentni sojevi *Staphylococcus aureus* (MRSA) ili vankomicin-rezistentni sojevi *Enterococcus* spp. (VRE). Neki od primera su BLIS koji proizvodi *B. sphaericus*, pumilicin 4 (Aunpad i Na-Bangchang, 2007), lantibiotici lihenicidin (Begley i sar., 2009), haloduracin (Takami i sar., 2000) i mersacidin (Bierbaum i sar., 1995). Haloduracin deluje kao da može biti od većeg interesa za medicinsku upotrebu jer ostaje stabilan na fiziološkim vrednostima pH bolje od nizina (Oman i van der Donk, 2009). Mersacidin je pokazao jako antimikrobnu aktivnost na *S. aureus* i u *in vitro* i kod životinjskih studija (Molitor i sar., 1996; Kruszevska i sar., 2004; Sass i sar., 2008). Lantibiotik subitlosin A je pokazao antimikrobnu aktivnost protiv patogena kao što su *L. monocytogenes*, *Gardnella vaginalis* i *Streptococcus agalactiae* (Sutyak i sar., 2008). Subtilosin A ima potencijal u primeni

protiv vaginalnih patogena kao što je *G. vaginalis* rezistentna na konvencionalnu antibiotsku terapiju. Pored antibakterijske aktivnosti neki bakteriocini i BLIS roda *Bacillus* pokazuju i antifungalnu aktivnost, koja bi mogla biti iskorišćena u kliničkoj praksi (Abriouel i sar., 2010).

Reproduktivni trakt sisara sadrži specifične stalne i tranzitne mikroorganizme usled specifičnosti samog genitalnog sistema i njegove veze sa spoljašnjom sredinom. Uslovi koji preovladavaju u genitalnom traktu stvaraju povoljnu ekološku nišu za rast mikroorganizama. Povećana seksualna aktivnost povećava šansu za unošenje patogenih mikroorganizama. Uprkos tome, viši delovi genitalnog trakta su bez mikroorganizama, jer postoje efikasni mehanizmi koji ograničavaju kretanje mikroorganizama u gornje delove genitalnog trakta.

Neki bakteriocini, kao npr. subtilozin iz *B. subtilis* ATCC 6633, pokazali su antimikrobnu aktivnost protiv patogenih mikroorganizama kao što su *G. vaginalis*, *Listeria monocytogenes* i *S. agalactiae* (Sutyak i sar., 2008). Inhibiranje rasta *G. vaginalis* ima značaja jer je ona često primarni agens za bakterijske vaginoze (BV), zajedničko stanje pronađeno kod 30% žena u Severnoj Americi (Allsworth i Peipert, 2007). BV se karakteriše zamenom normalne vaginalne laktobacilne flore sa anaerobnim bakterijama i mikoplazmama (Gibbs, 2007). BV su najčešće asimptomatske, mada mogu biti povezane sa nizom simptoma i problema. Za tretman, po preporuci Centra za kontrolu bolesti (CDC), se primenjuje klindamicin i metronidazol ordinirani oralno ili intravaginalno (Workowski i sar., 2002), ali je izuzetno poželjno kao alternativu imati neki preparat koji bi u potpunosti uklonio infekciju. Bakteriocini su često razmatrani za medicinsku i farmaceutsku primenu, posebno kao baktericidni agensi kod multi-rezistentnih mikroorganizama (Kraaij i sar., 1999). Oni su posebno interesantni zbog malih troškova proizvodnje u poređenju sa standardnim farmaceutskim proizvodima.

1.4. Patogene bakterije koje formiraju biofilm

Jedno od najvećih dostignuća moderne medicine je napredak u borbi protiv infektivnih bolesti. Zahvaljujući naučnim uspesima, najveći broj trenutnih infekcija se može lečiti efikasno antibioticima. Međutim, dva su izuzetka od ovog pravila. Prvo, bakterije koje su rezistentne na antibiotike a drugo otpornost bakterija na antibiotike kroz

stvaranje biofilma. Biofilm je skup mikroorganizama vezanih nepovratno u ekstracelularne polimerske matrikse za abiotske i/ili biotske površine. Biofilm bakterija može biti i do 1000 puta otporniji na antibiotske tretmane, nego iste vrste bakterija koje rastu planktonski (Gilbert i sar., 1997).

Tranzicija iz planktonskog rasta u biofilm nastaje usled odgovora na sredinske promene i uključuje veliku regulatornu mrežu, koja prevodi signale za regulisanje genske ekspresije i reorganizacije bakterijskih ćelija (Kostakioti i sar., 2017). Ovo ćelijsko reprogramiranje obuhvata ekspresiju površinskih molekula, prilagođavanje upotrebe hranljivih materija, faktore virulencije kao i opremanje bakterije arsenalom svojstava koji omogućavaju njihovo preživljavanje u nepovoljnim uslovima (Lenz i sar., 2008).

Bakterijska agregacija i sazrevanje biofilma se sastoji od reverzibilnih i ireverzibilnih nivoa koji uključuju brojne i specifične faktore. Dva su osnovna procesa u formiranju biofilma. Prva faza obuhvata vezivanje bakterija za površinu, praćeno drugom fazom agregacije bakterija i formiranja višeslojnih struktura. Bakterije u biofilmu su povezane amorfnim sluzavim materijalom tzv. ekstracelularnim polisaharidnim matriksom (Gotz, 2004), koji igra posebnu ulogu ćelijskog lepka, koji čini da slojevi budu lepljivi, tolerantni na sredinske faktore (Rode i sar., 2007) i antimikrobne agense (Heiby i sar., 2010). U okviru biofilma postoji razvijena mreža kanala kojima se kreće voda i nutrijenti te tako obezbeđuju ćelijama uslove za rast i deobu (Watnick i Kolter, 2000).

Bakterije organizovane u višeslojne strukture se fenotipski razlikuju od svojih „planktonskih“ srodnika. Biofilm pruža idealnu nišu za razmenu gena odgovornih za antimikrobnu rezistenciju (Donlan i Costerton, 2002, Stewart PS, 2002). Po dosadašnjim saznanjima, više od 99% bakterija u prirodnom okruženju živi u biofilmu, a u 80% slučajeva infekcija kod ljudi biofilm igra važnu ulogu (Stewart i Costerton, 2001). Kod stafilokoka u biofilmu postoje 4 različita metabolička stanja *in vitro*. Postoje ćelije koje obezbeđuju energiju procesima fermentacije, ćelije koje rastu u slojevima bogatim kiseonikom, metabolički neaktivne ćelije kao i mrtve ćelije. Po Brady i sar., (2007) gradijent hranljivih supstanci kroz različite slojeve biofilma uslovljava i različitu gensku ekspresiju kao i sintezu proteina među slojevima ćelija unutar istog biofilma. Poseban način organizacije ćelija u biofilmu stafilokoka im omogućava izbegavanje imunskog odgovora domaćina ali i rezistenciju na antimikrobne agense (Archer i sar., 2011).

Biofilm, tj njegova kompaktnost predstavlja fizičku barijeru koja onemogućava difuziju antibiotika kroz slojeve biofilma.

Regulacije genske ekspresije faktora virulencije i formiranja biofilma kod *S. aureus* se obavlja kroz nekoliko regulatornih sistema. Dva su najbolje proučena: *agr* (engl. accessory gene regulator) i *sarA* (engl. staphylococcal accessory regulator). *agr* regulatorni sistem se smatra glavnim regulatorom ekspresije gena kod ove bakterije. Ali pored ovih regulatornih sistema u procesu formiranja biofilma učestvuju i dodatni genski lokusi. Njihovom aktivnošću dolazi do povećane ekspresije faktora koji vrše ulogu u formiranju biofilma. Važna komponenta biofilma je i ekstracelularna DNK koja povećava adherentnost biofilma za površinu za koju se vezuje (Mann i sar., 2009). Rice i sar. (2007) su pokazali sa gubitkom gena koji kodira enzim za oslobađanje ekstracelularne DNK dolazi do smanjenja aderentnosti biofilma.

Koagulaza-negativne stafilokoke (KNS) i *Listeria monocytogenes* su često uključeni u mnoga oboljenja ljudi, posebno kod imunokompromitovanih pacijenata. Iako su slabo virulente, KNS su veoma dobro adaptirane da formiraju izražen biofilm i kako je nedavno zapaženo, njihov biofilm ima važnu ulogu u patogenezi velikog broja infekcija genitalnog trakta, kao što su aerobni vaginitis i konstantni nespecifični uretritis (Ivanov, 2007; Tansarli i sar., 2013). *L. monocytogenes* može da kolonizuje genitalni trakt žena i da u njemu formira biofilm (Borges i sar., 2011). Iako je stopa pojavljivanja *L. monocytogenes* veoma mala u vagini žena (Stepanović i sar., 2007a) posledice njenog pojavljivanja mogu biti veoma pogubne, pogotovo u trudnoći. Ove bakterije mogu biti prenesene na novorođenče ulaskom u uterus ili tokom prolaska fetusa kroz vaginu i mogu izazvati značajan morbiditet i mortalitet kod novorođenčadi (Borges i sar., 2011).

Stafilokoke su jedan od glavnih uzročnika hroničnih infekcija koje nastaju usled formiranja biofilma na medicinskim uređajima i pomagalicama. Biofilm se najčešće obrazuje na ortopedskim implantima, ali i na materijalima na bazi plastičnih polimera i silikona (Costerton i sar., 2003). Kada su medicinski uređaji u pitanju biofilm se može formirati na površini ventilatora, defibrilatora i aspiratora. Kod osoba sa poremećajem periferne arterijske ili venske cirkulacije nastaju hronične infekcije usled formiranja stafilokokalnog biofilma.

1.4.1. Bakteriocini u kontroli formiranja biofilma i njihov sinergizam sa antibioticima

Penicilin je uveden u terapijsku upotrebu daleke 1944. godine. Već 1948. god. procenat patogenih sojeva osetljivih na penicilin se sa 98% smanjio na 50% (Barber i Rozwadowska-Dowzenko, 1948). Rastuća rezistencija na antimikrobna jedinjenja povećala je interes za bakteriocine kao alternativna terapeutska sredstva za tretiranje infekcija. Antibiofilm aktivnosti mnogih bakteriocina su nedavno opisane, ali uglavnom uvek na dobro definisane referentne sojeve mikroorganizama (Hassan i sar., 2012) ali retko i na kliničke izolate.

Bakteriocinska aktivnost pokazana na *Neisseria gonorrhoeae* (Ruiz i sar., 2015) i *Giardia lamblia* (Amer i sar., 2014) ukazali su na bakteriocine kao obećavajuće antimikrobne kandidate u tretmanu različitih patogena. Bakteriocini takođe mogu inhibirati rast i multirezistentnih patogena od velikog značaja, kao što su meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* i vankomicin-rezistentni *Enterococcus* spp. (Cotter i sar., 2013).

Chopra i sar. (2015) su pokazali da sonorensin izolovan iz *Bacillus sonorensis* MT93 je efikasan kao potencijalni antibiofilm agens i konzervans hrane. U njihovoj studiji su opisali aktivnost protiv *S. aureus*, a u isto vreme su pokazali da ne postoji aktivnost prema normalnim sisarskim ćelijama. Sonorensin je inhibirao formiranje biofilma. Pomoću tačne hromatografije i SEM mikroskopije je otkriven princip delovanja samog sonorensina, koji vrši permeabilizaciju bakterijske membrane. Za razliku od većine antibiotika, koji za ciljno mesto imaju ćelijske komponente bakterija, citolitički efekat sonorensina ima prednost u nemogućnosti razvoja rezistencije.

Antibiotici u svom delovanju kada se kombinuju zajedno mogu dati sinergistički efekat koji podrazumeva efekat delovanja jači nego svaki antibiotika pojedinačno. Još su 1973. Farrar i Newsome zabeležili sinergistički efekat kombinacije beta-laktamskih antibiotika na Gram-negativne bacile. Sinergizam između bakteriocina i polimyxin klase antibiotika je zabeležen kod mnogih Gram-negativnih patogena. Polymyxin E se sada razmatra za korišćenje kao zadnja linija odbrane protiv patogenog *Pseudomonas aeruginosa* (Biswas i sar., 2012). Colistin u kombinaciji sa nizinom A i pediocinom PA je pokazao značajnu aktivnost protiv *E. coli* O157:H7 (Naghmouchi i sar., 2013).

Kombinacija raznovrsnih bakteriocina, antimikrobnih peptida i konvencionalnih antibiotika najčešće uvećava efektivnost i spektar delovanja tretmana protiv patogena.

2. CILJEVI

2. CILJEVI

Opšti cilj ove disertacije je identifikacija i genotipizacija kolekcije *Bacillus* spp. izolata i kompletna karakterizacija bakteriocina liheniocina 50.2 koji proizvodi jedan izolat iz kolekcije. Na osnovu navedenog, specifični ciljevi ove disertacije su:

- Genotipizacija kolekcije *Bacillus* spp.
- Biohemijska i genetička karakterizacija bakteriocina liheniocina 50.2 koji proizvodi izolat *Bacillus licheniformis* VPS50.2
- Optimizacija proizvodnje liheniocina 50.2
- Određivanje antimikrobnog spektra liheniocina 50.2
- Određivanje dinamike aktivnosti liheniocina 50.2 protiv *L. monocytogenes*
- Identifikacija patogenih stafilokoka iz uretralnih briseva
- Određivanje MIC liheniocina 50.2 i ekstrakta bakteriocina koje proizvodi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 na izolatima stafilokoka i *L. monocytogenes*
- Određivanje efekta liheniocina 50.2 i ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 na formiranje i već formirani biofilm stafilokoka i *L. monocytogenes*.
- Određivanje efekta pojedinačnih bakteriocina, njihove kombinacije kao i kombinacije pojedinačnih bakteriocina sa odabranim antibioticima na izabranim izolatima stafilokoka i *L. monocytogenes*.

Kao krajnji cilj ovog istraživanja očekuje se preciznija identifikacija postojeće kolekcije *Bacillus* spp. izolata; potpuna karakterizacija i optimizacija proizvodnje bakteriocina liheniocin 50.2 kao i određivanje antimikrobnog potencijala liheniocina 50.2, samostalno i u kombinaciji sa bakteriocinima koje proizvodi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 i odabranim antibioticima prema patogenim urogenitalnim izolatima stafilokoka i *L. monocytogenes*.

3. MATERIJAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Bakterijski sojevi

U ovom radu korišćeno je 166 izolata bakterija roda *Bacillus* spp. izolovanih iz različitih uzoraka poreklom iz različitih regiona Srbije. Izolati *Bacillus* sp. izolovani iz zemlje, sena, slame i stajskog đubriva su morfološki okarakterisani i potvrđeni bojenjem po Gramu i katalaza testom (Stanković, 2003; Berić, 2010).

Tabela izolata sa poreklom izolacije i geografskom lokacijom data je u Dodatku 1 (Preuzeto iz Stanković, 2003).

Bakterijski sojevi koji su korišćeni za testiranje antimikrobne aktivnosti predstavljeni su u Tabeli 1.

Tabela 1. Bakterijski sojevi korišćeni u ovom radu.

Bakterijski soj	Medijumi za rast	Izvor ili referenca
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 49140	MHA	ATCC
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 12759	LA	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	LA	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i> 168	LA	Laboratorijska kolekcija*
<i>Bacillus subtilis</i> W23	LA	Laboratorijska kolekcija*
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 49141	MHA	ATCC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	MHA	ATCC
<i>E. saccharolyticus</i> ATCC 43076	MHA	ATCC
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG92088	MRS	Laboratorijska kolekcija**
<i>Lactobacillus zeae</i>	MRS	Laboratorijska kolekcija**
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4	M17 + 0,5% glu	Laboratorijska kolekcija**
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	M17 + 0,5% glu	Laboratorijska kolekcija**
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> B464	M17 + 0,5% glu	Laboratorijska kolekcija**
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	BHI	ATCC
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	MHA	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	MHA	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	MHA	ATCC

<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	MHA	ATCC
<i>S. equisimillis</i> ATCC 12394	MHA	ATCC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	MHA	ATCC
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	MHA	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	MHA	ATCC
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	MHA	ATCC
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	MHA	ATCC
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	MHA	ATCC
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Sabouraud med.	ATCC
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Sabouraud med.	ATCC
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	TSA	ATCC
<i>Listeria monocytogenes</i> 3	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 4	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 5	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 9	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 10	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 11	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 14	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 16	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 17	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 18	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 19	TSA	Klinička kolekcija***
<i>L. monocytogenes</i> 20	TSA	Klinička kolekcija***
<i>Staphylococcus</i> spp. (8 izolata)	TSA	Klinička kolekcija***

* Katedra za mikrobiologiju Biološkog fakulteta , ** Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, ***Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet

3.1.2. Prajmeri i restrikcioni enzimi

Prajmeri korišćeni u ovom radu predstavljeni su u Tabeli 2.

Tabela 2. Sekvence prajmera korišćenih u ovom radu

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera
tufGPF	5' ACGTTGACTGCCAGGACAC3'
tufGPR	5' GATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA3'

Restrikcioni enzim korišćen u ovom radu je *NotI* (UAB Fermentas, Thermo Scientific).

3.1.3. Izolacija i prečišćavanje ekstrakta bakteriocina BGBU1-4

U ovom radu je korišćen bakteriocin izolovan iz soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4. Sirovi ekstrakt bakteriocina ovog soja je izolovan iz supernatanta 16. sata prekonoćne kulture. Supernatant je precipitiran uz pomoć amonijum sulfata na 20, 30, 40, 50 i 60% (w/v) saturacije. Precipitat je potom prikupljen centrifugiranjem i resuspendovan u 100mM Na-fosfatnom puferu (pH=7) nakon čega je testirana antimikrobna aktivnost. Precipitat bakteriocina sa najvećom aktivnošću nakon amonijum sulfatne precipitacije je prečišćen dalje hloroformskom ekstrakcijom. Podjednake zapremine resuspendovanog peleta i hloroforma su intenzivno promućkane 15 min a zatim ostavljene na +4 °C jedan sat. Nakon toga faze su razdvojene centrifugiranjem na 13000rpm 40min. Interfaza sa bakteriocinom je sakupljena i osušena u rotacionom vakum evaporatoru (Eppendorf Concentrator 5301; Eppendorf). Osušena interfaza je resuspendovana u 100 mM Na-fosfatnom puferu, pH=7 i potom je testirana antimikrobna aktivnost na indikatorskim sojevima.

3.1.4. Medijumi za kultivisanje bakterija

LB Medijum

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

LA Medijum

LB sa dodatkom 15 g agara na 1000 ml.

Soft LA Medijum

LB sa dodatkom 7 g agara na 1000 ml.

MHB medijum

Mesni ekstrakt	4g
Skrob	1,5g
Kazein hidrolizat	17,5g

dH₂O 1000 ml

MHA medijum

MHB sa dodatkom 15 g agara na 1000 ml.

MRS medijum

Pepton 10g
Mesni ekstrakt 10g
Ekstrakt kvasca 5g
D-glukoza 20g
Tween 80 1g
K₂HPO₄ 2g
Natrijum acetat 5g
Tri-amonijum citrat 2g
MgSO₄.7H₂O 0.2g
MnSO₄.4H₂O 0.05g
Agar 15g
dH₂O 1000 ml

M17 + 0,5% glu medijum

Neopepton 5g
Baktosoton 5g
Mesni ekstrakt 5g
Ekstrakt kvasca 2.5g
Askorbinska kiselina 0.5g
2-Glicerolfosfat.5 H₂O 1g
25% glukoza 40ml
Agar 15g
dH₂O 960 ml

BHI medijum

Ekstrakt mozga i srca svinje 17.5g
Pepton 10g
Glukoza 2g
NaCl 5g
Na₂HPO₄ 2.5g

Agar	15g
dH ₂ O	1000 ml

Schaeffer's sporulacioni medijum

Bacto-nutrient broth	8 g
10% KCl	10 ml
1.2% MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 ml
1 M NaOH	0.50 ml
1 M Ca(NO ₃) ₂	1.0 ml
0.010 M MnCl ₂	1.0 ml
1 mM FeSO ₄	1.0 ml
dH ₂ O	976.5 ml

Spizizen's minimalni medijum

(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
K ₂ HPO ₄	14g
KH ₂ PO ₄	6g
Na ₃ citrate.2H ₂ O	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g
50% (w/v) D-glucose	10 ml
L-tryptophan (5mg/ml)	10 ml
dH ₂ O	980 ml

Sabouraud medijum

Dextroza	40g
Pepton	10g
Agar	20g
dH ₂ O	1000 ml

TSA medijum

Tryptone	15g
Soytone	5g
NaCl	5g
Agar	15g

3.2. METODE

3.2.1. METODE RADA SA BAKTERIJAMA

3.2.1.1. Identifikacija bakterijskih sojeva iz kliničkih uzoraka

Identifikacija osam izolata koagulaza-negativnih stafilokoka izvedena je na osnovu morfoloških osobina analiziranih na preparatu bojenom po Gramu, kulturelnih osobina, testovima slobodne koagulaze (u epruveti) i potvrđena automatizovanim Vitek2 Sistemom (bioMérieux, Francuska). Identifikacija sojeva izvršena je VITEK 2 ID karticama za Gram pozitivne mikroorganizme (VITEK 2 GP, bioMérieux). GP kartica sadrži udubljenja sa odgovarajućim supstratima za detekciju 43 biohemijske osobine navedene u Tabeli 3. Bakterijska suspenzija je podešena pomoću denzitometra (VITEK Densichek, bioMérieux) sa rastvorom 0.45% NaCl na gustinu od 0.5 po McFarland standardu. Svaka test kartica je automatski napunjena bakterijskom suspenzijom i inkubirana tokom 3h u VITEK aparatu. Tokom ovog perioda, svakih 15 minuta je automatski očitavano oslobađanje fluorescencije koja nastaje kao posledica razgradnje supstrata usled rasta mikroorganizama u odgovarajućim udubljenjima kartice. Analiza podataka urađena je automatski pomoću VITEK 2 softvera, nakon čega su dobijeni rezultati za svaki soj.

Tabela 3. Biohemijske osobine na osnovu kojih je izvršena identifikacija sojeva VITEK 2 GP karticom

Polje	Test	Skraćenica	Količina po polju
2	D-amigdalinalin	AMY	0.1875 mg
4	Fosfatidilinozitol fosfolipaza C	PIPLC	0.015 mg
5	D-ksiloza	dXYL	0.3 mg
8	Arginin dihidrolaza 1	ADH1	0.111 mg
9	Beta-galaktozidaza	BGAL	0.036 mg
11	Alfa-glukozidaza	AGLU	0.036 mg
13	Ala-Phe-Pro arilamidaza	APPA	0.0384 mg
14	Ciklodekstrin	CDEX	0.3 mg
15	L-Aspartat arilamidaza	AspA	0.024 mg
16	Beta-galaktopiranozidaza	BGAR	0.00204 mg
17	Alfa-manozidaza	AMAN	0.036 mg
19	Fosfataza	PHOS	0.0504 mg

20	Leucin arilamidaza	LeuA	0.0234 mg
23	L-Prolin arilamidaza	ProA	0.0234 mg
24	Beta-glukuronidaza	BGURr	0.0018 mg
25	Alfa-galaktozidaza	AGAL	0.036 mg
26	L-Pirolidonil-arilamidaza	PyrA	0.018 mg
27	Beta.glukuronidaza	BCUR	0.0378 mg
28	Alanin arilamidaza	AlaA	0.0216 mg
29	Tirozin arilamidaza	TyrA	0.0276 mg
30	D-sorbitol	dSOR	0.1875 mg
31	Ureaza	URE	0.15 mg
32	rezistancija na POLIMIKSIN B	POLYB	0.00093 mg
37	D-galaktoza	dGAL	0.3 mg
38	D-riboza	dRIB	0.3 mg
39	L-laktat alkalinizacija	ILATk	0.15 mg
42	Laktoza	LAC	0.96 mg
44	N-Acetil-D-Glukozamin	NAG	0.3 mg
45	D-Maltoza	dMAL	0.3 mg
46	rezistancija na BACITRACIN	BACI	0.0006 mg
47	rezistancija na NOVOBIOCIN	NOVO	0.000075 mg
50	rast u prisustvu 6.5% NaCl	NC6.5	1.68 mg
52	D-Manitol	dMAN	0.1875 mg
53	D-Manoza	dMNE	0.3 mg
54	Metil-B-D-Glukopiranozid	MBdG	0.3 mg
56	Pululan (α -1,4- ; α -1,6-glukan)	PUL	0.3 mg
57	D-Rafinoza	dRAF	0.3 mg
58	rezistancija na 0/129 (comp. vibrio.)	0129R	0.0084 mg
59	Salicin	SAL	0.3 mg
60	Saharoza	SAC	0.3 mg
62	D-Trehaloza	dTRE	0.3 mg
63	Arginin dihidrolaza 2	ADH2S	0.27 mg
64	rezistancija na OPTOHIN	OPTO	0.000399 mg

Klinički izolati su čuvani na -70°C u BHI medijumu (Lab M Limited, UK) sa dodatkom 10% sterilnog glicerola. Nakon odmrzavanja su inokulisani u tryptic soya agar (TSA);

bioMeArieux) i kultivisani 24h na 35°C u aerobnim uslovima. Bakterijske suspenzije su pravljene u sterilnom fiziološkom rastvoru (bioMeArieux) i podešavana im je gustina po 0,5 McFarland standardu (otprilike 10^8 CFU/ml) a zatim razblaživane do 10^6 CFU/ml.

3.2.2. METODE ZA RAD SA DNK

3.2.2.1. Izolovanje ukupne DNK iz *Bacillus* spp.

Genomska DNK iz *Bacillus* spp. je izolovana prema metodi opisanoj kod Le Marrec i sar. (2000). Nakon centrifugiranja prekoćne kulture izolata 10 min na $12000 \times g$ i dva ispiranja u TE puferu (10mM Tris-HCl, pH 8; 1mM EDTA, pH 8), ćelije su resuspendovane u 1 ml pufera za lizu (50mM Tris, pH 8; 1mM EDTA, pH 8; 25% saharoza) koji sadži 20 µg/ml lizozima (Serva GMBH, Heidelberg, Germany) i inkubirane 45 min na 37°C. Reakcija je zatim zaustavljena dodavanjem 1 ml EDTA (250 mM, pH 8). Nakon 5 min uzorci su tretirani sa 400 µl 20% (w/v) SDS-a i 20 µl rastvora (20 mg/ml) Proteinase K (Sigma, Sent Louis, USA). Sve je inkubirano na 65°C dok ne postane bistro i manje viskozno, a zatim je vršena fenol-hloroformska ekstrakcija. DNK je precipitirana etanolom i resuspendovana je u 100 µl TE pufera u koji je dodato 1 µl RNaze (10 mg/ml).

3.2.2.2. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metoda („Polymerase Chain Reaction“)

Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom je vršeno tako što su totalnoj ili plazmidnoj DNK (0.1-1 µg) u $1 \times$ reakcionom puferu (10×RP: 500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, 0.8% Nonidet P40 (NP40) finalno pH 8.8 na 25°C) dodavani 25 mM MgCl₂ u finalnoj koncentraciji 2.5 mM, dNTP smeša (svaki dNTP po 200 µM), prajmeri (svaki po 2.5 µM) i DNK Taq polimeraza (1 U/µl - Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija). Sekvence korišćenih prajmera u ovom radu date su u Tabeli 2.

Umnožavanje *tuf* gen fragmenta je vršeno uz pomoć prajmera *tufGPF* i *tufGPR* (S. Caamano-Antelo i sar., 2015) po sledećem programu: nakon preinkubacije na 95°C 8 min, 35 ciklusa, svaki sa 30 sec denaturacije na 95°C, 1 min vezivanje prajmera na 55°C i 30 sec polimerizacije na 72°C; poslednji ciklus polimerizacije 10 min na 72°C (Chavagnat i sar., 2002).

3.2.3. ELEKTROFOREZA DNK

3.2.3.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza totalne i plazmidne DNK je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u $1 \times$ TAE puferu (40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA) uz dodavanje etidijum bromida (0.5 μ g/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je $1 \times$ TAE pufer. Korišćeni su 1% agarozni gelovi, a elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. Veličine linearnih DNK fragmenata dobijenih posle umnožavanja DNK ili sećenja restikcionim enzimima određivane su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine pređenog puta DNK fragmenta koji se analizira u odnosu na dužinu puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine (standard). Korišćen je komercijalni standard „Gene Ruler™“ 100 bp DNA Ladder (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija).

3.2.3.2. Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)

PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) se odvijala po modifikovanoj proceduri koju su koristili Kojić i saradnici (2005). Talog ćelija dobijen centrifugiranjem (2 min, 13 000 rpm, centrifuga 5804, Eppendorf) 100 μ L logaritamske kulture je opran dva puta 1 mL EET pufera (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8) i ponovo centrifugiran (1 min, 13 000 rpm) a dobijen talog je resuspendovan u 50 μ L EET pufera i inkubiran 10 min na 42°C. Otopljena agarozna (2% rastvor InCert® agaroze u EET puferu) temperirana na 42°C je pomešana sa 50 μ L ćelijske suspenzije i nalivena u kalupe za blokčiče. U međuvremenu je pripremljen rastvor 0,05% N-lauril sarkozila i lizozima u EET puferu, dodati su blokčiči i inkubirano je 24h na 37°C. Nakon toga, rastvor sa lizozimom je zamenjen aktiviranim (30 min na 50°C) rastvorom 0,5% SDS i proteinaze K u EET puferu i inkubiran je preko noći na 50°C. Narednog dana je pomenuti rastvor zamenjen dva puta sa 10 mL sterilnog vodenog rastvora sa PMSF (phenylmethylsulphonyl-fluoride) i blokčiči su šejkirani na sobnoj temperaturi 30 min. Nakon toga, ovaj rastvor je zamenjen sa 10 mL sterilne destilovane H₂O. Blokčiči su šejkirani dva puta po 30 min uz ponovna ispiranja. Nakon ispiranja, blokčiči su isećeni na dva do četiri dela radi veće dostupnosti materijala za digestiju. U svaku ependorficu je dodato po 300 μ L $1 \times$ pufera O (UAB Fermentas, Thermo Scientific) sa blokčičima. Radi

ekvilibrisanja u puferu, blokčići su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi. Potom je dodato po 100 μ L 1 \times O pufera sa *NotI* restrikcionim enzimom (20 U po blokčiću; UAB Fermentas, Thermo Scientific). Rastvor blokčića sa restrikcionim enzimom je inkubiran 3h na 37°C. Nakon inkubacije rastvor je zamenjen sa 100 μ L STOP PFGE pufera (40% saharoza, 10 mM EDTA, 0,01% bromfenol plavo, pH 8) radi zaustavljanja reakcije. Blokčići su čuvani na +4°C do upotrebe.

PFGE se odvijala u 1,2% agaroznom gelu. Gel je pravljen rastvaranjem agaroze u 1 \times TBE puferu (90 mM Tris, 90 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8,3). U bunariće napravljenog gela je stavljen blokčić sa uzorkom, nakon čega su bunarići zalivani ostatkom rastopljenog gela. Kao marker korišćen je Lambda ladder PFGE marker 50 – 1000 kb (New England BIOLABS). PFGE je tekla u 0,5 \times TBE puferu (45 mM Tris, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,3) u „2015 Pulsafor unit”-u (LKB Instruments), sa elektrodama raspoređenim u obliku šestougla, na 9°C pri naponu od 280 V (razlika između N/S i E/W pravca ne sme biti veća od 3 mA) u trajanju od 18 h. Nakon završetka programa, dodat je etidijum bromid (0,5 μ g/mL) u 0,5 \times TBE puferu da bi se omogućila vizuelizacija DNK. Mešanje u trajanju od 30 min je obezbedilo rastvaranje i ujednačeno raspoređivanje etidijum bromida. Budući da se etidijum bromid ugrađuje u gel, vršeno je odbojavanje gela šejkiranjem u čistom 0,5 \times TBE puferu u istom vremenskom intervalu.

3.2.4. SEKVENCIRANJE DNK I FILOGENETSKA ANALIZA

3.2.4.1. Sekvenciranje DNK

Eluirani DNK fragmenti ili PCR produkti su nakon prečišćavanja propuštanjem kroz kolonice QIAquick PCR Purification KIT/250 (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) slati na sekvenciranje u centar za sekvenciranje Macrogen's sequencing service, Seul, Koreja. Sekvence su upoređivane uz pomoć NCBI baze podataka, BLAST programom za pretraživanje homologe nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.2.4.2. Kompjuterska analiza PFGE profila

Dobijeni profili su iskorišćeni za određivanje filogenetskih odnosa predstavnika kolekcije. Slike gelova su označene pomoću programa Phoretix 1D (TotalLab; free trial licence). Baza sa 166 analiziranih izolata *Bacillus* spp. i 6 referentnih sojeva je kreirana

u Phoretix 1D Pro (TotalLab; free trial licence) programu. Nakon pripreme baze, dobijeni profili su iskorišćeni za kreiranje dendrograma primenom Band difference i Complete Linkage algoritma (Defays, 1977).

3.2.4.3. Filogenetska analiza sekvenci *tuf* gena

Sa NCBI GenBank (Benson i sar. 2000) baze skinute su referentne sekvence za *tuf* gen bakterija iz rodova *Bacillus* (23 sekvenci) i takozvani "outline" soj koji nije iz roda *Bacillus* (1 sekvenca). Sekvence referentnih sojeva su poravnate koristeći ClustalW (Thompson i sar., 1994) algoritam za višestruko poravnanje sekvenci. Na osnovu poravnatih sekvenci kreirana je konsenzusna sekvenca u programu BioEdit (v7.1.3; Hall 1999). Konsenzusna referentna sekvenca je ponovo poravnata primenom ClustalW algoritma sa sekvencom za editovanje. Potom je sekvenca od interesa manuelno editovana. Uklonjeni su 5' i 3' krajevi sekvence gde je kvalitet isčitavanja sekvencera bio loš. U lokusima gde su postojale duplikacije ili transverzije, izvršene su korekcije prema konsenzusnoj sekvenci. Identifikacija izolata izvršena je daljom primenom mega BLAST algoritma (Morgulis i sar., 2008, Altschul i sar., 1990). Koristeći Mega 6 (v6.0.6; Tamura i sar., 2013), editovane sekvence i sekvence gena referentnih sojeva iz GenBank baze (predstavnicu roda *Bacillus* i 1 "outliner" iz drugog razdela) su ponovo poravnate koristeći ClustalW algoritam.

Utvrđena je najbolja statistička metoda za konstrukciju dendrograma. Dendrogram je konstruisan Neighbour joining metodom koristeći odgovarajući statistički model sa cutoff vrednošću 50% uz proveru verodostojnosti (bootstrap) od 1000 replikata. Analizom sekvenci je utvrđeno da je najbolji statistički model za filogenetsku analizu dobijenih sekvenci bio Kimurin dvoparametarski model (Kimura, 1980).

3.2.5. METODE RADA SA BAKTERIOCINIMA

3.2.5.1. Bakteriocinski test

Za detekciju proizvodnje bakteriocina korišćen je **dufuzioni metod u bunarčićima** (modifikacija Harris i sar., 1989). Dufuzioni metod u bunarčićima je izvođen tako što su petri šolje sa čvrstim medijumom prelivane sa 10 ml odgovarajućeg soft agara koji je inokulisan sa oko 10^5 - 10^6 ćelija indikatorskog soja/ml medijuma. U soft agaru su

pravljene bunarčiče prečnika 5 mm u koje je sipano po 50 ml uzorka koji se testira. Uz ivicu bunarčiča dodavan je kristal proteaze iz *Streptomyces griseus* (SIGMA). Prisustvo bakteriocina u uzorku je detektovano na osnovu pojave svetle zone oko bunarčiča, širine nekoliko milimetara, kao posledica inhibicije rasta senzitivnog bakterijskog soja, kao i odsustva ove zone oko mesta aplikacije proteaze (tzv., srpasta zona inhibicije).

3.2.5.2. Testiranje termostabilnosti i pH opsega bakteriocina

Termostabilnost bakteriocina je testirana kako sledi: bakteriocinski preparati su inkubirani 15 min i 30 min na sledećim temperaturama: 50°C, 70°C i 100°C. Nakon hlađenja (stajanjem na sobnoj temperaturi), uzorcima je ispitana bakteriocinska aktivnost difuzionim metodom u bunarčičima. U sledećem eksperimentu, bakteriocinski preparat je autoklaviran, tj. inkubiran 20 min na 121°C. Ovako tretiranom uzorku je nakon hlađenja određena bakteriocinska aktivnost difuzionim metodom u bunarčičima. Očuvanje aktivnosti bakteriocina na niskim temperaturama je analizirano tako što je supernatant čuvan na temperaturi od +4°C i svakog meseca je testirana aktivnost u toku jedne godine. U svim navedenim eksperimentima indikatorski soj je bio *Bacillus subtilis* 168.

Aktivnost bakteriocina na različitim pH je testirana tako što je alikvotima bakteriocinskih preparata podešen pH na različite vrednosti (od pH 2 do pH 13) korišćenjem 1M HCl ili 1M NaOH, sa razmakom od po jedne pH jedinice. Ovako tretirani uzorci su inkubirani 1 h na 30°C, a zatim im je, nakon vraćanja pH vrednosti na početnu, određena bakteriocinska aktivnost. U svim opisanim eksperimentima, bakteriocinski test je rađen difuzionim metodom u bunarčičima na indikatorski soj *Bacillus subtilis* 168.

3.2.5.3. Efekat delovanja različitih enzima na bakteriocin

Ispitivano je delovanje sledećih enzima na bakteriocin: proteaze iz *Streptomyces griseus* (Sigma), proteinaze K (Sigma), tripsina (Calbiochem), DNaze (Sigma) i RNaze (Sigma). Proteaza iz *Streptomyces griseus* i proteinaza K su rastvarane u 0,01 M Tris-HCl puferu, pH 8, tripsin u 0,05 M Tris-HCl puferu, pH 8. Ostali korišćeni enzimi rastvarani u 0,05 M Na-fosfatnom puferu, pH 6,5. Enzimi u odgovarajućim 2 × puferima su dodavani

bakteriocinskom preparatu u odnosu 1:1, tako da je njihova finalna koncentracija bila 1 mg/ml. Smeša bakteriocina i enzima u odgovarajućem puferu je inkubirana 1 h na 37°C i nakon toga joj je testirana bakteriocinska aktivnost difuzionim metodom u bunarčićima. *Bacillus subtilis* 168 je korišćen kao indikatorski soj.

3.2.5.4. Efekat katjona na bakteriocinsku aktivnost

Testiran je uticaj sledećih katjona na bakteriocinsku aktivnost: Ca²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, K⁺ i Na⁺ u koncentracijama od 5mM, 10mM, 15mM i 20mM. Bakteriocinski preparat je kao i u prethodno navedenim testovima posle mešanja sa različitim katjonskim rastvorima u odnosu 1:1 inkubiran 1h na temperaturi od 37°C. Bakteriocinska aktivnost je testirana difuznom metodom u bunarčićima. Kao kontrola korišćeni su bakteriocinski preparati bez katjona. Pored ovog testa urađen je i test u kome je testiran uticaj 10mM EDTA na aktivnost bakteriocinskog preparata. Indikatorski soj je u svim testovima bio *Bacillus subtilis* 168.

3.2.5.5. Određivanje antibakterijskog spektra delovanja bakteriocina

Antimikrobna aktivnost soja proizvođača bakteriocina *Bacillus licheniformis* 50.2, testirana je na različite indikatorske sojeve difuzionim metodom u bunarčićima. Kao indikatorski sojevi korišćeni su različiti sojevi bakterija, gljiva i kvasaca. Uz ivicu bunarića uvek je dodavan kristal pronaze E.

3.2.5.6. Izolovanje bakteriocina amonijum-sulfatom

42. sat prekonoćne kulture bakterija je oslobođen ćelija centrifugiranjem 15 min na 10000 × g nakon čega je supernatant profiltriran kroz 0.45 μm Durapore™ (Milipore) filter. U sterilni supernatant dodaje se amonijum sulfat za precipitaciju proteina. Koristeći nomogram, izračuna se količina kristalnog amonijum sulfata koja se dodaje da bi se postiglo: 20, 40, 60 i 80% (w/v) saturacije. Radi se sekvencijalno, prvo se dodaje količina potrebna za 20% zasićenja, rastvori se i drži na 4°C preko noći. Precipitat se zatim prikuplja centrifugiranjem 20 min na 12000 × g i resuspenduje u 5 mM Na-fosfatnom puferu (pH 6.8). Prikuplja se i supernatant i u njega se dodaje količina amonijum sulfata

koja će, uz prethodno dodatu, činiti ukupno 40% saturacije. Postupak se zatim ponavlja kao i u prethodnom koraku. Precipitat sa 60 i 80% zasićenosti amonijum sulfatom se dobija na isti način. Precipitati dobijeni sa odgovarajućom zasićenošću amonijum sulfatom se testiraju na prisustvo antimikrobnih supstanci na osetljivom indikatorskom soju difuznim metodom u bunarčićima.

3.2.5.7. Prečišćavanje bakteriocina hloroformom

Precipitat bakteriocina sa najvećom aktivnošću nakon amonijum sulfatne precipitacije se prečišćava tretiranjem hloroformom u odnosu 1:1 (vol/vol). Dobijena smeša se intenzivno mućka 10-15 min a zatim se vrši odvajanje faza centrifugiranjem 10 min na $5000 \times g$. Odbacuju se gornja, vodena faza i donja, hloroformska a prikuplja se interfaza u kojoj je protein. Dobijena interfaza se zatim uparava do suvog u rotirajućem evaporatoru i resuspenduje u 50 mM Na-fosfatnom puferu (pH 6.8). Antimikrobna aktivnost se testira na već opisan način.

3.2.5.8. Ultrafiltracija

Dobijeni parcijalno prečišćeni bakteriocin je podvrgavan ultrafiltraciji kroz molekularne filtere sa "cut-off"-om od 3, 10 i 30 kDa (Milipore). Ovaj korak dodatno prečišćava i koncentriše uzorke i ujedno omogućava orijentaciono određivanje molekulske mase aktivne supstance.

3.2.5.9. Kinetika proizvodnje bakteriocina u različitim medijumima i u različitim uslovima

B. licheniformis VPS50.2 je gajen aerobno u 1000ml Erlenmajerima sa po 200ml LB medijuma, Schaeffer's sporucionog medijuma i Spizizen's minimalnog medijuma, varirajući temperaturu inkubacije (30°C i 37°C) i brzinu šejkiranja (180rpm i 220rpm) u toku 48h. Određivana je brojnost bakterija (CFU/ml) i spora (CFU/ml) na svaka dva sata zasejavanjem odgovarajućeg razblaženja na petri šolje sa LA medijumom. Pored toga, u istim vremenskim intervalima, uziman je i alikvot kulture kome je testirana antimikrobna aktivnost protiv odgovarajućeg indikatorskog soja na već opisani način.

3.2.5.10. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija i dinamike antibakterijske aktivnosti

Mikrodiluciona metoda je korišćena za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) testiranih bakteriocina. Za određivanje MIC vrednosti ekstrakata korišćene su mikrotitracione ploče sa 96 mesta. Serijska razblaženja su pripremana u svežem MHA medijumu (bioMérieux) sa dodatkom 0,05% triphenyl tetrazolium chloride (Sigma-Aldrich) kao indikatora rasta. Sve je rađeno u triplikatu i inokulisano sa 5×10^5 CFU/ml indikatorskog soja bakterija. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je određivana nakon inkubacije 24h na 35°C u aerobnim uslovima. Svi testovi su ponovljeni tri puta. Antimikrobna aktivnost je izražena kao arbitrarne jedinice (AU) po mililitru. AU je definisana kao recipročna vrednost najvišeg serijskog dvostrukog razblaženja koje je pokazalo inhibiciju rasta kod testiranih sojeva.

Inokulum *L. monocytogenes* je pripreman do eksponencijalne faze a zatim razblaživan u BHI tečnom medijumu do otprilike 10^6 ćel/ml. Alikvoti (10ml) kulture su prebacivani u odvojene flaskove i liheniocinski ekstrakt je dodavan iz sterilnog stoka do finalne koncentracije od 0,5; 1; 2 i $4 \times$ MIC. Kontrolni flask je testiran bez prisustva bakteriocina. Kultura je inkubirana na 37°C a uzorci su uzimani svakog sata u toku osam sati po dodatku bakteriocina. Uzorci su ispirani, serijski razblaživani 10 puta u 0,5 mM fosfatnom puferu i 10 µl uzorka je u triplikatu zasejavano na odgovarajući čvrsti medijum, nakon čega je inkubirano na 37°C.

3.2.5.11. Ispitivanje uticaja bakteriocina na produkciju biofilma

Sposobnost produkcije biofilma je ispitana u mikrotitracionim pločama sa 96 mesta prema protokolu Stepanovića i sar. (2007b). Napravljena su serijska razblaženja bakteriocina liheniocina 50.2 i BGBU1-4 ($1/2 \times$ do $1/32 \times$ MIC) u TSB bujonu sa dodatkom 1% glukoze (za KNS) ili BHI bujonu sa dodatkom 2% glukoze i 2% saharoze (za *L.monocytogenes*) prema Knobloch i sar. (2002). U mikrotitracione ploče je dodato po 180 µl svakog razblaženja u triplikatima. U svako polje ploče je dodato po 20 µl prethodno pripremljene bakterijske suspenzije. Pozitivna kontrola svakog soja su bile bakterije kultivisane samo u medijumu bez prisustva bakteriocina. Dva triplikata samog

medijuma su predstavljala negativnu kontrolu svake ploče. Nakon 24h kultivacije na 35°C u aerobnim uslovima, ploče su odlivene, tri puta isprane sa 300 µl temperiranog fosfatnog pufera (eng. phosphate-buffered saline, PBS; pH 7.2) i osušene na vazduhu. Ploče su fiksirane tokom 20 min. sa 150 µl metanola po polju ploče, osušene i obojene sa 150 µl rastvora 2% kristal violeta (bioMeArioux) tokom 15 min. Višak nevezane boje je ispran tekućom vodom a boja vezana za adherentne bakterije je oslobođena sa 150 µl 96% etanola tokom 20 min. Optička gustina je pročitana na 570 nm (ICN Flow Titertek Multiscan Plus) nakon čega su izračunate srednje vrednosti triplikata za sve testirane sojeve i negativne kontrole. Da bi se odredila kategorija produkcije biofilma, za svaku mikrotitracionu ploču je definisana „cut off“ vrednost (ODc) kao srednja vrednost apsorbance negativnih kontrola uvećana za vrednost 3 SD (srednja vrednost OD negativne kontrole +3SD). Prema dobijenoj vrednosti ODc su preračunati rezultati prema sledećoj šemi (Stepanović i sar., 2000):

$OD \leq ODc$ - nema produkcije biofilma (kategorija 0)

$ODc < OD \leq 2 \times ODc$ – slaba produkcija biofilma (kategorija 1 ili +)

$2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$ – umerena produkcija biofilma (kategorija 2 ili ++)

$4 \times ODc < OD$ – izražena produkcija biofilma (kategorija 3 ili +++)

Svaki eksperiment je ponovljen tri puta tokom tri uzastopna dana. Podaci su statistički obrađeni pomoću SPSS statističkog programa (PASW statistika za Windows, Verzija 18.0, Chicago: SPSS Inc. USA) korišćenjem metoda deskriptivne statistike, Chi kvadrat testa i Mann-Whitney U testa.

3.2.5.12. Ispitivanje uticaja bakteriocina na već formiran biofilm

Za ispitivanje efekta bakteriocina liheniocina 50.2 i BGBU1-4 na već formiran biofilm bakterije su kultivisane u mikrotitracionim pločama sa 96 mesta u TSB ili BHI medijumu, kako je prethodno opisano. Nakon 24h kultivacije na 35°C u aerobnim uslovima, ploče su odlivene i pažljivo isprane tri puta sa 300 µl sterilnog PBS. Zatim je 24h već formiran biofilm izložen koncentracijama bakteriocina od 100 AU/ml i 200 AU/ml liheniocina 50.2 i 200µl/bunariću BGBU1-4 bakteriocina. Ploče su inkubirane dodatnih 24h na 35°C u aerobnim uslovima, isprane, fiksirane i obojene po prethodno opisanoj proceduri a zatim izračunata kategorija biofilma.

3.2.5.13. Ispitivanje efekta kombinovane primene bakteriocina i antibiotika sa različitim mehanizmima delovanja na rast izolovanih sojeva

Efekat kombinacije bakteriocina sa antibioticima na rast izolovanih sojeva je ispitan pomoću tzv. “checkerboard” metoda prema White i sar. (1996). Testiranje je izvršeno sa dva antibiotika sa različitim mehanizmom delovanja: β -laktamskim antibiotikom ampicilinom (AMP) i aminoglikozidom gentamicinom (GEN) (Sigma-Aldrich). Ispitivanje je izvršeno u mikrotitracionim pločama sa 96 mesta sa serijskim razblaženjima ampicilina i gentamicina (4-0,125 μ g/ml), bakteriocina liheniocina 50.2 i BGBU1-4 (25-0,38 AU/ml) i dva bakteriocina međusobno. Dodato je po 20 μ l bakterijske suspenzije gustine 0,5 po McFarland standardu. Interakcija između antibiotika i bakteriocina je procenjena nakon izračunavanja frakcione inhibitorne koncentracije (eng fractional inhibitory concentration; FIC) i indeksa frakcione inhibitorne koncentracije (eng. fractional inhibitory concentration indices; FICI).

FIC za svaku supstancu je preračunat deljenjem MIC supstance u kombinaciji bakteriocina i antibiotika sa MIC same supstance ($FIC_{\text{bakteriocina}} = \frac{MIC_{\text{kombinacijebakteriocin-antibiotik}}}{MIC_{\text{bakteriocin}}}$).

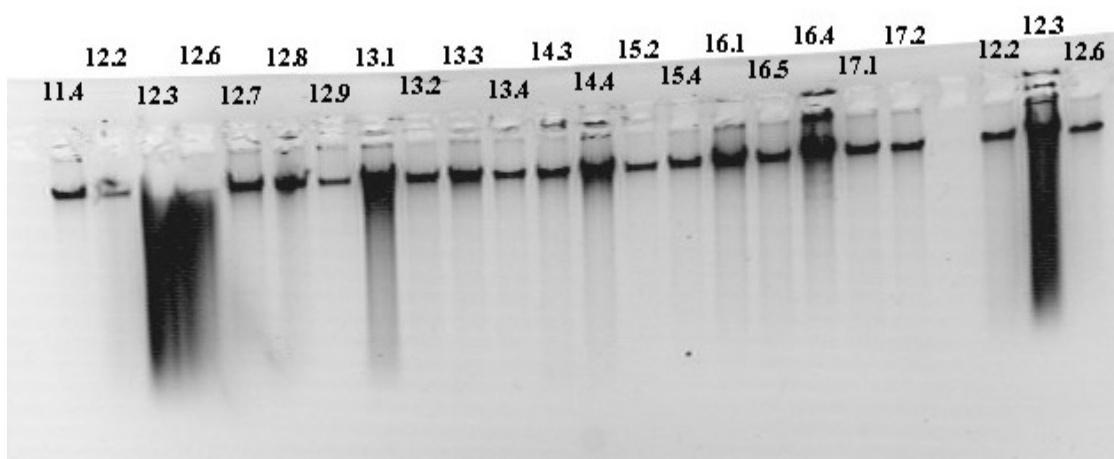
FICI vrednosti su izračunate kao suma $FIC_{\text{bakteriocina}}$ i $FIC_{\text{antibiotika}}$ i tumačene prema sledećem kriterijumu: $FICI \leq 0.5$ sinergizam; $0.5 < FICI \leq 1$ aditivnost; $1 < FICI \leq 2$ indiferentan efekat i $FICI \geq 2$ antagonizam (Hu i sar., 2002; Orhan i sar., 2005). Svaki test je ponovljen tri puta.

4. REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Izolovanje ukupne DNK iz *Bacillus* spp.

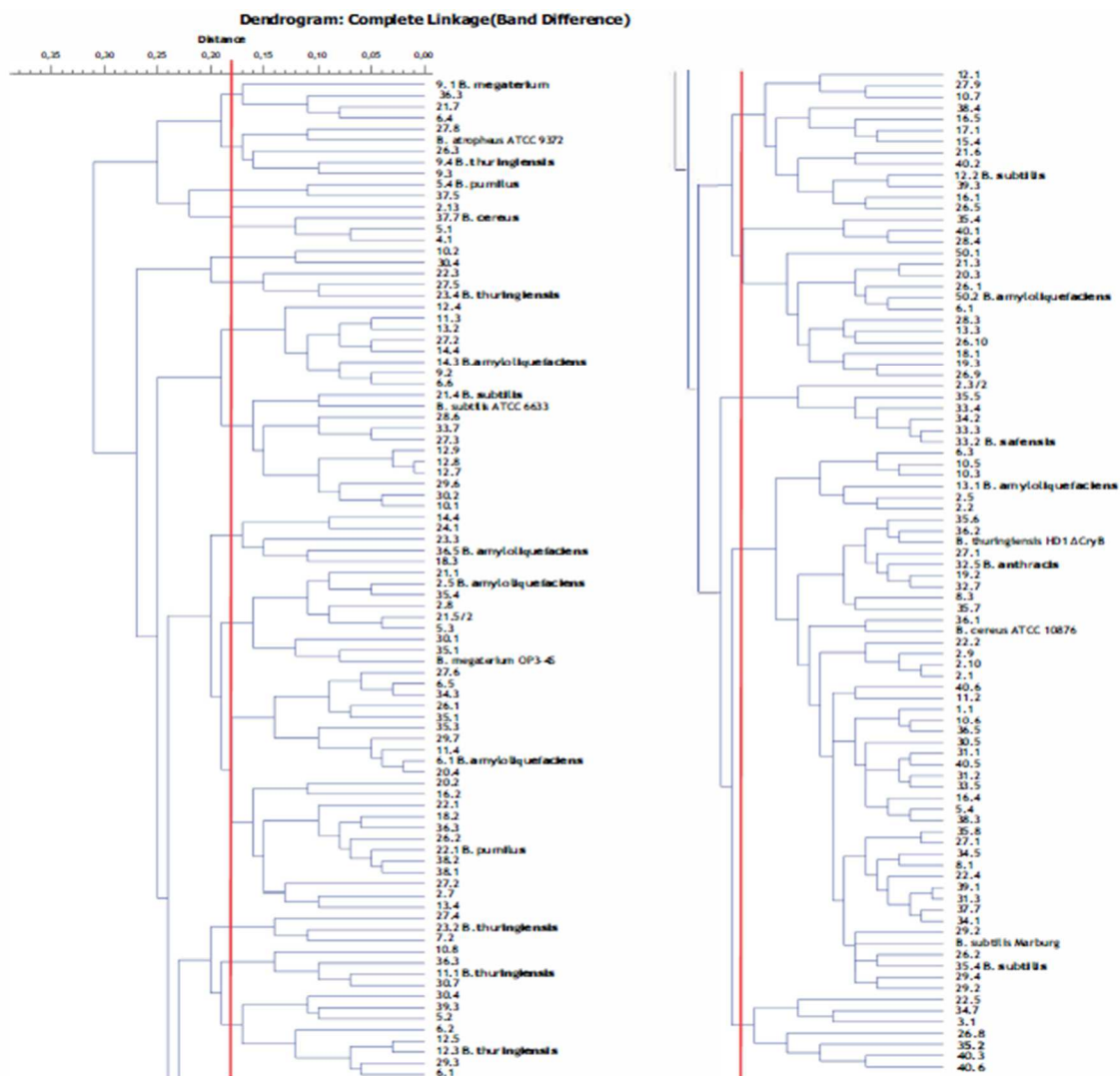
Ukupna genomska DNK iz kolekcije 166 prirodnih izolata *Bacillus* sp. je izolovana po opisanom protokolu. Provera prinosa izolacije je vršena horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 3.)



Slika 3. Horizontalna elektroforeza ukupne genomske DNK izabranih izolata *Bacillus* spp.

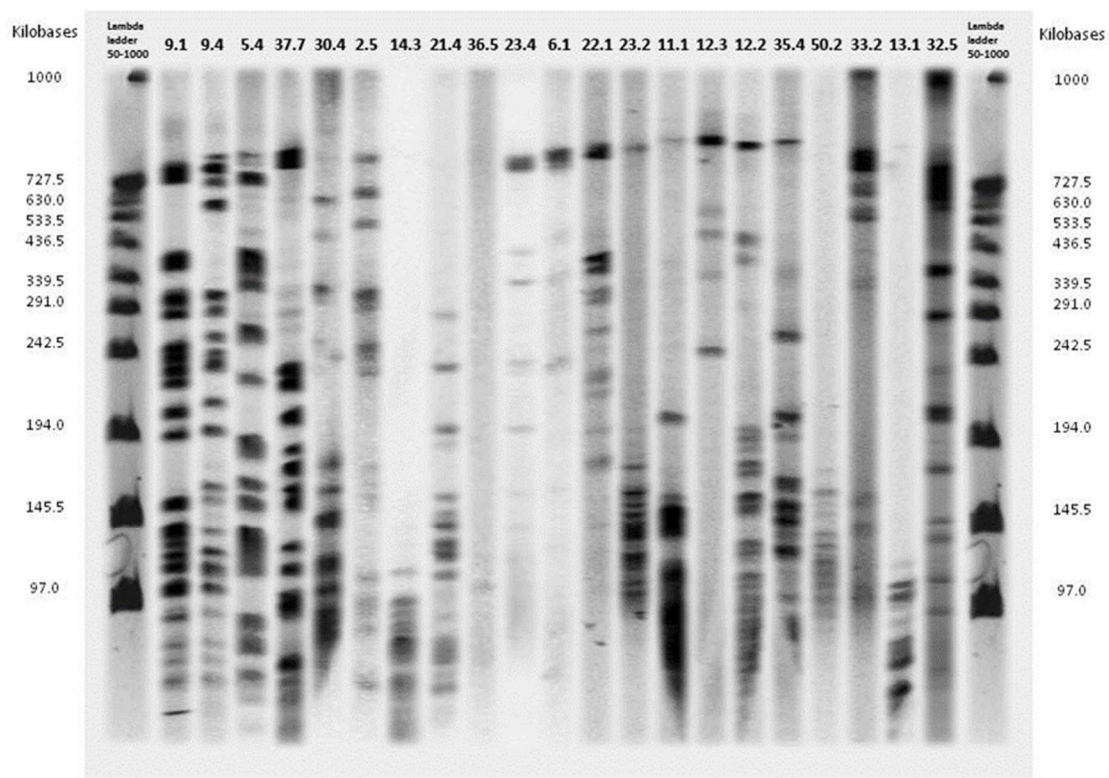
4.2. Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)

NotI enzim prepoznaje sekvencu GCGGCCGC i vrši sečenje hromozomalne DNK *Bacillus* spp. izolata na 6-24 fragmenata. Upotrebom ovog restriktionog enzima dobijeni su fragmenti veličine od 48.5 kb do 1000 kb sa većinom fragmenata veličine između 48 i 727 kb. „Complete linkage“ analizom profila dobijenih primenom PFGE totalne DNK za svaki od 166 izolata i 6 referentnih sojeva, određeni su filogenetski odnosi između izolata i referentnih sojeva i konstruisano je filogenetsko stablo, što je i prikazano na Slici 4.



Slika 4. Dendrogram filogenetskih odnosa unutar kolekcije *Bacillus* spp. dobijen korišćenjem Complete Linkage metode bazirane na profilima genoma nakon digestije i PFGE razdvajanja. Crvena uspravna linija predstavlja cutoff distancu od 0,18.

Na osnovu odabrane Cut off vrednosti distance (0,18), dobije se 21 klaster iz kojih je odabran po jedan predstavnik za dalju molekularnu analizu. Ukupan broj izolata koji su svrstani u odgovarajuće filogenetske grupe na osnovu PFGE profila dat je u Tabeli 4. Na Slici 5 gde je prikazan gel nakon razdvajanja, mogu se uočiti predstavnici svake grupe profila dobijenih nakon digestije *NotI* restrikcionim enzimom.

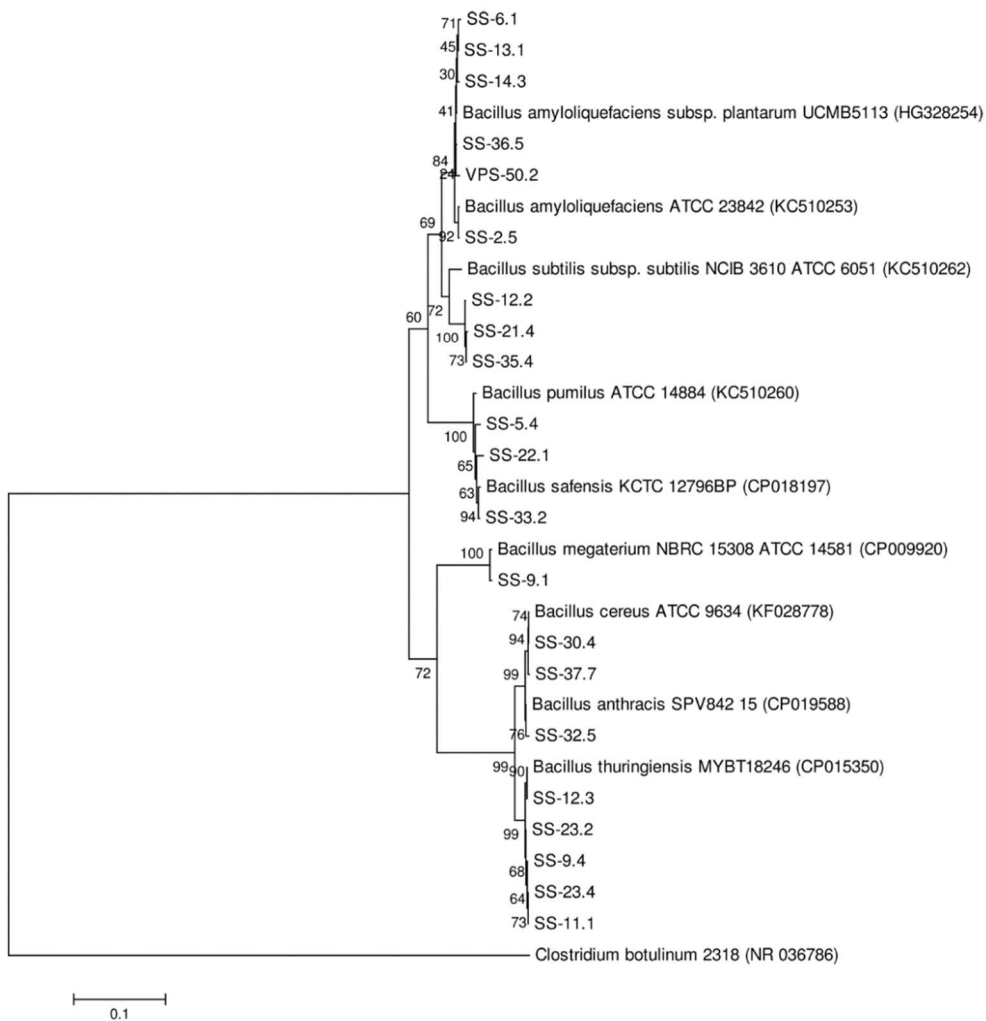


Slika 5. Kompozitna slika PFGE profila 21 *Bacillus* spp. izolata nakon analiziranja u grupi od 166 profila. Profili reprezentativnih izolata i Lambda ladder kao molekularnog markera su prikazani na slici.

4.3. Filogenetska analiza sekvenci *tuf* gena

Za dalju molekularnu identifikaciju sekvenciranjem *tuf* gena, koji kodira elongacioni faktor Tu, odabran je 21 predstavnik. Svi izolati su nakon PCR analize dali proizvod od približno 790 bp. Nakon sekvenciranja PCR proizvoda i analize sekvenci, konstruisano je filogenetsko stablo (Slika 6).

U Tabeli 4. prikazane su PFGE grupe sa identifikovanim izolatima predstavnicima grupa.



Slika 6. Neighbour joining filogenetsko stablo bazirano na sekvencama *tuf* gena (790 bp) koje pokazuje odnose referentnih sojeva i testiranih izolata roda *Bacillus*.

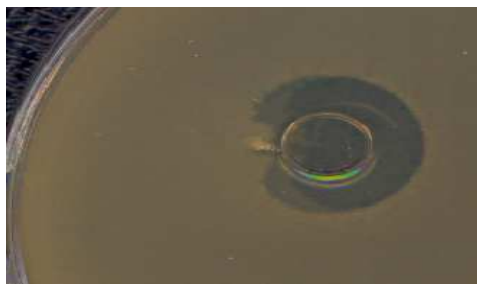
Izolati predstavnici grupa: SS-6.1, SS-13.1, SS-14.3, SS-36.5, VPS-50.2 i SS-2.5 su svrstani filogenetski najbliže *B. amyloliquefaciens*, što je, kada se ubroje svi izolati iz navedenih grupa ukupno 52 izolata. Izolati predstavnici grupa: SS-12.2, SS-21.4 i SS-35.4 grupisali su zajedno sa *B. subtilis* (ukupno 54 izolata). Izolati predstavnici grupa: SS-9.4, SS-23.4 i SS-23.2, SS-11.1, SS-12.3 grupisali su zajedno sa *B. thuringiensis* (ukupno 22 izolata). Izolati predstavnici grupa: SS-30.4, SS-37.7 i SS-32.5, pokazivali su srodnost i sa *B. anthracis* i sa *B. cereus* (ukupno 14 izolata). Samo je izolat SS-9.1, kao predstavnik grupe od 4 izolata, pokazao nedvosmislenu srodnost sa *B. megaterium*. Izolati predstavnici grupa: SS-5.4, SS-22.1 i SS-33.2 su grupisali zajedno sa *B. pumilus* i *B. safensis* (ukupno 20 izolata).

Tabela 4. Uporedni pregled raznovrsnosti 21 odabranog izolata *Bacillus* spp.

Izolat	Lokacija	Stanište	PFGE grupa	Broj izolata u grupi	tuf identifikacija
SS-9.1	Paraćin dvorište	Zemljište	I	4	<i>B. megaterium</i> NBRC 15308 ATCC 14581
SS-9.4	Paraćin dvorište	Zemljište	II	4	<i>B. thuringiensis</i> MYBT18246
SS-5.4	Točane	Slama	III	2	<i>B. pumilus</i> ATCC 14884
SS-37.7	Ovča	Zemljište	IV	4	<i>B. cereus</i> ATCC 9634
SS-30.4	Lokacija 30	Đubrivo	V	2	<i>B. cereus</i> ATCC 9634
SS-23.4	Valjevo	Zemljište	VI	3	<i>B. thuringiensis</i> MYBT18246
SS-14.3	Paraćin kej	Zemljište	VII	8	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5113
SS-21.4	Mala Plana potok	Zemljište	VIII	10	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 ATCC 6051
SS-36.5	Erdevik	Zemljište	IX	5	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5113
SS-2.5	Bresnica	Slama	X	8	<i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 23842
SS-6.1	Paraćin	Zemljište	XI	10	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5113
SS-22.1	Valjevo	Zemljište	XII	12	<i>B. pumilus</i> ATCC 14884
SS-23.2	Valjevo - Petnica	Zemljište	XIII	3	<i>B. thuringiensis</i> MYBT18246
SS-11.1	Mala Plana oranica	Zemljište	XIV	4	<i>B. thuringiensis</i> MYBT18246
SS-12.3	Paraćin park	Zemljište	XV	8	<i>B. thuringiensis</i> MYBT18246
SS-12.2	Paraćin park	Zemljište	XVI	13	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 ATCC 6051
VPS50.2	Beograd - Viša pedagoška	Zemljište	XVII	15	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5113
SS-33.2	Lokacija 33	Đubrivo	XVIII	6	<i>B. safensis</i> KCTC 12796BP
SS-13.1	Donje Vidovo	Zemljište	XIX	6	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5113
SS-32.5	Lokacija 32	Đubrivo	XX	8	<i>B. anthracis</i> SPV842_15
SS-35.4	Kaluđerica	Zemljište	XXI	31	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 ATCC 6051

4.4. Bakteriocinski test

Difuzionim metodom u bunarčićima je dobijena karakteristična polumesečasta zona inhibicije rasta senzitivnog soja koja nedvosmisleno govori o antimikorbnoj supstanci proteinske prirode, bakteriocinu koji sintetiše soj *Bacillus licheniformis* VPS50.2 (Slika 7).

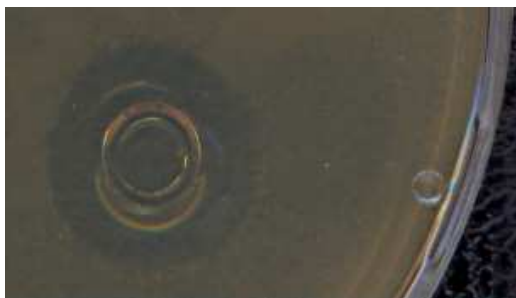


Slika 7. Zona inhibicije rasta senzitivnog soja *B. subtilis* 168 bakteriocinom koji sintetiše soj *B. licheniformis* VPS50.2, liheniocina 50.2.

4.5. Biohemijska karakterizacija liheniocina 50.2

Liheociin 50.2 zadržava ~70% aktivnosti inkubiranjem 20 min na 121°C (Slika 8). Kod uzoraka koji su čuvani na +4°C tokom 12 meseci konstatovana je nepromenjena antimikrobna aktivnost.

Testiranjem bakteriocinske aktivnosti na različitim pH vrednostima pokazano je da liheniocin 50.2 zadržava svoju aktivnost u širokom opsegu pH vrednosti od 2 do 13. Aktivnost bakteriocina bila je najveća na pH 9. Na pH 12-13 liheniocin 50.2 je zadržavao ~78% svoje aktivnosti.



Slika 8. Zona aktivnosti bakteriocina nakon inkubiranja na 121°C.

U Tabeli 5 je prikazan uticaj različitih enzima na bakteriocinisku aktivnost liheniocina 50.2. *B. subtilis* 168 je korišćen kao indikatorski soj.

Tabela 5. Uticaj različitih enzima na bakteriocinsku aktivnost liheniocina 50.2

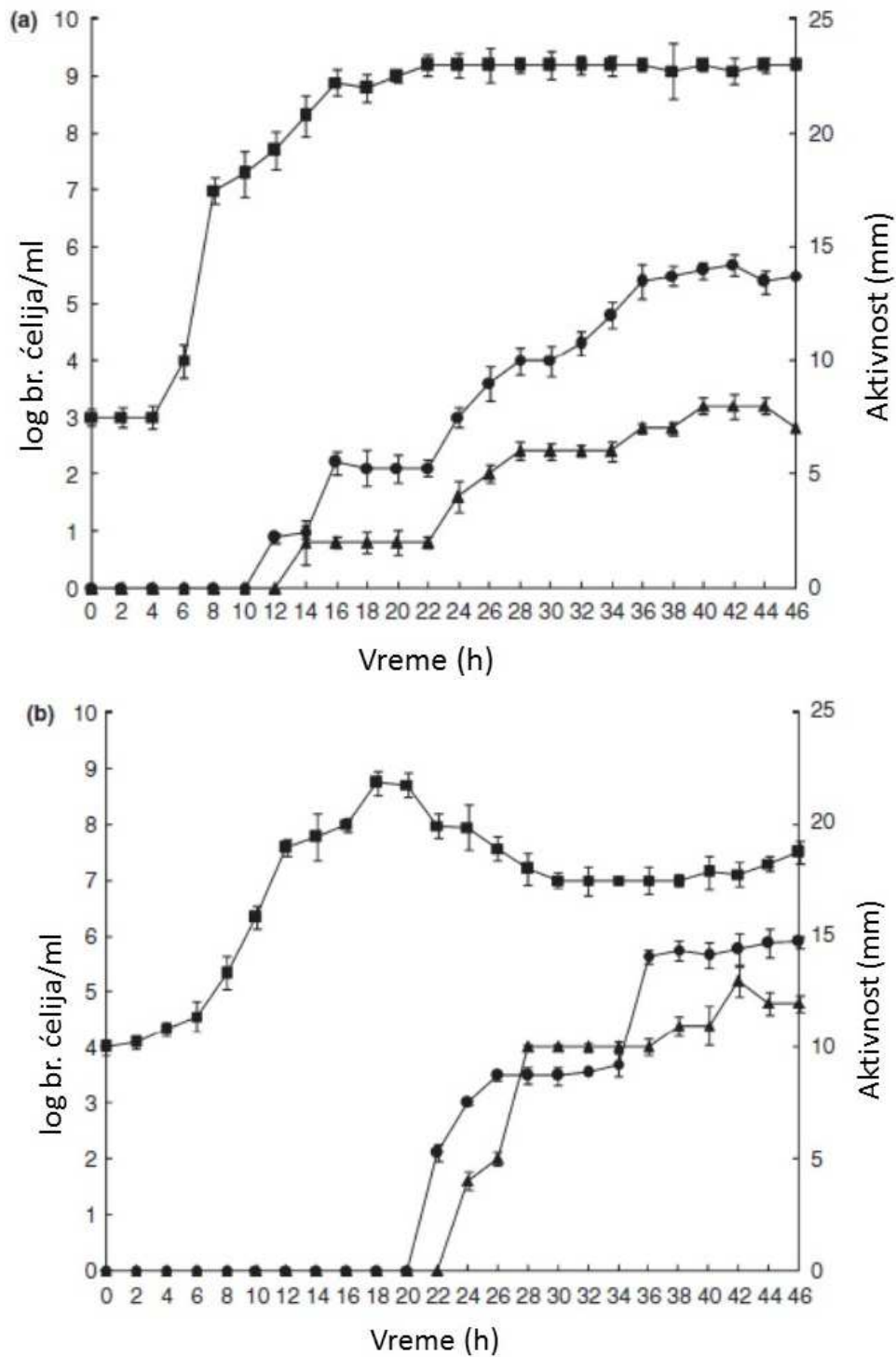
	Aktivnost liheniocina 50.2*
Bez enzima	18
Pronaza E	9
Proteinaza K	9
Tripsin	10
DNK-aza	17
RNK-aza	17

*prečnik zone inhibicije dat je u milimetrima.

Nakon tretmana različitim katjonima (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Na^+) u koncentracijama od 20 mM i trajanju od 1 h, inhibitorna aktivnost bakteriocina liheniocina 50.2 je ostala nepromenjena, izuzev u slučaju Fe^{3+} gde je došlo do pada aktivnosti na ~60%. Pri testiranju aktivnosti kod tretmana bakteriocina 10 mM helirajićim agensom EDTA, kontrola samog EDTA je dala identičan rezultat kao i sa bakteriocinskim preparatom.

4.6. Kinetika proizvodnje bakteriocina u različitim medijumima i u različitim uslovima

Sinteza bakteriocina praćena je u LB, Schaeffer's sporulacionom i Spizizen's minimalnom medijumu na temperaturama od 30°C i 37°C, uz aeraciju, na 180 rpm i 220 rpm, u intervalima od 2 sata u toku 48h. Određivan je ukupan broj bakterija, broj spora i antimikrobna aktivnost supernatanta protiv *B. subtilis* 168. Praćenje krive rasta započeto je zasejavanjem 1 kolonije izolata VPS50.2 u po 200 ml medijuma. U LB medijumu, proizvodnja bakteriocina je detektovana nakon 14h rasta, a najintenzivnija je (tj., dobijaju se najveće zone inhibicije) posle 36h inkubacije i održava se do kraja praćenog perioda. Vreme u kome počinje sinteza bakteriocina je na prelazu iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta, i donekle se poklapa sa početkom sporulacije (prve zabeležene spore se pojavljuju posle 12 sati inkubacije a bakteriocin posle 14h). Takođe, može se uočiti da se sa povećanjem broja spora, povećava i aktivnost bakteriocina (Slika 9).



Slika 9. Antimikrobna aktivnost tokom rasta i sporulacije VPS50.2 u LB (a) i Schaeffer's sporulacionom (b) medijumu. (■) log ćel/ml, (●) log spore/ml i (▲) antimikrobna aktivnost (prečnici zone inhibicije u mm). *B. subtilis* 168 je korišćen kao indikatorski soj. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Efekat različitih medijuma na proizvodnju bakteriocina je ispitivan u već opisanim medijumima. U minimalnom medijumu je pokazan veoma mali rast ćelija, a sama produkcija bakteriocina nije zabeležena. Schaeffer's sporulacioni medijum je pokazao veoma slične rezultate kao i LB medijum. Najbolja produkcija bakteriocina, tj najveća zona inhibicije na indikatorskom soju *B. subtilis* 168, zabeležena je pod sledećim uslovima: u 42h od početka inkubacije na 37°C i pri brzini šejkiranja od 180 rpm. Da bi se povećala produkcija bakteriocina pokušana je koinkubacija sa indikatorskim sojem *B. subtilis* 168 tokom rasta u optimalnom medijumu i pod optimalnim fizičkim uslovima. Ovakav pokušaj nije dao povoljan rezultat.

4.7. Određivanje antibakterijskog spektra delovanja bakteriocina

U Tabeli 6 je prikazan antimikrobni spektar liheniocina 50.2.

Tabela 6. Antimikrobni spektar bakteriocina iz *B. licheniformis* VPS50.2.

Indikatorski soj	Temperatura (°C)	Zona inhibicije (mm)*
<i>Bacillus licheniformis</i> VPS50.2	37	0
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 49140	37	0
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12759	37	0
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	37	16
<i>B. subtilis</i> 168	37	25
<i>B. subtilis</i> W23	37	25
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 49141	37	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	37	23
<i>E. saccharolyticus</i> ATCC 43076	37	25
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG92088	30	13
<i>Lbactobacillus zeae</i>	30	22
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	30	26
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> B464	30	0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	37	25
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	37	31
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	37	15

<i>Staphylococcus aureus</i> ¹ ATCC 33591	37	21
<i>Streptococcus agalactiae</i> ² ATCC 12386	37	15
<i>S. equisimillis</i> ³ ATCC 12394	37	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	37	0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	37	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	37	0
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	37	0
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	37	0
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	37	0
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	30	0
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC16404	37	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	35	9
<i>S. epidermidis</i> 1	35	10
<i>S. epidermidis</i> 18	35	12
<i>S. epidermidis</i> 20	35	12
<i>S. epidermidis</i> 24	35	15
<i>S. lugdunensis</i> 9	35	8
<i>S. hominis</i> 10	35	15
<i>S. hominis</i> 27	35	8
<i>S. haemolyticus</i> 16	35	13
<i>Listeria monocytogenes</i> 3	35	10
<i>L. monocytogenes</i> 4	35	9
<i>L. monocytogenes</i> 5	35	9
<i>L. monocytogenes</i> 9	35	8
<i>L. monocytogenes</i> 10	35	8
<i>L. monocytogenes</i> 11	35	8
<i>L. monocytogenes</i> 14	35	9
<i>L. monocytogenes</i> 16	35	9
<i>L. monocytogenes</i> 17	35	8
<i>L. monocytogenes</i> 18	35	8
<i>L. monocytogenes</i> 19	35	9
<i>L. monocytogenes</i> 20	35	8

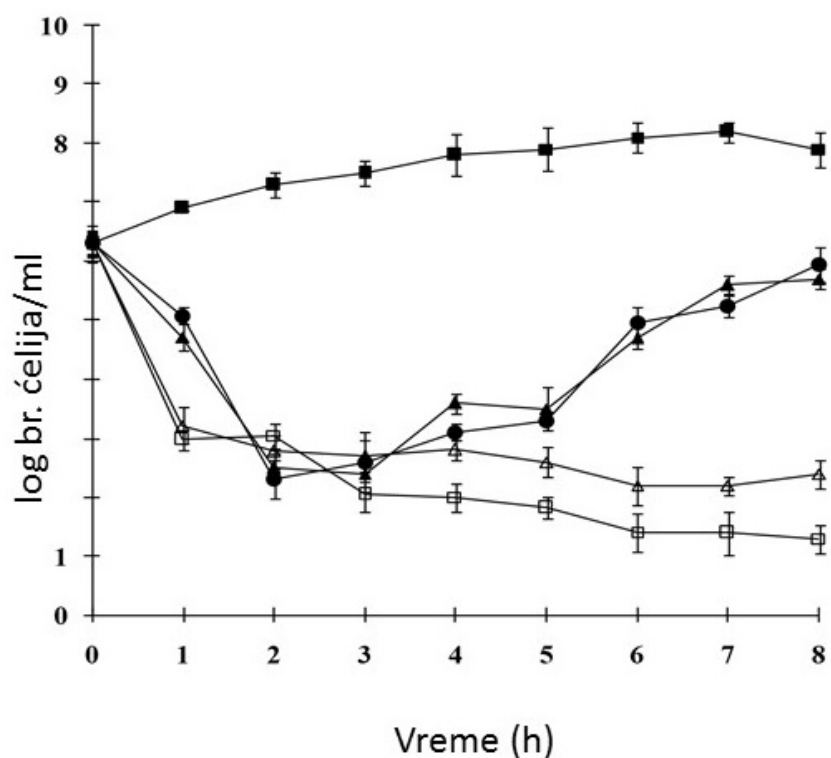
* Prečnik zone inhibicije (mm).¹ meticillin-rezistentni, ² β -hemolitička, ³ (γ - hemolitička), ⁴ klinički izolati. ATCC – American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, LMG – Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/LMG Bacteria Collection

4.8. Identifikacija bakterijskih sojeva iz kliničkih uzoraka

Identifikacija osam izolata koagulaza-negativnih stafilokoka (KNS) iz uretralnih briseva izvedena je na osnovu morfoloških osobina analiziranih na preparatu bojenom po Gramu, kulturalnih osobina, testovima slobodne koagulaze i potvrđena je automatizovanim Vitek2 Sistemom (bioMérieux, Francuska). Na ovaj način identifikovano je: 4 izolata *Staphylococcus epidermidis*, 2 izolata *Staphylococcus hominis*, 1 izolat *Staphylococcus lugdunensis* i 1 izolat *Staphylococcus haemolyticus*.

4.9. Određivanje dinamike antibakterijske aktivnosti

Za određivanje dinamike antibakterijske aktivnosti licheniocina 50.2 odabrana je *L. monocytogenes* ATCC 19111, za koju je pokazano da je osetljiva na dejstvo ovog bakteriocina (Tabela 6). Antibakterijski efekat je uočen u prvih 2h inkubacije sa svim testiranim koncentracijama bakteriocina (Slika 10). Ponovni rast *L. monocytogenes* je zabeležen na manjim koncentracijama bakteriocinskog ekstrakta (0,5 \times i 1 \times MIC), ali ne i na koncentracijama 2 \times i 4 \times MIC. Vreme do 99,9% prestanka rasta je bilo 2h za koncentracije 0,5 \times i 1 \times MIC, dok je kod koncentracija 2 \times i 4 \times MIC to bilo nakon 1h.



Slika 10. Bakteriocijska aktivnost licheniocina 50.2 na *L. monocytogenes*.

■, kontrola; ●, 0.5 × MI; ▲, 1 × MI; △, 2 × MI; □, 4 × MI.

4.10. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija

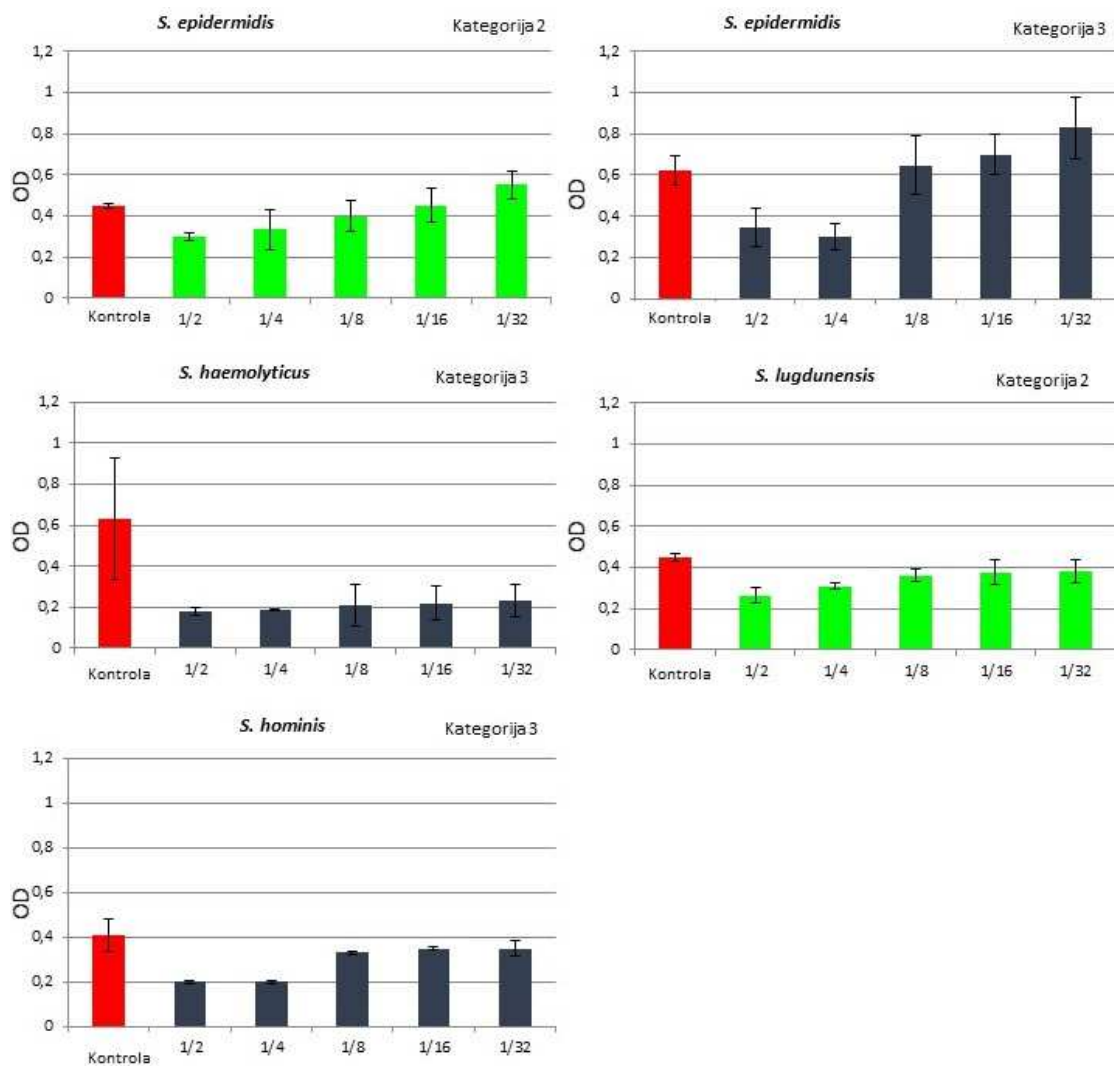
Za soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 je ranije pokazano da deluje na soj *L. lactis* subsp. *lactis* B464 derivat soja IL1403 kod koga su deletirane komponente manozno-fosfotransferaznog sistema (man-PTS). Taj podatak ukazuje da bakteriocini ovog soja ne koriste ove komponente kao receptore na membrani senzitivnih ćelija za razliku od licheniocina 50.2. Analizirani bakteriocini, licheniocin 50.2 i ekstrakt soja BGBU1-4 koji sintetiše bakteriocine, inhibirali su rast koagulaza-negativnih stafilokoka (4 soja *S. epidermidis*, dva soja *S. hominis* i po 1 soj *S. lugdunensis* i *S. haemolyticus*), referentni soj *S. epidermidis* ATCC 12228, 13 kliničkih izolata *L. monocytogenes* i referentni soj *L. monocytogenes* ATCC 19111 pri minimalnim inhibitornim koncentracijama od 200 AU/ml i 400 AU/ml za licheniocin 50.2 i između 400 i 3200 AU/ml za BGBU1-4 bakteriocine. Minimalne inhibitorne koncentracije bakteriocina licheniocina 50.2 i ekstrakta soja BGBU1-4 su prikazane u Tabeli 7.

Tabela 7. Minimalne inhibitorne koncentracije liheniocina 50.2 i ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 (AU/ml)

Soj	MIC liheniocin 50.2	MIC BGBU1-4	Kategorija prod. biofilma	Srednja vrednost±SD
<i>S. epidermidis</i> 1	200	200	2	0.25±0.04
<i>S. epidermidis</i> 18	200	200	3	0.62±0.04
<i>S. epidermidis</i> 20	200	200	2	0.23±0.06
<i>S. epidermidis</i> 24	200	200	3	0.62±0.07
<i>S. haemolyticus</i> 16	400	200	3	0.63±0.30
<i>S. hominis</i> 10	400	200	2	0.28±0.08
<i>S. hominis</i> 27	400	200	3	0.41±0.07
<i>S. lugdunensis</i> 9	400	200	2	0.20±0.02
<i>L.monocytogenes</i> 3	400	3200	1	0.25±0.03
<i>L. monocytogenes</i> 4	400	3200	3	1.03±0.09
<i>L. monocytogenes</i> 5	400	3200	3	0.97±0.06
<i>L. monocytogenes</i> 9	400	3200	2	0.55±0.02
<i>L. monocytogenes</i> 10	400	3200	2	0.29±0.04
<i>L. monocytogenes</i> 11	400	3200	2	0.36±0.01
<i>L. monocytogenes</i> 14	400	3200	3	0.38±0.01
<i>L. monocytogenes</i> 16	400	3200	3	1.13±0.07
<i>L. monocytogenes</i> 17	400	3200	3	0.79±0.04
<i>L. monocytogenes</i> 18	400	3200	3	0.59±0.03
<i>L. monocytogenes</i> 19	400	3200	3	0.68±0.04
<i>L. monocytogenes</i> 20	400	3200	3	1.11±0.08
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	200	200	3	0.58±0.06
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	400	3200	2	0.25±0.02

4.11. Ispitivanje uticaja liheniocina 50.2 i ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 na produkciju biofilma

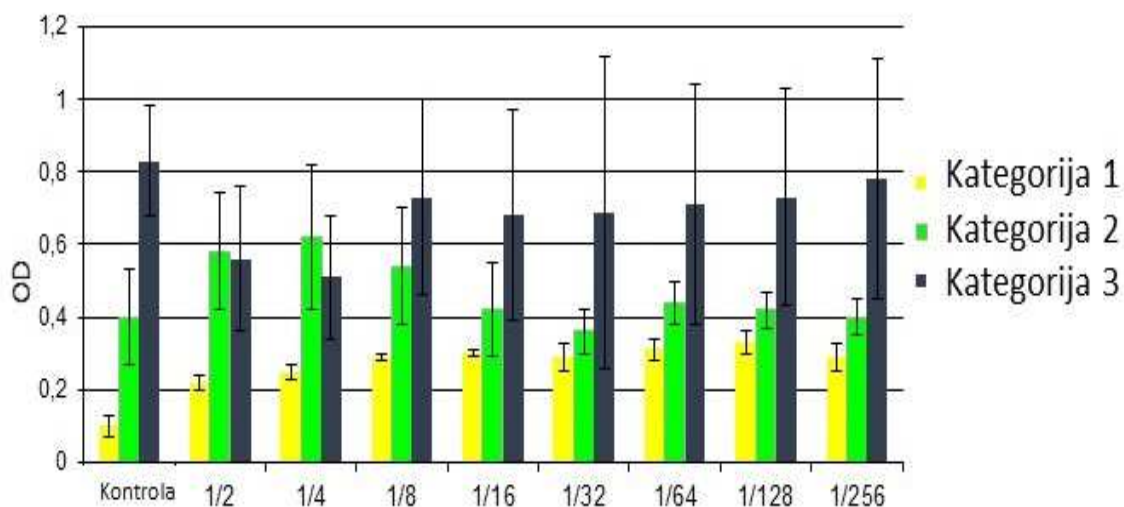
Uticaj liheniocina 50.2 na produkciju biofilma je ispitan u pet opadajućih koncentracija (12.5-0.75 AU/ml) kod 8 kliničkih izolata *Staphylococcus* spp. a rezultati su prikazani na Slici 11. Kultivacija sa 12.5 AU/ml liheniocina 50.2 je dovela do statistički značajnog smanjenja produkcije biofilma kod 5 od 9 izolata (55.6%) na sledeći način: dva izolata (22.2%) su smanjila produkciju biofilma sa izražene na malu, dva izolata (22.2%) sa izražene na umerenu i jedan izolat (11.1%) sa umerene na malu ($p < 0.05$). Dvostruko niža koncentracija liheniocina 50.2 (6.25 AU/ml) je takođe dovela do statistički značajnog smanjenja produkcije biofilma kod 5 od 9 izolata (55.6%) na sledeći način: dva izolata (22.2%) su smanjila produkciju biofilma sa izražene na malu, dva izolata (22.2%) sa izražene na umerenu i jedan izolat (11.1%) sa umerene na malu ($p < 0.05$). Kultivacija sa nižim koncentracijama liheniocina 50.2 je dovela do smanjenja kategorije produkcije biofilma kod 3 izolata (3.12 AU/ml), 2 izolata (1.5 AU/ml) i 2 izolata (0.75 AU/ml) bez statistički značajne razlike u produkciji biofilma u odnosu na pozitivnu kontrolu ($p > 0.05$).



Slika 11. Uticaj liheniocina 50.2 na produkciju biofilma stafilokoka. Efekat subinhibitornih koncentracija ($1/2 - 1/32 \times \text{MIC}$) liheniocina 50.2 na formiranje biofilma *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* and *S. lugdunensis*. Kategorija 2 – umerena produkcija biofilma, kategorija 3 – izražena produkcija biofilma

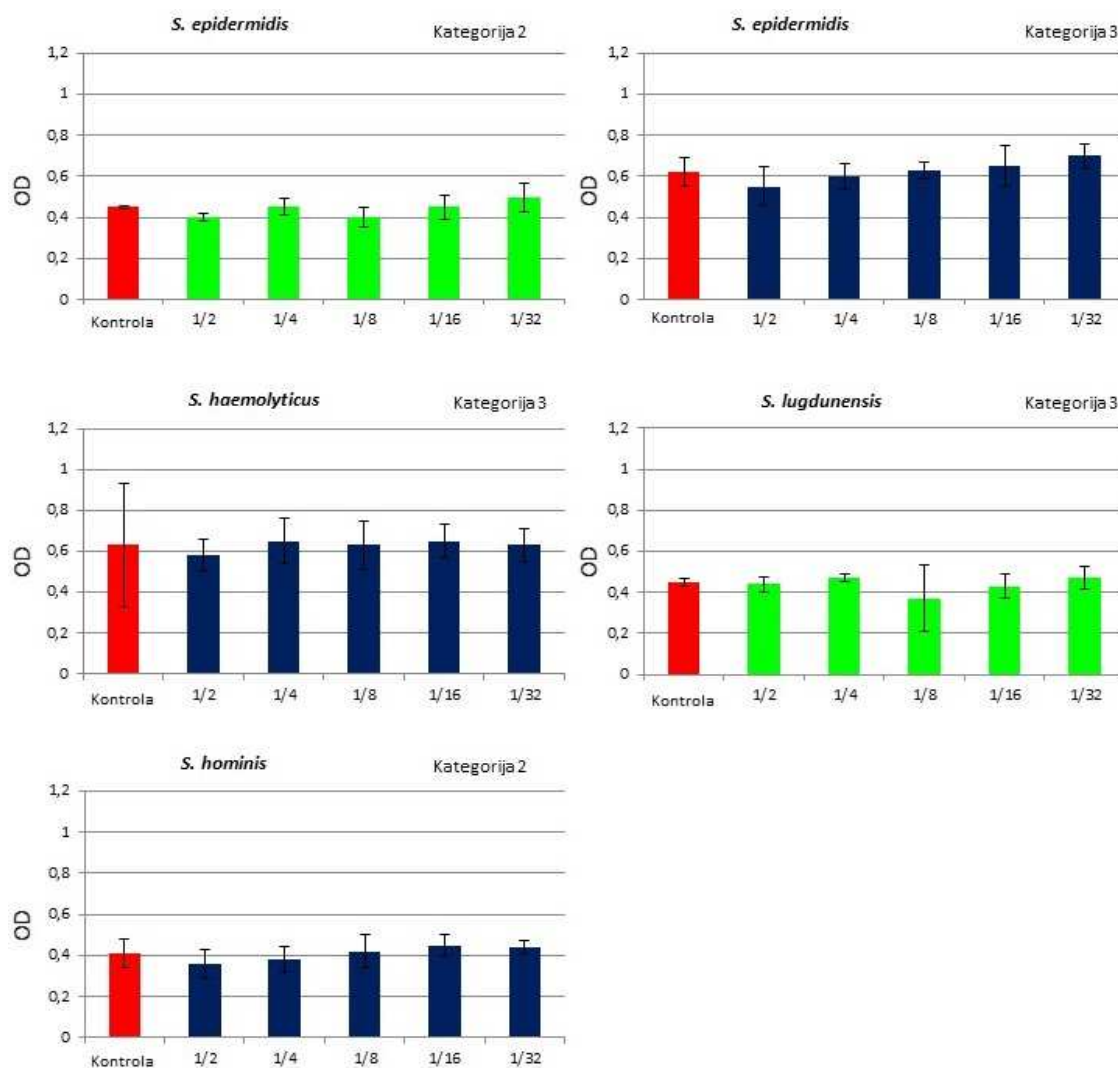
Rezultati testiranja uticaja liheniocina 50.2 na formiranje biofilma 12 kliničkih izolata *L. monocytogenes* i jednog referentnog soja prikazani su na Slici 12. Efekat je ispitivan u pet opadajućih koncentracija (25-1,5 AU/ml).

L. monocytogenes - liheniocin 50.2



Slika 12. Uticaj liheniocina 50.2 na produkciju biofilma *L. monocytogenes*. Efekat subinhibitornih koncentracija ($1/2 - 1/256 \times \text{MIC}$) liheniocina 50.2 na formiranje biofilma *L. monocytogenes*. Kategorija 1 – slaba produkcija biofilma, kategorija 2 – umerena produkcija biofilma, kategorija 3 – izražena produkcija biofilma

Uticaj ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 na formiranje biofilma izolata *Staphylococcus* spp. je ispitan kod osam kliničkih izolata *Staphylococcus* spp. koji su pripadali različitim vrstama koagulaza-negativnih stafilokoka (4 izolata *S. epidermidis*, dva izolata *S. hominis* i po 1 izolat *S. lugdunensis* i *S. haemolyticus*) i referentnom soju *S. epidermidis* ATCC 12228, u pet opadajućih koncentracija (25-1.5 AU/ml). Rezultati su prikazani na Slici 13.

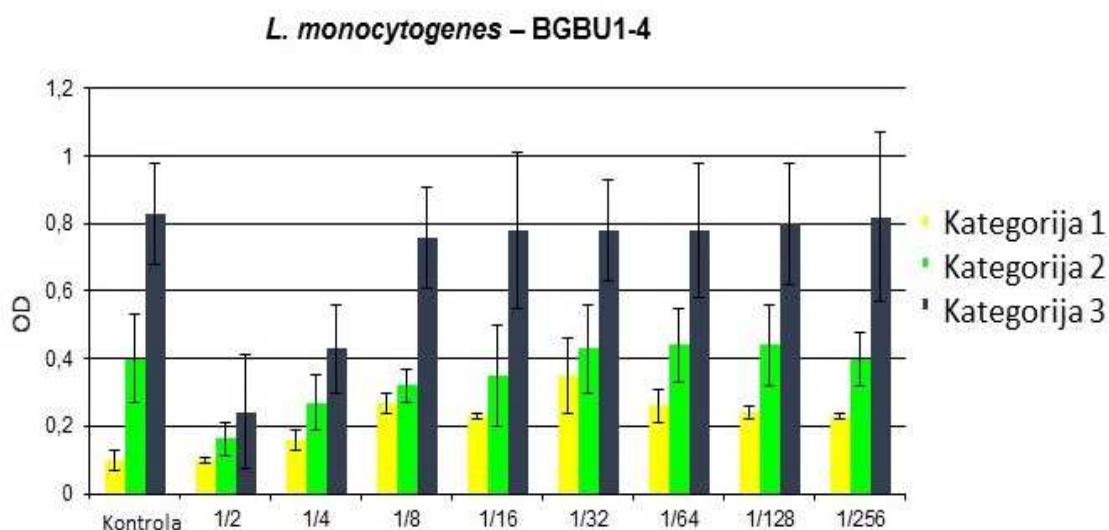


Slika 13. Uticaj ekstrakta soja BGBU1-4 na produkciju biofilma stafilokoka. Efekat subinhibitornih koncentracija ($1/2 - 1/32 \times \text{MIC}$) BGBU1-4 na formiranje biofilma *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* i *S. lugdunensis*. Kategorija 2 – umerena produkcija biofilma, kategorija 3 – izražena produkcija biofilma

Ekstrakt soja BGBU1-4 je ispitan u osam opadajućih koncentracija (6.25-0.03 AU/ml) kod 12 kliničkih izolata *L. monocytogenes* i referentnom soju *L. monocytogenes* ATCC 19111. Najbolji efekat na smanjenje produkcije biofilma se javio pri koncentracijama ekstrakta od 6,25 AU/ml i 3,12 AU/ml, pri kojima je su svi sojevi smanjili kategoriju produkcije biofilma (Slika 14).

Kultivacija sa 6,25 AU/ml ekstraktom soja BGBU1-4 je dovela do potpunog odsustva produkcije biofilma kod 6 sojeva (46.1%) koji su prethodno produkovali malu (7.7%),

umerenu (23.0%) ili izraženu količinu biofilma (15.4%). Šest sojeva (46.1%) koji su prethodno proizveli umerenu (7.7%) ili izraženu (38.4%) količinu biofilma je tokom kultivacije sa 6.25 AU/ml ekstrakta soja BGBU1-4 smanjilo produkciju biofilma na malu količinu biofilma, a kod jednog soja (7.7%) koji je proizveo izraženu količinu biofilma je došlo do smanjenja produkcije na umerenu količinu biofilma ($p < 0.01$).



Slika 14. Uticaj ekstrakta soja BGBU1-4 na produkciju biofilma *L. monocytogenes*. Efekat subinhibitornih koncentracija ($1/2 - 1/256 \times \text{MIC}$) BGBU1-4 na formiranje biofilma *L. monocytogenes*. Kategorija 1 – slaba produkcija biofilma, kategorija 2 – umerena produkcija biofilma, kategorija 3 – izražena produkcija biofilma

Dvostruko niža koncentracija ekstrakta soja BGBU1-4 (3.12 AU/ml) je takođe dovela do statistički značajnog smanjenja produkcije biofilma kod 9 od 13 izolata (69.2%) na sledeći način: 4 izolata (30.8%) su smanjila produkciju biofilma sa umerene na malu, tri izolata (23.1%) sa izražene na malu i dva izolata (15.3%) sa izražene na umerenu ($p < 0.05$). Kultivacija sa nižim koncentracijama ekstrakta soja BGBU1-4 je dovela do smanjenja kategorije produkcije biofilma kod 5 od 13 (38.4%) izolata (1.50 AU/ml), 3/13 (23.0%) izolata (0.75 AU/ml) i 1/13 (7.7%) izolata (0.31 AU/ml) bez statistički značajne razlike u produkciji biofilma u odnosu na pozitivnu kontrolu ($p > 0.05$). U prisustvu najnižih koncentracija ekstrakta soja BGBU1-4 (0.15-0.03 AU/ml), svi izolati *L. monocytogenes* su proizveli istu količinu biofilma kao i kontrolni sojevi.

4.12. Ispitivanje uticaja bakteriocina na već formiran biofilm

Uticaj liheniocina 50.2 na prethodno formiran biofilm je ispitan kod tri klinička izolata *Staphylococcus* spp. koji su pripadali različitim vrstama koagulaza-negativnih stafilokoka (*S. epidermidis*, *S. lugdunensis* i *S. hominis*), referentnom soju *S. epidermidis* ATCC 12228, tri klinička izolata *L. monocytogenes* i referentnom soju *L. monocytogenes* ATCC 19111. Liheniocin 50.2 je doveo do statistički značajnog smanjenja količine preformiranog biofilma u koncentracijama od 100 AU/ml ($p < 0.05$) i 50 AU/ml ($p < 0.01$) kod svih ispitanih izolata *Staphylococcus* spp. (Tabela 8).

Tabela 8. Uticaj liheniocina 50.2 na već formiran biofilm stafilokoka

Soj	Liheniocin 50.2 (AU/ml)		
	100 AU/ml	50 AU/ml	Kontrola
<i>S. epidermidis</i> 1	1*	1	2
<i>S. lugdunensis</i> 9	1	0	2
<i>S. hominis</i> 10	0	0	2
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1	0	3
Statistička značajnost	$p < 0.05$	$p < 0.01$	

* 0 – ne formira se biofilm; 1- slaba produkcija biofilma; 2 - umerena produkcija biofilma;

3 - izražena produkcija biofilma

Sličan efekat liheniocina 50.2 je uočen i na biofilm koji su prethodno formirali izolati *L. monocytogenes*, sa statistički značajnim smanjenjem količine biofilma nakon kultivacije sa 100 AU/ml ($p < 0.01$) i 50 AU/ml ($p < 0.001$) (Tabela 9).

Tabela 9. Uticaj liheniocina 50.2 na već formiran biofilm *L. monocytogenes*

<i>L. monocytogenes</i>	Liheniocin 50.2 (AU/ml)		
	100 AU/ml	50 AU/ml	kontrola
2	0*	0	2
3	0	0	1
4	1	0	3
ATCC 19111	0	0	2
Statistička značajnost	p<0.01	p<0.001	

* 0 – ne formira se biofilm; 1- slaba produkcija biofilma; 2 - umerena produkcija biofilma;

3 - izražena produkcija biofilma

Uticaj ekstrakta soja BGBU1-4 na prethodno formiran biofilm je ispitan kod osam kliničkih izolata *Staphylococcus* spp. koji su pripadali različitim vrstama koagulaza-negativnih stafilokoka (4 izolata *S. epidermidis*, dva soja *S. hominis* i po 1 soj *S. lugdunensis* i *S. haemolyticus*), referentnom soju *S. epidermidis* ATCC 12228, 13 kliničkih izolata *L. monocytogenes* i standardnom soju *L. monocytogenes* ATCC 19111. Ekstrakt soja BGBU1-4 je doveo do statistički značajnog smanjenja količine preformiranog biofilma u koncentracijama od 100 AU/ml i 50 AU/ml kod svih ispitanih izolata *Staphylococcus* spp. (Tabela 10).

Tabela 10. Uticaj ekstrakta soja BGBU1-4 na već formirani biofilm stafilokoka

Soj	Ekstrakt soja BGBU1-4 (AU/ml)		
	100 AU/ml	50 AU/ml	kontrola
<i>S. epidermidis</i> 1	0*	1	2
<i>S. lugdunensis</i> 9	1	0	2
<i>S. hominis</i> 10	0	0	2
<i>S. haemolyticus</i> 16	1	0	3
<i>S. epidermidis</i> 18	0	2	3
<i>S. epidermidis</i> 20	0	0	2
<i>S. epidermidis</i> 24	0	0	3
<i>S. hominis</i> 27	0	1	3
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1	1	3
Statistička značajnost	p<0.01	p<0.01	

* 0 – ne formira se biofilm; 1- slaba produkcija biofilma; 2 - umerena produkcija biofilma;

3 - izražena produkcija biofilma

U prisustvu 100 AU/ml ekstrakta soja BGBU1-4, od 9 izolata koji su prethodno produkovali umerenu (44.4%) ili izraženu količinu biofilma (55.5%), došlo je do potpune razgradnje prethodno formiranog biofilma kod 6 izolata (66.7%), dok se kod ostala tri soja količina biofilma smanjila sa umerene na malu (11.1% sojeva) ili sa izražene na malu (22.2% sojeva) ($p < 0.01$).

Niža koncentracija ekstrakta soja BGBU1-4 (50 AU/ml) je dovela do potpune razgradnje biofilma kod 5 izolata (55.5%) koji su prethodno produkovali umerenu (33.3% sojeva) ili izraženu količinu biofilma (22.2% izolata). Kod ostalih izolata je došlo do smanjenja količine biofilma sa umerene na malu (11.1%) i izražene na umerenu (11.1%) i malu količinu biofilma (22.2%) ($p < 0.01$). Sličan efekat ekstrakta soja BGBU1-4 je uočen i na biofilm koji su prethodno formirali izolati *L. monocytogenes*, sa statistički značajnim smanjenjem količine biofilma nakon kultivacije sa 100 AU/ml i 50 AU/ml (Tabela 11).

Tabela 11. Uticaj ekstrakta soja BGBU1-4 na već formirani biofilm *L. monocytogenes*

<i>L. monocytogenes</i> izolat	Ekstrakt soja BGBU1-4 (AU/ml)		
	100 AU/ml	50 AU/ml	kontrola
2	0*	0	2
3	0	0	1
4	1	1	3
5	0	0	3
9	0	0	2
10	1	0	2
11	0	1	2
14	0	1	3
16	0	2	3
17	1	2	3
18	1	1	3
19	0	1	3
20	0	2	3
ATCC 19111	0	1	2
Statistička značajnost	$p < 0.001$	$p < 0.01$	

* 0 – ne formira se biofilm; 1- slaba produkcija biofilma; 2 - umerena produkcija biofilma;

3 - izražena produkcija biofilma

U prisustvu 100 AU/ml ekstrakta soja BGBU1-4 kod 10 od 14 izolata (71.4%) je uočena potpuna razgradnja prethodno formiranog biofilma (1 izolat koji je prethodno produkovao malu količinu biofilma, 4 izolata koja su imala umerenu produkciju biofilma i 5 izolata koji su imali izraženu produkciju biofilma). Kod preostala 4 izolata (28.5%) došlo je do smanjenja količine produkovanog biofilma sa umerene na malu (7.1%) i izražene na malu (21.4%) ($p < 0.001$).

U prisustvu 50 AU/ml ekstrakta soja BGBU1-4 je uočena potpuna razgradnja prethodno formiranog biofilma kod 5 izolata (35.7%) koji su prethodno produkovali malu (7.1%) umerenu (21.4%) ili izraženu količinu biofilma (7.1%). Kod 6 izolata (42.8%) je uočeno smanjenje količine biofilma sa umerene (14.2%) ili izražene (28.6%) na malu, dok je kod 3 izolata (21.4%) koja su prethodno produkovala izraženu količinu biofilma došlo do smanjenja količine biofilma na umerenu ($p < 0.01$).

4.13. Ispitivanje efekta kombinovane primene bakteriocina liheniocina 50.2, ekstrakta soja BGBU1-4 i antibiotika na rast izabranih izolata

Ispitivanje efekta kombinacije bakteriocina sa antibioticima je izvršeno na tri odabrana izolata kojima su prethodno utvrđene najniže MIC vrednosti za bakteriocine. Ispitivanje je izvršeno sa dva antibiotika koji imaju različite mehanizme delovanja: β -laktamskim antibiotikom - ampicilinom (AMP) i aminoglikozidom - gentamicinom (GEN). Izvršeno je ispitivanje i antibakterijskog efekta kombinacije dva bakteriocina. Određene su vrednosti MIC za antibiotike koje su bile u opsegu od 0,038-1,0 $\mu\text{g/ml}$ (AMP) i 0,125-12,50 $\mu\text{g/ml}$ (GEN). Minimalne infibitorne aktivnosti bakteriocina su iznosile: 0,75-3,20 AU/ml za liheniocin 50.2 i 0,38-6,25 AU/ml za BGBU1-4.

Efekat dobijen kombinacijom bakteriocina sa antibioticima ide od sinergizma ($\text{FICI} \leq 0.5$) do antagonizma ($\text{FICI} \geq 2$). Najznačajniji sinergizam utvrđen je u kombinaciji liheniocina 50.2 sa gentamicinom kod *S. epidermidis* ATCC 12228 ($\text{FICI} = 0,015-0,023$) (Tabela 12). Sinergizam je ostvaren i u kombinaciji liheniocina 50.2 sa gentamicinom za klinički izolate *S. hominis* ($\text{FICI} = 0,017-0,063$) i *S. epidermidis* ($\text{FICI} = 0,030-0,038$) kao i za *S. epidermidis* ATCC ($\text{FICI} = 0,015-0,023$) (Tabela 12).

Tabela 12. Efekat kombinacije liheniocina 50.2 i gentamicina

Broj iz kolekcije	Vrsta	Liheniocin 50.2/GEN		FICI	Vrsta interakcije
		MIC			
10	<i>S. hominis</i>	3,120	1,000	0,070	sin
10	<i>S. hominis</i>	3,120	0,500	0,066	sin
10	<i>S. hominis</i>	3,120	0,250	0,064	sin
10	<i>S. hominis</i>	3,120	0,125	0,063	sin
10	<i>S. hominis</i>	3,120	0,075	0,063	sin
10	<i>S. hominis</i>	3,120	0,038	0,063	sin
24	<i>S. epidermidis</i>	0,750	1,000	0,038	sin
24	<i>S. epidermidis</i>	0,750	0,500	0,034	sin
24	<i>S. epidermidis</i>	0,750	0,250	0,032	sin
24	<i>S. epidermidis</i>	0,750	0,125	0,031	sin
24	<i>S. epidermidis</i>	0,750	0,075	0,031	sin
24	<i>S. epidermidis</i>	0,750	0,038	0,030	sin
ATCC [§]	<i>S. epidermidis</i>	0,750	1,000	0,023	sin
ATCC [§]	<i>S. epidermidis</i>	0,750	0,500	0,019	sin
ATCC [§]	<i>S. epidermidis</i>	0,750	0,250	0,017	sin
ATCC [§]	<i>S. epidermidis</i>	0,750	0,125	0,016	sin
ATCC [§]	<i>S. epidermidis</i>	0,750	0,075	0,016	sin
ATCC [§]	<i>S. epidermidis</i>	0,750	0,038	0,015	sin

*FICI \leq 0.5 sinergizam (sin), $0.5 < \text{FICI} \leq 1$ aditivnost (adi) i $1 < \text{FICI} \leq 2$ indiferentan efekat (ind), FICI ≥ 2 antagonizam (ant). MIC vrednosti su izražene u AU/ml i $\mu\text{g/ml}$. [§] ATCC12228.

Značajan sinergizam utvrđen je i u kombinaciji ekstrakta soja BGBU1-4 sa gentamicinom za klinički izolat *S. epidermidis* 24 (FICI=0,039-0,129) (Tabela 13).

Tabela 13. Efekat kombinacije ekstrakta soja BGBU1-4 i gentamicina

Broj iz kolekcije	Vrsta	BGBU1-4/GEN		FICI	Vrsta interakcije
		MIC			
10	<i>S. hominis</i>	>4	12,500	/	
24	<i>S. epidermidis</i>	1,560	1,000	0,039	sin
24	<i>S. epidermidis</i>	6,250	0,500	0,129	sin
ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i>	>4	12,500	/	

*FICI \leq 0.5 sinergizam (sin), $0.5 < \text{FICI} \leq 1$ aditivnost (adi) i $1 < \text{FICI} \leq 2$ indiferentan efekat (ind), FICI ≥ 2 antagonizam (ant). MIC vrednosti su izražene u AU/ml i $\mu\text{g/ml}$.

Sinergizam je ostvaren i u kombinaciji liheniocina 50.2 i ampicilina za kliničke izolate *L. monocytogenes* 18 sa FICI vrednostima od 0,106-0,330 i za *L. monocytogenes* ATCC 19111 sa FICI=0,053-0,265 (Tabela 14).

Tabela 14. Efekat kombinacije liheniocina 50.2 i ampicilina

Broj iz kolekcije	Vrsta	liheniocin 50.2/AMP		FICI	Vrsta interakcije
		MIC			
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	1,000	4,030	ant
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,500	2,030	ant
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,250	1,030	ind
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,125	0,530	adi
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,075	0,330	sin
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,038	0,182	sin
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	1,000	2,030	ind
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,500	1,030	ind
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,250	0,530	adi
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,125	0,280	sin
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,075	0,180	sin
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,038	0,106	sin
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	1,000	1,015	ind
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,500	0,515	adi
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,250	0,265	sin
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,125	0,140	sin
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,075	0,090	sin
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,038	0,053	sin

*FICI \leq 0.5 sinergizam (sin), $0.5 < \text{FICI} \leq 1$ aditivnost (adi) i $1 < \text{FICI} \leq 2$ indiferentan efekat (ind), FICI ≥ 2 antagonizam (ant). MIC vrednosti su izražene u AU/ml i $\mu\text{g/ml}$, [§] ATCC19111.

Sinergizam je ostvaren i u kombinaciji ekstrakta soja BGBU1-4 i ampicilina kod kliničkog izolata *L. monocytogenes* 4 (FICI=0,420), izolata *L. monocytogenes* 18 (FICI=0,311) i *L. monocytogenes* ATCC 19111 (FICI=0,372) (Tabela 15).

Tabela 15. Efekat kombinacije ekstrakta soja BGBU1-4 i ampicilina

Broj iz kolekcije	Vrsta	BGBU1-4/AMP		FICI	Vrsta interakcije
		MIC			
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	1,000	4,061	ant
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	0,500	2,061	ant
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	0,250	1,061	ind
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	0,125	0,561	adi
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,75	0,075	0,420	sin
4	<i>L. monocytogenes</i>	3,12	0,038	0,651	adi
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	1,000	2,061	ant
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	0,500	1,061	ind
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	0,250	0,561	adi
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	0,125	0,311	sin
18	<i>L. monocytogenes</i>	3,12	0,075	0,649	adi
18	<i>L. monocytogenes</i>	3,12	0,038	0,575	adi
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	1,000	1,122	ind
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	0,500	0,622	adi
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	0,38	0,250	0,372	sin
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	1,56	0,125	0,625	adi
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	3,12	0,075	1,075	ind
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	3,12	0,038	1,038	ind

*FICI ≤ 0.5 sinergizam (sin), 0.5 < FICI ≤ 1 aditivnost (adi) i 1 < FICI ≤ 2 indiferentan efekat (ind), FICI ≥ 2 antagonizam (ant). MIC vrednosti su izražene u AU/ml i µg/ml, § ATCC19111.

U Tabeli 16. prikazan je antibakterijski efekat kombinacije liheniocina 50.2 i ekstrakta soja BGBU1-4 na kliničke izolate stafilokoka i *L. monocytogenes*.

Tabela 16. Efekat kombinacije liheniocina 50.2 i ekstrakta soja BGBU1-4 na kliničke izolate stafilokoka i *L. monocytogenes*

Broj iz kolekcije	Vrsta	Liheniocin 50.2/ ekstrakta soja BGBU1-4		FICI	eff
		MIC			
10	<i>S. hominis</i>	25,000	0,750	0,515	adi
10	<i>S. hominis</i>	12,500	0,750	0,265	sin
10	<i>S. hominis</i>	6,250	0,750	0,140	sin
10	<i>S. hominis</i>	3,120	0,750	0,077	sin
24	<i>S. epidermidis</i>	25,000	0,750	1,015	ind
24	<i>S. epidermidis</i>	12,500	0,750	0,515	adi
24	<i>S. epidermidis</i>	6,250	0,750	0,265	sin
24	<i>S. epidermidis</i>	3,120	0,750	0,140	sin
24	<i>S. epidermidis</i>	1,560	0,750	0,077	sin
ATCC ^x	<i>S. epidermidis</i>	25,000	0,750	0,515	adi
ATCC ^x	<i>S. epidermidis</i>	12,500	0,750	0,265	sin
ATCC ^x	<i>S. epidermidis</i>	6,250	0,750	0,140	sin
ATCC ^x	<i>S. epidermidis</i>	3,120	0,750	0,077	sin
ATCC ^x	<i>S. epidermidis</i>	1,560	0,750	0,046	sin
4	<i>L. monocytogenes</i>	25,000	0,750	1,120	ind
4	<i>L. monocytogenes</i>	12,500	0,750	0,620	adi
4	<i>L. monocytogenes</i>	6,250	0,750	0,370	sin
4	<i>L. monocytogenes</i>	3,120	0,750	0,245	sin
4	<i>L. monocytogenes</i>	1,560	0,750	0,182	sin
4	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,750	0,150	sin
18	<i>L. monocytogenes</i>	25,000	0,750	1,240	ind
18	<i>L. monocytogenes</i>	12,500	0,750	0,740	adi
18	<i>L. monocytogenes</i>	6,250	0,750	0,490	sin
18	<i>L. monocytogenes</i>	3,120	0,750	0,365	sin
18	<i>L. monocytogenes</i>	1,560	0,750	0,303	sin
18	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,750	0,270	sin
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	25,000	0,750	0,740	adi
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	12,500	0,750	0,490	sin
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	6,250	0,750	0,365	sin
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	3,120	0,750	0,303	sin
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	1,560	0,750	0,272	sin
ATCC [§]	<i>L. monocytogenes</i>	0,750	0,750	0,255	sin

*FICI ≤ 0.5 sinergizam (sin), 0.5 < FICI ≤ 1 aditivnost (adi) i 1 < FICI ≤ 2 indiferentan efekat (ind), FICI ≥ 2 antagonizam (ant). MIC vrednosti su izražene u AU/ml, ^x ATCC12228, [§] ATCC19111.

Najznačajniji efekat kombinovane primene bakteriocina liheniocina 50.2 i ekstrakta soja BGBU1-4 je uočen kod kliničkog izolata *S. hominis* sa FICI vrednostima od 0,077-0,265. Međutim, sinergizam je uočen i u sledećim slučajevima: *S. epidermidis* sa FICI vrednostima od 0,077 – 0,144; *S. epidermidis* ATCC12228 sa FICI vrednostima od 0,046 – 0,265; *L. monocytogenes* 4 sa FICI vrednostima od 0,150 – 0,370; *L. monocytogenes* 18 sa FICI vrednostima od 0,270 - 0,490; *L. monocytogenes* ATCC19111 sa FICI vrednostima od 0,255 – 0,490.

5. DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

Predmet istraživanja u ovom radu bila je kolekcija bakterija izolovanih iz različitih sredina i sa različitih lokaliteta iz Srbije. Preliminarna identifikacija izolata *Bacillus* spp. iz sena i slame, zemljišta i stajskog đubriva urađena je klasičnim metodama mikrobiologije (Stanković, 2003). Ova kolekcija je potom okarakterisana analizom RAPD profila, kao i sekvenciranjem dela gena za 16S rRNK odabranih predstavnika grupa (Berić i sar., 2009). Ova analiza je pokazala značajan genetički diverzitet. Svi izolati su klasifikovani u 13 različitih RAPD grupa sa 6 podgrupa. Detaljnijom analizom dela gena za 16S rRNK i kombinovanjem ovih metoda određen je genetički diverzitet celokupne kolekcije. Na ovaj način svi izolati su svrstani u 5 vrsta roda *Bacillus*. Čak 110 izolata je determinisano kao *B. subtilis*. Naravno, kako i vrste *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. sonorensis*, *B. mojavensis*, *B. valismortis* i *B. anthropaeus* pripadaju subtilis grupi *sensu lato* ako ih karakterišemo samo 16S rRNK genom (Asch i sar., 1991), jasno je da je diverzitet u ovom slučaju značajno podcenjen. S druge strane, 34 izolata su determinisana kao *B. pumilus*, vrsta koja takođe pripada subtilis grupi ali za koju je RAPD analiza pokazala moć razdvajanja od ostalih subtilis vrsta (Berić i sar., 2009). *B. cereus* grupa, kojoj pripadaju i vrste *B. thuringiensis*, *B. mycoides* i *B. anthracis* je obuhvatila 60 izolata iz ove kolekcije. Prema RAPD profilima ovih 60 izolata je pokazalo značajan diverzitet predstavljen sa 5 različitih grupa profila. Kako su vrste *B. cereus* i *B. thuringiensis* identične (Carlson i sar., 1994) te se ne mogu razdvojiti analiziranjem 16S rRNK u ovoj studiji su predstavljene kao jedna grupa (Berić i sar., 2009).

Dakle, u istraživanju koja su prethodila ovom, diverzitet kolekcije izolata *Bacillus* spp. je grubo određen korišćenjem jedne od „fingerprint” metoda (RAPD) u kombinaciji sa sekvenciranjem dela gena za 16S rRNK. U pokušaju da se detaljnije okarakterišu filogenetska raznovrsnost kolekcije u ovoj studiji ona je analizirana upotrebom takođe „fingerprint” metode, ali mnogo finije rezolucije, PFGE analize kombinujući je ovaj put sa sekvenciranjem *tuf* gena odabranih izolata. Dendrogram jasno pokazuje filogenetske odnose svih ispitivanih izolata *Bacillus* spp. kao i referentnih sojeva. Pokazano je veoma jasno i nedvosmisleno grupisanje izolata, osim u nekoliko izuzetaka od kojih je posebno značajan taj što se referentni soj *B. subtilis* Marburg nije grupisao zajedno sa drugim

referentnim sojevima iz subtilis grupe (kao npr. *B. subtilis* ATCC 6633), koji su opet dali slične profile te su tako se grupisali blisko na dendrogramu. Sojevi iz cereus grupe su grupisani blisko i posebno su se izdvojili.

Analiza sekvenci *tuf* gena odabranih predstavnika dala je posebno zadovoljavajuće rezultate u razdvajanju *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* izolata kao i *B. thuringiensis* i *B. cereus* u posebne klade na filogenetskom stablu. Iako su izolati označeni kao *B. cereus*, *B. thuringiensis* i *B. anthracis* grupisali zajedno, cereus i thuringiensis grupa su definitivno razdvojene sekvenciranjem *tuf* gena što je teško postići na osnovu sekvence 16S rRNK gena. U ovom istraživanju uspeali smo da izdvojimo i izolate identifikovane kao *B. pumilus* i *B. safensis*, vrste koje su inače klasifikovane u okviru subtilis grupe, ali su se u ovom istraživanju odvojile od subtilis grupe u posebnu kladu.

PFGE profil grupe I izolata, predstavljen sa SS-9.1 (*B. megaterium*) je odvojen i blisko ukotvljen sa grupom II, koja je predstavljena izolatima identifikovanim kao *B. thuringiensis*. Slično se može primetiti da grana *B. megaterium*, na filogenetskom stablu konstruisanom na osnovu sekvenci *tuf* gena, je bliska grani cereus/thuringiensis/anthracis izolata. Dakle i u ovom slučaju, rezultati dobijeni PFGE analizom podržavaju one dobijene analizom sekvenci gena. Samo za PFGE grupe III i XIII, sa izolatima identifikovanim kao *B. pumilus* (SS-5.4 i SS-22.1), nema grupisanje sa subtilis grupom, što je bilo očekivano. Isto tako, PFGE grupa XXI, koja obuhvata sedam izolata predstavljenim sa SS-32.5, identifikovanim kao *B. anthracis*, ne pokazuje vezu sa PFGE grupama identifikovanim kao *B. cereus* i *B. thuringiensis*. Nakon analize rezultata PFGE profilisanja i poređenjem sa rezultatima dobijenim analizom sekvenci *tuf* gena možemo zaključiti sledeće: iako ne postoji velika preciznost u identifikaciji i razdvajanju između *Bacillus* grupa, grupe profila su dovoljno precizne da podrže generalnu podelu u okviru subtilis grupe i donekle u okviru cereus grupe. Kako je već zaključila Otlewska i sar. (2013), PFGE analiza se može koristiti za diverzifikaciju sojeva, ali nije pogodna za taksonomsko grupisanje blisko srodnih sojeva *B. cereus* i *B. thuringiensis*. Međutim u našoj studiji iako se *B. thuringiensis* profili izolata SS-9.4 i SS-23.4 grupišu zajedno sa *B. cereus*, tri grupe izolata (XII, XIV i XV) identifikovane kao *B. thuringiensis* formiraju posebnu kladu ukotvljenu daleko od prethodno pomenute. Tražeći korelaciju između PFGE profila i sredine i lokacije izolovanja samih sojeva nije pronađena veza. To samo ukazuje na ogroman genetički diverzitet *Bacillus* izolata u bilo kom okruženju. To je,

svakako, i očekivani rezultat s obzirom da se u brojnim istraživanjima koja su uključivala molekularne metode profilisanja u okviru vrsta iz roda *Bacillus* pokazano da je polimorfizam veoma veliki i samo u okviru pojedinačnih vrsta (grupa) *B. cereus*, npr. (Bartoszewicz i sar., 2008) ili *B. pumilus* (Branquinho i sar., 2014).

Na osnovu iznetog može se reći da PFGE može biti metoda izbora za inicijalnu genotipizaciju bakterija iz roda *Bacillus*, ali ne daje detaljniji niti precizniji uvid u identifikaciju nego što to čini primena RAPD metode. Ako se uzme u obzir i neefikasan i vremenski zahtevan protokol koji se primenjuje u pripremi uzoraka za PFGE analizu, jačina argumenata je na strani RAPD analize. Međutim, kada se PFGE analiza upari sa sekvenciranjem *tuf* gena, dobija se bolja karakterizacija kolekcije nego RAPD analiza kombinovana sa sekvencom gena za 16S rRNK. Od 5 identifikovanih vrsta u slučaju RAPD/16S rRNK došli smo do 8 vrsta kada koristimo kombinaciju PFGE/*tuf*. To može biti preporuka za korišćenje kombinacije PFGE/*tuf* za karakterizaciju velikih kolekcija izolata *Bacillus* spp. Tome u prilog ide i činjenica da su Kaminska i sar. (2015) razvili PFGE protokol koji omogućava pripremu i razdvajanje uzoraka za manje od 48h što bi moglo da poveća efikasnost i daje bolju preporuku za brz skrining izolata.

Svakako treba naglasiti, da bez obzira što su i PFGE profilisanje i određivanje sekvence *tuf* gena metode koje su u širokoj upotrebi, nezavisno jedna od druge; po našim saznanjima, ovo je prvi put da su metode korišćene u kombinaciji da bi se identifikovali izolati *Bacillus* spp.

Pošto u zadnje vreme metode sekvenciranja polako potiskuju metode profilisanja, na osnovu naših rezultata, a ako je sekvenciranje gena metoda izbora za identifikaciju, određivanje sekvence gena za elongacioni faktor Tu sa specifičnim prajmerima koje su dizajnirali Caamano-Antelo i sar. (2015) se pokazalo kao adekvatna i dovoljna analiza za dobijanje vrlo jasnih i nedvosmislenih rezultata, sa visokom rezolucijom za razdvajanje vrsta u okviru roda *Bacillus*.

Preliminarna identifikacija izolata *Bacillus* sp. VPS50.2, koji je od posebnog interesa za ovo istraživanje zato što je jedini u kolekciji *Bacillus* spp. koji proizvodi antimikrobno jedinjenje tipa bakteriocina, izvršena na osnovu RAPD profila kombinovanog sa sekvenciranjem dela gena za 16S rRNK, pokazala je da je u pitanju *B. subtilis*, odnosno da pripada *subtilis* grupi *sensu lato* (Berić i sar, 2009). Ovaj izolat je na osnovu sekvence celog gena za 16S rRNK identifikovan kao *B. licheniformis* (Berić,

2010). U ovom radu, koji je za cilj imao precizniju identifikaciju čitave kolekcije, analizom PFGE profila i sekvenciranjem gena za elongacioni faktor Tu, dobijena je nešto drugačija filogenetska slika izolata VPS50.2. Na osnovu PFGE profila svrstan je u grupu XVII koja ima ishodnu granu zajedno sa grupom XVI koju predstavljaju izolati vrste *B. subtilis sensu stricto*, što je donekle u saglasnosti sa prethodnim rezultatima. Međutim, analizom sekvence *tuf* gena pokazana je visoka srodnost izolata VPS50.2 sa vrstom *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, a ne sa *B. licheniformis*. Ono što je začuđujuće je, da ni jedan izabrani predstavnik izolata ne pokazuje dovoljno visoku sličnost, tj., nije identifikovan kao *B. licheniformis*. Dakle, pripadnost subtilis grupi nije dovedena u pitanje, ali za precizan odgovor koja je vrsta/podvrsta u pitanju, morala bi da se uradi sekvenca još nekog od ključnih gena, npr. *gyrB* gen koji kodira sekvencu za subjedinicu B proteina žiraze, DNK topomeraze tipa II, koji igra ključnu ulogu u DNK replikaciji i distribuiran je uniformno među bakterijskim vrstama (Huang, 1996). Wang i saradnici (2007) su pokazali da *gyrB* gen može biti informativan za identifikaciju članova *B. subtilis* grupe.

Sposobnost produkcije antimikrobnih peptida je široko rasprostranjena među Gram-pozitivnim bakterijama. Bakteriocini su mali, hidrofobni, ribozomalno sintetisani proteini. Analiza produkcije bakteriocina u celoj kolekciji *Bacillus* spp. je pokazala da samo soj *B. licheniformis* VPS50.2 proizvodi bakteriocin. Proteinsku prirodu ovog bakteriocina potvrđuje srpasta zona inhibicije na osetljivom soju *B. licheniformis* 168, a SDS-PAGE analizom je utvrđeno da mu je molekulska masa 3,25 kDa (Berić, 2010). N-terminalno sekvenciranje izolovanog proteina je potvrdilo da se radi o novom do sada neokarakterisanom bakteriocinu koji je nazvan liheniocin 50.2 (Berić i sar, 2014).

Utvrdeno je da se najbolja produkcija liheniocina postiže u LB medijumu, inkubacijom na 37°C uz aeraciju, da zavisi od faze rasta i počinje tranzicijom iz eksponencijalne u stacionarnu fazu, polako dostiže maksimum aktivnosti u kasnoj stacionarnoj fazi rasta i zadržava taj nivo (Berić i sar., 2014). To je osobina po kojoj se ovaj bakteriocin razlikuje od većine ranije opisanih (Martirani i sar, 2002; Cladera-Olivera i sar, 2004; He i sar, 2006), kod kojih se aktivnost uočava sredinom eksponencijalne faze a dostiže svoj maksimum na početku stacionarne faze. Krivu produkcije sličnu liheniocinu 50.2, gde aktivnost počinje na kraju eksponencijalne faze i koincidira sa sporulacijom, pokazuje bakteriocin koji su opisali Korenblum i sar. (2005).

Uočena je i pozitivna korelacija između broja spora i bakteriocinske aktivnosti. Moglo bi se čak reći da je verovatno proizvodnja bakteriocina posledica započinjanja sporulacionog procesa ili su pak, u njegovu biosintezu uključeni neki drugi regulatorni putevi, kao što je slučaj za neka druga antimikrobna jedinjenja (Leifert i sar. 1995; Zheng i sar. 1999). Korelaciju između antibiotske aktivnosti i sporulacije uočili su Usta i Demirkan (2013) istražujući aktivnost antimikrobnog jedinjenja koje proizvodi soj *Bacillus* sp. EA62 koje je pokazalo najveću inhibiciju rasta nakon 72 časa gajenja producentskog soja i to Gram-negativne *Shigella sonnei*.

Biohemijska karakterizacija liheniocina 50.2 je pokazala da je u pitanju termostabilan molekul, aktivan u širokom pH opsegu, osetljiv na delovanje proteolitičkih enzima. Na osnovu navedenih osobina i male molekulske mase (3,25 kDa) liheniocin 50.2 bi se mogao klasifikovati kao Klasa II bakteriocina koje proizvode bakterije roda *Bacillus* koji uključuju male (0,77-10 kDa), ribozomalno sintetisane, linearne i nemodifikovane proteine, koji su otporni na visoku temperature i aktivnost obavljaju na nivou membrane (Abriouel i sar, 2010; Zhao i Kuipers, 2016). Podklasa II.3, koju predstavljaju lihenin koji proizvodi *B. licheniformis* 26L-10/3RA (Pattnaik i sar. 2001), cerein 7A (Oscariz i Pisabarro, 2000) i 7B (Oscariz i sar. 2006) koje proizvodi *B. cereus* Bc7 kao i turicin 439 koji proizvodi *B. thuringiensis* B439 (Ahern i sar., 2003), uključuje linearne peptide. Lihenin je mali molekul (oko 1,5 kDa) koji se proizvodi pod anaerobnim uslovima, hidrofoban je, osetljiv na kiseonik, stabilan na visokim temperaturama i u širokom rasponu pH. Cerein 7A ima molekulska masu vrlo sličnu liheniocinu 50.2 (3,94 kDa) kao i spektar delovanja (inhibira samo Gram-pozitivne bakterije). Turicin grade 2 termo- i pH- stabilna aktivna peptide (A i B) sa sličnim molekulskim masama (oko 2,9 kDa) i uskim spektrom aktivnosti protiv *B. cereus*, *B. thuringiensis* i *Listeria innocua*. Na osnovu iznetog smatramo da je liheniocin 50.2 novi bakteriocin koji verovatno pripada podklasi II.3.

Pošto se bakteriocini bakterija mlečne kiseline koriste i kao konzervansi u industriji hrane (Ramu i sar., 2015), a kako smo odredili da liheniocin 50.2 poseduje biohemijske osobine koje su poželjne u tom slučaju (stabilnost u širokom rasponu pH vrednosti i temperature; kao i širok antimikrobni spektar), u cilju testiranja njegovih konzervansnih osobina, *L. monocytogenes* je izabrana kao predstavnik patogena koji može biti prenet hranom. Naime, pokazano je da je *L. monocytogenes* uključena u

izbijanje bolesti usled konzumacije povrća i mlečnih proizvoda kontaminiranih ovom bakterijom (Jemmi i Stephan, 2006). I ranije su bakteriocini korišćeni kako bi se inhibirala *L. monocytogenes* (O'Sullivan i sar. 2002). Međutim, isto tako, pokazano je da sojevi *L. monocytogenes* mogu biti rezistentni na bakteriocine koji su konvencionalno u upotrebi, kao što su nizin i pediocin (Macwana i Muriana, 2012). Zbog toga je potraga za novim, aktivnim bakteriocinima potrebna i opravdana. Sirovi ekstrakt liheniocina 50.2 je pri koncentracijama od 2× i 4× MIC pokazao značajnu baktericidnu aktivnost protiv *L. monocytogenes* već u prvom času aplikacije. Taj rezultat, kao i već opisane osobine liheniocina 50.2 preporučuju ga kao kandidata za biokonzervans za kontrolu patogenih mikroorganizama, kao i onih koji izazivaju propadanje hrane. Naravno, dodatna istraživanja u smislu njegove bezbednosti za ljudsku upotrebu bi morala da se urade.

Pored aktivnosti protiv *L. monocytogenes*, liheniocin 50.2 ispoljava inhibiciju rasta većeg broja bakterija, uključujući i meticilin-rezistentne *S. aureus* i β-hemolitičke streptokoke. Prema ovim rezultatima, antimikrobni spektar je ograničen na Gram-pozitivne bakterije dok inhibitorna aktivnost prema gljivama nije registrovana.

Istraživanja bazirana na potencijalnoj primeni bakteriocina u medicini su u konstantnom porastu. Do sada su zabeležena neka istraživanja potencijalne genitalne aplikacije bakteriocina (Borges i sar., 2013). Kao što je već naglašeno, KNS kao i *L. monocytogenes* su česti uzročnici upala urogenitalnog trakta žena i muškaraca koje mogu imati značajne posledice po zdravlje i plodnost (Ivanov, 2007, Tansarli i sar., 2013). S druge strane, primena bakteriocina aktivnih u širokom pH opsegu može biti važna za tretman infekcija kao i za održavanje urogenitalnog zdravlja. Da bismo ispitali potencijalnu upotrebu liheniocina 50.2 kao terapijskog agensa za lečenje infekcija izazvanih KNS i *L. monocytogenes* testirana je kolekcija od dvadeset izolata *L. monocytogenes* iz vaginalnih briseva pacijentkinja i kolekcija osam izolata *Staphylococcus* spp., koji su identifikovani kao koagulaza-negativne stafilokoke iz uretralnih briseva. U ovoj fazi, u istraživanje je bio uključen i sirovi ekstrakt bakteriocina koje proizvodi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4. Naime, pokazano je da receptor na ćelijama koji prepoznaje liheniocin 50.2 je man-PTS receptor zbog toga što liheniocin nije pokazivao antibakterijsku aktivnost protiv *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* soja B464, koji je derivat IL1403 koji nosu deleciju man-PTS. I drugi bakteriocini Klase II, kao što su oni nalik pediocinu kao i laktokokcin A takođe koriste

man-PTS receptor (Robichon i sar., 1997, Diep i sar., 2007). S druge strane, preliminarni testovi su pokazali da ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-4 ima antibakterijsko dejstvo protiv B464, ukazujući na to da ovi bakteriocini koriste drugi receptor. Ideja je bila da se kombinovanjem bakteriocina koji imaju različite ćelijske receptore postigne eventualni sinergizam u aktivnosti. Poznato je da klasa II bakteriocina ima veliku baktericidnu aktivnost protiv mnogih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, uključujući i KNS i *L. monocytogenes* sojeve (Hassan i sar., 2012, Yang i sar., 2014). U ovom radu, utvrđena je različita osetljivost stafilokokalnih sojeva, posebno na liheniocin 50.2. Dok je *S. epidermidis* pokazao MIC vrednost od 200 AU/ml za liheniocin 50.2, neke druge KNS kao nepatogene *S. hominis*, *S. haemolyticus* ili *S. lugdunensis* su bile osetljivije. Sa druge strane, i liheniocin 50.2 i ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-4 pokazali su bolju antimikrobnu aktivnost prema sojevima *L. monocytogenes*. Poznato je da su KNS mnogo rezistentnije na konvencionalne antimikrobne agense u poređenju sa *L. monocytogenes* sojevima. Međutim u ovoj studiji je pokazano da su KNS ipak dovoljno osetljive prema liheniocinu 50.2 i ekstraktu bakteriocina soja BGBU1-4 da bi se oni mogli uzeti u razmatranje kao potencijalni antimikrobni terapijski agensi.

Formiranje biofilma je značajan problem kako u medicini, tako i u prehrambenoj industriji. Mnogi antibiotici koji su efikasni protiv planktonskih ćelija bakterija, slabije su efikasni ili su potpuno neefikasni protiv bakterija u biofilmu (Shanks i sar., 2012). Brojna istraživanja su vršena poslednjih godina a sa ciljem otkrivanja jedinjenja, koja bi vršila inhibiranje formiranja biofilma ili bi pak dovođila do razgradnje već formiranog biofilma (Saising i sar., 2012, Balaji i sar., 2013, Božić i sar., 2014). Posebnu pažnju privlače jedinjenja malih molekula, koja bi bila pogodna za upotrebu *in vivo*. Identifikovana su neka od jedinjenja koja kod *S. aureus* preko *agr* lokusa, sinteze nukleotida i replikacije DNK regulišu formiranje biofilma (Landini i sar., 2010, Worthington i sar., 2012). Poput fagom kodiranih endolizina, bakteriocini svoju funkciju ostvaruju ulaskom kroz ćelijsku membranu ciljne bakterije, formiranjem pora i izazivanjem lize ćelije. Infekcije povezane sa biofilmom znatno utiču na ljudsko zdravlje, postavljajući velike izazove u borbi protiv njihove antimikrobne rezistencije (Donlan i Costerton, 2002, Stewart, 2002, Stewart i Costerton, 2001). Zbog toga je prevencija formiranja biofilma jedna od najvažnijih stvari u modernoj medicini. Činjenica je da subinhibitorne koncentracije raznih antimikrobnih agensa poseduju inhibitorni efekat na

formiranje biofilma kod različitih mikroorganizama (Božić i sar., 2014, Balaji i sar., 2013). Ali, pokazano je i da subinhibitorne koncentracije nekih antimikrobnih jedinjenja čak i poboljšavaju formiranje biofilma, kao npr. eritromicin, nafcilin, tetraciklin i vankomicin kod formiranja biofilma stafilokoka (Saising i sar., 2012). U našoj studiji značajna inhibicija formiranja biofilma je detektovana pri $\frac{1}{2} \times$ i $\frac{1}{4} \times$ MIC za liheniocin 50.2 na KNS i $\frac{1}{2} \times$ i $\frac{1}{4} \times$ MIC za ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-4 na *L. monocytogenes*, ukazujući tako da su funkcije relevantne za formiranje biofilma ometene pri subinhibitornim koncentracijama oba testirana agensa. Ovi rezultati ukazuju na to da liheniocin 50.2 i ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-4 već vrše inhibirajući efekat na formiranje biofilma pre nego što inhibiraju sam rast KNS i *L. monocytogenes*. Ranije studije pokazuju da klasa I i klasa II bakteriocina inhibiraju transkripciju gena uključenih u vezivanje i produkciju ekstracelularnih polimernih supstanci kod stafilokoka (Saising i sar., 2012, Nishie i sar., 2012), ukazujući tako da bi to mogao biti mehanizam delovanja liheniocina 50.2 i ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 na formiranje biofilma. Ipak, iako je liheniocin 50.2 pokazao sličnu aktivnost na planktonskim ćelijama KNS i *L. monocytogenes*, subinhibitorne koncentracije ovog bakteriocina su uticale na formiranje biofilma samo kod stafilokoka. Jedna od hipoteza koje objašnjavaju ovakve rezultate može biti efekat doze ili dokaz za postojanje različitih mesta bakteriocinske aktivnosti na procese za formiranje biofilma kod različitih bakterija. Takođe je biofilm koji formiraju različite vrste bakterija različit po sastavu i relativnom udelu različitih jedinjenja koja ulaze u sastav ekstracelularnog matriksa biofilma, čime se može objasniti bolje efekat prema KNS.

Nakon formiranja biofilma, bakterijske ćelije postaju otpornije na sve vrste antimikrobnih jedinjenja tako da su agensi koji mogu da naruše već formirani biofilm izuzetno bitni. Zbog toga smo proučavali i uticaj bakteriocina liheniocina 50.2 i ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 na već formirani biofilm star 24 časa. Pošto je ideja ovakvog istraživanja bila i moguća genitalna primena ovih bakteriocina, dve koncentracije su ispitivane (100 AU/ml i 200 AU/ml). Statistički značajan rezultat je zabeležen kod testiranih koncentracija liheniocina 50.2 i BGBU1-4 na formirani biofilm i kod KNS i kod *L. monocytogenes* sojeva. Štaviše, oba agensa imaju uticaj na formirani biofilm obe bakterije, u poređenju sa efektima subinhibitornih koncentracija u kojima je liheniocin 50.2 bio aktivan samo na formiranje biofilma KNS, a ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-

4 na formiranje biofilma *L. monocitogenes*. Dobijeni rezultati zahtevaju dodatna istraživanja kako bi se pokazalo da li dolazi do uništavanja ekstracelularnog matriksa i čišćenja biofilma sa površine ili da do stanjivanja biofilma dolazi zbog redukcije vijabilnosti bakterija koje se ne dele, tj., ipak baktericidnog efekta. U slučaju bakteriocina sonorensisa koji proizvodi marinski izolat *Bacillus sonorensis* MT93, kada se primeni na već formirani biofilm *S. aureus* dovodi do značajne redukcije vijabilnosti ćelija u biofilmu što se videlo kao stanjivanje biofilma na SEM mikroskopu (Chopra i sar., 2015). Oni su predložili da je mehanizam delovanja sonorensisa permeabilizacija membrane. Još jedna hipoteza ide u korist baktericidnog efekta kao posrednog uzročnika stanjivanja biofilma a ne eradikacije nekim drugim mehanizmom. Naime, Okuda i sar. (2013) su pokazali da je nizin A mnogo efikasniji u stanjivanju biofilma od još jednog bakteriocina, lakticina Q. Njihovo objašnjenje je da kako nizin A prepoznaje lipid II kao specifični receptor (koga lakticin Q nema) to mu omogućava, u relativno niskim koncentracijama, u uslovima obilja različitih makromolekula vezanih slabim vezama u ekstracelularnom matriksu, veću uspešnost vezivanja za površinu osetljivih ćelija pa samim tim i aktivnost.

Broj i raznovrsnost novih antimikrobnih jedinjenja koja pokazuju sinergiju sa klasičnim antibioticima je značajan. Mnoga od ovih jedinjenja se već koriste kao alternativa konvencionalnoj terapiji u medicini, dok se mnoga od njih potencijalno mogu koristiti i u terapijske svrhe (Snyder i sar., 2014). Sinergistički antimikrobni efekat kombinovanog antibiotika i nekog drugog agensa zahteva interakciju ove druge supstance sa mehanizmom bakterijske rezistencije (Wolska i sar., 2012). EGCg (epigallocatechin gallate) inhibira aktivnost penicilinaze, te tako povećava efikasnost penicilina protiv *S. aureus* (Zhao i sar., 2002), i povećava efikasnost ampicilina protiv MRSA (Hu i sar., 2001). Drugi način sinergizma je povećavanje intracelularne koncentracije antibiotika, što može biti postignuto prevazilaženjem ćelijske barijere koja sprečava antibiotike da prodiru u ćelije ili blokiranjem bakterijske efluksne pumpe da izbacuju takve supstance iz ćelije (Wolska i sar., 2012). Efekat dobijen kombinacijom bakteriocina sa antibioticima u ovom radu ide od sinergizma, aditivnosti i indiferentnog efekta do antagonizma. Ispitivanje je izvršeno na tri odabrana izolata kojima su prethodno utvrđene najniže MIC vrednosti za bakteriocine. U kombinaciji liheniocina 50.2 sa gentamicinom najznačajniji sinergizam je utvrđen kod referentnog soja *S. epidermidis* ATCC 12228. Ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-4 sa gentamicinom nije pokazao efekat kod izolata *S. hominis*,

kao ni kod referentnog soja *S. epidermidis* ATCC 12228. Sinergistički efekat sa gentamicinom najverovatnije se ostvaruje usled olakšanog ulaska antibiotika kroz ćelijsku membranu bakterija, koja je oštećena dejstvom bakteriocina, što omogućava gentamicinu da u nižim koncentracijama od inhibitornih blokira sintezu proteina u ćelijama. Ovaj mehanizam bi bio u skladu sa rezultatima drugih autora (Wolska i sar., 2012). U kombinaciji liheniocina 50.2 sa ampicilinom kod izolata *L. monocytogenes* 4 je zabeležen antagonizam pri maksimalnim vrednostima MIC za obe supstance, dok je pri subinhibitornim vrednostima ampicilina kod istog soja zabeležen sinergistički efekat. Kombinacija ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 sa ampicilinom kod izolata *L. monocytogenes* 18 je pokazala antagonizam, ali takođe i aditivni efekat pri subinhibitornim koncentracijama ampicilina. Sinergizam sa ampicilinom mogao bi da bude posledica istovremenog dejstva ova dva jedinjenja na omotače bakterijske ćelije, bakteriocina na ćelijsku membranu, a ampicilina na ćelijski zid, što ubrzava osmotsku lizu ćelije. Ono što je posebno značajno je da je sinergizam uočen i kada su testirani liheniocin 50.2 i ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-4 u kombinaciji i to kod svih ispitivanih izolata i referentnih sojeva. U ranijim istraživanjima, uglavnom je sinergizam bakteriocina uočavan kod sojeva koji inače produkuju više od jednog bakteriocina. Na primer, u istraživanju Casaus i sar. (1997) pokazano je da enterocin A i enterocin B, koje proizvodi *Enterococcus faecium* T136, dovode do drastičnog smanjenja broja preživelih osetljivih bakterija kada se koriste u kombinaciji. Isto tako, dva enterocina (L50A i L50B) iz *E. faecium* imaju sinergistički efekat protiv bakterija koje izazivaju kvarenje piva, *Lactococcus brevis* i *Pediococcus damnosus* (Basanta i sar., 2008).

Prednost upotrebe bakteriocina je manja verovatnoća razvijanja rezistencije nego prema antibioticima. Čak i sa široko rasprostranjenom upotrebom nizina A, gotovo da nije zabeležen ni jedan slučaj razvijene rezistencije u rutinskoj upotrebi ovog bakteriocina (Zendo, 2013). Međutim, zabeležena je razvijena rezistencija prema bakteriocinima u *in vitro* studiji. Ta studija je pokazala bakteriocin rezistentne sojeve *E. coli* i *L. monocytogenes* koji su razvili rezistenciju kroz dugotrajno izlaganje postepeno povećanim koncentracijama bakteriocina (Naghmouchi i sar., 2011). Zbog toga, široka upotreba bakteriocinske terapije mora biti pod kontrolisanom primenom da bi se sprečilo moguće razvijanje rezistencije. Korišćenje koktela bakteriocina bi bilo jedno od mogućih rešenja za prevazilaženje rezistencije.

Na osnovu svega iznetog, smatramo da je dalje proučavanje liheniocina 50.2, koji proizvodi izolat *Bacillus* VPS 50.2, u cilju upotrebe, bilo kao konzervansa hrane, bilo kao potencijalnog agensa u medicini, opravdano i poželjno. Dalja istraživanja bi se odnosila pre svega na testiranje bezbednosti upotrebe, tj., odsustvo toksičnog i genotoksičnog efekta i precizniju identifikaciju producerskog izolata do nivoa vrste/podvrste/soja sekvenciranjem više gena ili čitavog genoma što bi omogućilo i novi pristup određivanju gena za proizvodnju, rezistenciju i eksport liheniocina 50.2.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata predstavljenih u ovom radu, mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Primenom PFGE metode i Phoretix 1D Pro programa određeni su filogenetski odnosi u kolekciji od 166 izolata, ukupna raznovrsnost je svrstana u 21 grupu. Sekvenciranjem konzerviranog gena za elongacioni faktor Ef-Tu, *tuf*, izvršeno je identifikovanje 21 grupe izolata kao pripadnike 8 vrsta roda *Bacillus*: *B. amyloliquefaciens* (ukupno 52 izolata), *B. subtilis* (ukupno 54 izolata), *B. thuringiensis* (ukupno 22 izolata), *B. anthracis* / *B. cereus* (ukupno 14 izolata), *B. pumilus* / *B. safensis* (ukupno 20 izolata) i *B. megaterium* (ukupno 4 izolata).
2. Na osnovu PFGE profila i sekvence *tuf* gena izolat koji proizvodi bakteriocin liheniocin 50.2 je identifikovan kao *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.
3. Bakteriocin, liheniocin 50.2 je okarakterisan kao termostabilan protein, aktivan u širokom opsegu pH vrednosti, dok je najveću aktivnost pokazao na pH 9, osetljiv je na delovanje proteolitičkih enzima i zadržava aktivnost u prisustvu različitih katjona.
4. Najbolja produkcija bakteriocina, zabeležena je pod sledećim uslovima: u 42h od početka inkubacije na 37°C u LB medijumu pri aeraciji.
5. Antimikrobni spektar liheniocina 50.2 je pokazao inhibiciju rasta značajnog broja Gram-pozitivnih bakterija, uključujući i patogene *L. monocytogenes*, meticilin-zavisne *S. aureus*, β -hemolitičku streptokoke i koagulaza negativne stafilokoke.
6. Sirovi ekstrakt liheniocina 50.2 je, na koncentracijama od 2 \times i 4 \times MIC, pokazao baktericidnu aktivnost protiv *L. monocytogenes* već u prvom času aplikacije.
7. Izolati patogenih stafilokoka iz uretralnih briseva identifikovani su kao: *Staphylococcus epidermidis* (4 izolata), *Staphylococcus hominis* (2 izolata), *Staphylococcus lungdunensis* (1 izolat) i *Staphylococcus haemolyticus* (1 izolat).
8. Određene su minimalna inhibitorne koncentracije za bakteriocin liheniocin 50.2 (200 AU/ml za koagulaza negativne stafilokoke i 400 AU/ml za *L. monocytogenes*) i ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-4 (200 AU/ml za koagulaza negativne stafilokoke i 3200 AU/ml za *L. monocytogenes*).

9. Bakteriocin liheniocin 50.2 je pokazao aktivnost na formiranje biofilma koagulaza negativnih stafilokoka pri vrednostima $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIC koncentracije dok je ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-4 pokazao aktivnost na formiranje biofilma *L. monocytogenes* pri vrednostima $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIC koncentracije.
10. Bakteriocin liheniocin 50.2 i ekstrakt bakteriocina soja BGBU1-4 su pokazali aktivnost na već formiran biofilm četiri izolata koagulaza negativnih stafilokoka i četiri izolata *L. monocytogenes* na koncentracijama od 100 AU/ml i 200 AU/ml.
11. Efekat kombinacije ispitanivanih bakteriocina sa antibioticima: ampicilinom i gentamicinom na odabrane sojeve *Staphylococcus* spp. i *L. monocytogenes* je bio u kategoriji sinergizma, aditivnosti, indiferentnog efekta i antagonizma. Najznačajniji sinergizam je utvrđen u kombinaciji liheniocina 50.2 sa gentamicinom protiv *S. epidermidis* ATCC12228, ekstrakt soja BGBU1-4 sa gentamicinom protiv *S. epidermidis* 24 i u kombinaciji liheniocina 50.2 sa ekstraktom bakteriocina soja BGBU1-4 protiv *S. hominis* 10.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., and Gálvez, A. (2010). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews* 35(1):201-232.

Allsworth, J. E. and Peipert, J. F. (2007). Prevalence of bacterial vaginosis: 2001–2004 National Health and Nutrition Examination Survey data. *Obstetrics & Gynecology* 109(1):114–120.

Altschul, S., Gish, W. and Miller, W. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 215:403–410.

Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143–169.

Amer E. I., Mossallam S. F., Mahrous H. (2014). Therapeutic enhancement of newly derived bacteriocins against *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol.* 146:52±63. doi: 10.1016/j.exppara.2014.09.005 PMID: 25300763.

Anthony, T., Chellappa, G. S., Rajesh, T., and Gunasekaran, P. (2010). Functional analysis of a putative holin-like peptide-coding gene in the genome of *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Archives of Microbiology* 192(1):51-56.

Ahern, M., Verschueren, S., and van Sinderen, D. (2003). Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiol Lett* 163:229–236.

Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, W., Leid, J. G., Powers, M. E., Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms. Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* 2(5):445-59.

Asaduzzaman, S. M., and Sonomoto, K. (2009). Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107(5):475-487.

Asch, C., Farrow, A. E., Wallbanks, S., and Collins, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequence. *Lett. Appl. Microbiol.* 13:202-206.

Ash, C., Farrow, J. A. E., Dorsch, M., Stackebrandt, E., and Collins, M. D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the

basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:343–346.

Aunpad, R., and Na-Bangchang, K. (2007). Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Current Microbiology* 55:308-313.

Balaji, K., Thenmozhi, R., Pandian, S. K. (2013). Effect of subinhibitory concentrations of fluoroquinolones on biofilm production by clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Indian J Med Res.* 137(5):963±971. PMID: 23760384.

Banerjee, S., Hansen, J. N. (1988). Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *J Biol Chem* 263:9508-14.

Barber, M., Rozwadowska-Dowzenko, M. (1948). Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* ii:641-4.

Bartoszewicz, M., Hansen, B. M., Swiecicka, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology* 25:588–596.

Basanta, A., Sanchez, J., Gomez-Sala, B., Herranz, C., Henandez, E. P. and Cintas, M. L. (2008). Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *International journal of food microbiology* 125(3):293-307.

Begley, M., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2009). Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 75(17):5451-5460.

Benson, D. (2000). GenBank. *Nucleic Acids Res* 28:15–18.

Berić, T., Urdaci, M. C., Stanković, S. and Knežević-Vukčević, J. (2009). RAPD analysis of genetic diversity and qualitative assessment of hydrolytic activities in a collection of *Bacillus* sp. isolate. *Arch. Biol. Sci.* 61:645–652.

Berić, T. (2010). Biohemijska i molekularno genetska karakterizacija izolata *Bacillus* sp. sa područja Srbije, doktorska disertacija - Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.

Berić, T., Stanković, S., Draganić, V., Kojić, M., Lozo, J., Fira, D. (2014). Novel Antilisterial Bacteriocin Licheniocin 50.2 From *Bacillus Licheniformis* VPS50.2 Isolated From Soil Sample. *J Apple Microbiol* 116(3):502-510.

Bierbaum, G., Brötz, H., Koller, K. P., & Sahl, H. G. (1995). Cloning, sequencing and production of the lantibiotic mersacidin. *FEMS Microbiology Letters* 127:121-126.

Bierbaum, G., and Sahl, H. G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10(1):2-18.

Birren, B., and E. Lai. (1993). Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

Biswas, S., Brunel, J. M., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M. and Rolain, J. M. (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev. Anti-Infective Ther.* 10:917–934.

Bizani, D., Dominguez, A. P. M., and Brandelli, A. (2005). Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in Applied Microbiology* 41(3):269-273.

Borges, S. F., Silva, J. G., Teixeira, P. C. (2011). Survival and biofilm formation of *Listeria monocytogenes* in simulated vaginal fluid: influence of pH and strain origin. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 62(3):315-320 doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00815.x PMID: 21569122.

Borges, S., Barbosa, J., Silva, J., Teixeira, P. (2013). Evaluation of characteristics of *Pediococcus* spp. to be used as a vaginal probiotic. *J Appl Microbiol.* 115(2):527±538. Epub 2013 May 16. doi: 10.1111/jam.12232 PMID: 23611355.

Božić, D. D., Milenković, M., Ivković, B., Ćirković, I. (2014). Newly-synthesized chalcones-inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol.* 45(1):263±270. PMID: 24948943.

Brady, R. A., Leid, J. G., Kofonow, J., Costerton, J. W., Shirtliff, M. E. (2007). Immunoglobulins to surface-associated biofilm immunogens provide a novel means of visualization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 73:6612-9.

Branquinho, R., Meirinhos-Soares, L., Carrico, J. A., Pintado, M. and Peixe, V. L. (2014). Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a

highly heterogeneous population of different closely related species and clones. *FEMS Microbiol Ecol* 90:689–698.

Bremaud, L., Fremaux, C., Laalami, S., and Cenatiempo, Y. (1995). Genetic and molecular analysis of the tRNA-tufB operon of the myxobacterium *Stigmatella aurantica*. *Nucleic Acids Res.* 23:1737–1743.

Caamano-Antelo, S., Fernandez-No, I. C., Bohme, K., Ezzat-Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Barros-Velazquez, J., Calo-Mata, P. (2015). Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. *Food Microbiology*, 46:288-298.

Carlson, C. R., Caugant, D. A. and Kolstø, A.-B. (1994). Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1719-1725.

Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, M. L., Nes, F. I., Hernandez, E. P. and Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* TI36 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143:2287-2294.

Chavagnat, F., Haueter, M., Jimeno, J., Casey, M. G. (2002). Comparison of partial tuf gene sequences for the identification of lactobacilli. *FEMS Microbiol. Lett.* 217:177-183.

Chehimi, S., Delalande, F., Sable, S., Hajlaoui, M. R., Van Dorsselaer, A., Limam, F., & Pons, A. M. (2007). Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology* 53(2):284-290.

Chen, M. L., Tsen, H. Y. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J. Appl. Microbiol.* 92:912-919.

Cherif, A., Brusetti, L., Borin, S., Rizzi, A., Boudabous, A., Khyami-Horani, H., and Daffonchio, D. (2003). Genetic relationship in the *Bacillus cereus* group by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific repPCR fragment. *J. Appl. Microbiol.* 94:1108–1119.

Chopra, L., Singh, G., Kumar, K. J. and Sahoo, D. K. (2015). Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Sci. Rep.* 5:13412; doi: 10.1038/srep13412.

Cladera-Olivera, F., Caron, G. R. and Brandelli, A. (2004). Bacteriocin like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett Appl Microbiol* 38:251–256.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71(1):1-20.

Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3(10):777-788.

Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2013). Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 11(2):95±105. doi: 10.1038/nrmicro2937 PMID: 23268227.

Costerton, J. W., Montanaro, L., Aricola, B. R. (2003). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs* 28:1062-8.

Daffonchio, D., Raddadi, N., Merabishvili, M., Cherif, A., Carmagnola, L., Brusetti, L., Rizza, A., Chanishvili, N., Visca, P., Sharp, R. and Borin, S. (2006). Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol.* 72(2):1295-301.

Defays, D. (1977) An efficient algorithm for a complete link method. *Comput. J.* 20:364–366.

Diaz, D. (2007). Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT-5940 spores on broiler performance and digestibility. *Published online: <http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/articles/effect-bacillus-amyloliquefaciens-cect5940-t795/p0.htm>.*

Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., Nes, I. F. (2007). Common mechanism of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(7):2384±2389. doi: 10.1073/pnas.0608775104 PMID:17284603

Dischinger, J., Josten, M., Szekat, C., Sahl, H. G., and Bierbaum, G. (2009). Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. *PLoS One*, 4(8):6788.

Dobbs, T. E., Guh, A. Y., Oakes, P., Vince, M. J., Forbi, J. C., Jensen, B., Moulton-Meissner, H., Byers, P., (2014). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections at an outpatient chemotherapy center. *Am. J. Infect. Control* 42:731–734.

Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15(2):167±193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002 PMID: 11932229.

Drancourt, M., Raoult, D., (2002). rpoB gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 40:1333-1338.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., and Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2):564-582.

Drobniewski, F. A., (1993). *Bacillus cereus* related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:324-338.

Farrar, W. E. and Newsome, J. K. (1973). Mechanism of synergistic effects of beta-lactam antibiotic combinations on Gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4(2):109-114.

Fikes, J. D., Crabtree, B. L. and Barridge, B. D. (1983). Studies on the mode of action of a bacteriocin produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Can J Microbiol* 29:1576–1582.

Filer, D. and Furano, A. V. (1980). Portions of the gene encoding elongation factor Tu are highly conserved in prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry* 255:728-734.

Fowler, V. G.Jr., Sakoulas, G., McIntyre, L. M., Meka, V. G., Arbeit, R. D., Cabell, C. H. (2004). Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level *in vitro* resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *J Infect Dis.* 190:1140-9.

Garau, J., Bouza, E., Chastre, J., Gudiol, F., Harbarth, S. (2009). Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect* 15:125-36.

Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., König, B., (2008). Genetic classification distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16 rRNA, hsp60, sodA and tuf gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 46:1019-1025.

Gibbs, R. S. (2007). Asymptomatic bacterial vaginosis: is it time to treat? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196(6):495–496.

Gibbons, N. E. and Murray, R. G. E. (1978). Proposals concerning the higher taxa of bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 28:1–6.

Gilbert, P., Das, J. and Foley, I. (1997). Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11:160–167.

Goering, R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect. Genet. Evol* 10:866–875.

Gotz, F. (2004). Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Curr Opin Microbiol* 7:477-487.

Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 93:1040-1041.

Gray, E. J., Lee, K. D., Souleimanov, A. M., Di Falco, M. R., Zhou, X., Ly, A. and Smith, D. L. (2006). A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology* 100(3):545-554.

Guder, A., Wiedemann, I., and Sahl, H. G. (2000). Posttranslationally modified bacteriocins—the lantibiotics. *Peptide Science* 55(1):62-73.

Haft, D. H. (2009). A strain-variable bacteriocin in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* with repeated Cys-Xaa-Xaa motifs. *Biol Direct* 4:15.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E. and Klaenhammer, T. R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52:384-387.

Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J Appl Microbiol.* 113(4):723±736. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x PMID: 22583565.

He, L., Chen, W. and Liu, Y. (2006). Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiol Res* 161:321–326.

He, Z., Kisla, D., Zhang, L., Yuan, C., Green-Church, K. B., and Yousef, A. E. (2007). Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1):168-178.

Heiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35:322-332.

Heng, N. C., and Tagg, J. R. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2).

Hosoi, T. and Kiuchi, K. (2003). Natto – a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). Handbook of Fermented Functional Foods (Farnworth ER, ed) 227–245. CRC Press, Boca Raton, FL.

Hu, Z. Q., Zhao, W. Y., Hara, Y., Shimamura, T. (2001). Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *J. Antimicrob. Chemother.* 48:361–364.

Hu, Z. Q., Zhao, W. H., Asano, N., Yoda, Y., Hara, Y., Shimamura, T. (2002). Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46(2):558-60.

Huang, W. M. (1996). Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annu Rev Genet* 30:79–107.

Hyde, A. J., Parisot, J., McNichol, A., and Bonev, B. B. (2006). Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(52):19896-19901.

Ivanov, Y.B. (2007). Microbiological features of persistent nonspecific urethritis in men. *J Microbiol Immunol Infect.* 40(2):157±161. PMID: 17446965.

Ivánovics, G., and Alföldi, L. (1954). A new anti-bacterial principle: megacin. *Nature*, 174:465.

Jay, J. M., Loessner, M. J. and Golden, D. A. (2005). Modern Food Microbiology. 7th edn. Springer, New York.

Jemmi, T. and Stephan, R. (2006). *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 25 (2):571-580.

Jung, G. (1991). Lantibiotics: a survey. Nisin and novel lantibiotics. ESCOM Science Publishers, Leiden, The Netherlands, 1-34.

Kaminska, P. S., Fiedoruk, K., Jankowska, D. (2015). One-day pulsed-field gel electrophoresis protocol for rapid determination of emetic *Bacillus cereus* isolates. *Electrophoresis* 36:1051-4.

Kamoun, F., Mejdoub, H., Aouissaoui, H., Reinbolt, J., Hammami, A., and Jaoua, S. (2005). Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology* 98(4):881-888.

Kayalvizhi, N., and Gunasekaran, P. (2008). Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. *Letters in Applied Microbiology* 47(6):600-607.

Keymanesh, K., Soltani, S., Sardari, S. (2009). Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:933–944.

Khalil, R., Djadouni, F., Elbahloul, Y., and Omar, S. (2009). The influence of cultural and physical conditions on the antimicrobial activity of bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 22 strain. *African Journal of Food Science* 3(1):011-022.

Khan, M. R., Saha, M. L. and Afroz, H. (2001). Microorganisms associated with gemstones. *Banglad. J. Bot.* 30:93–96.

Kimura, M., (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111–120.

Kirby, W. M. (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 99:452-3.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12(1-3):39-85.

Knobloch, J. K., Horstkotte, M. A., Rohde, H., Kaulfers, P. M., Mack, D. (2002). Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 49:683-7.

Kojic, M., Strahinic, I. and Topisirovic, L. (2005). Proteinase PI and lactococcin A genes are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50. *Can. J. Microbiol.* 51:305–314.

Korenblum, E., der Weid, I., Santos, A. L., Rosado, A. S., Sebastian, G. V., Coutinho, C. M. and Seldin, L. (2005). Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* HO-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 98:667-675.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. and Hultgren, J. S. (2017). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a010306.

Kraaij van, C., de Vos, W. M., Siezen, R. J., and Kuipers, O. P. (1999). Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications, *Natural Product Reports*, 16(5):575–587.

Krasny, L., Vacik, T., Fucik, V. and J. Jonak. (2000). Cloning and characterization of the str operon and elongation factor Tu expression in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 182:6114–6122.

Kruszewska. D., Sahl, H. G., Bierbaum, G., Pag, U., Hynes, S. O. and Ljungh, A. (2004). Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J Antimicrob Chemoth* 54:648–653.

Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J. G., Nijland, R. (2010). Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:813-23.

Larson, E. J., Hakovirta, J. R., Cai, H., Jett, J. H., Burde, S., Keller, R. A. and Marrone. B. L. (2000). Rapid DNA fingerprinting of pathogens by flow cytometry. *Cytometry* 41:203–208.

Lathe, W. C., III, and P. Bork. (2001). Evolution of tuf genes: ancient duplication, differential loss and gene conversion. *FEBS Lett.* 502:113–116.

Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., and Urdaci, M. C. (2000). Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12):5213-5220.

Leifert, C., Li, H., Chidburee, S. and Hamson, S. (1995). Antibiotic production and biocontrol activity of *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *J Appl Bacteriol* 78:97–108.

Lee, K. H., Jun, K. D., Kim, W. S. and Paik, H. D. (2001). Partial characterization of polyfermentacin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Lett Appl Microbiol* 32:146–151.

Lee, H., Churey, J. J., and Worobo, R. W. (2009). Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiology Letters* 299(2):205-213.

Lenz, A. P., Williamson, K. S., Pitts, B., Stewart, P. S., Franklin, M. J. (2008). Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74:4463–4471.

Lewis, J. S. 2nd, Jorgensen, J. H. (2005). Inducible clindamycin resistance in staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis* 40:280-5.

Lisboa, M. P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J. A., and Brandelli, A. (2010). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International Microbiology* 9(2):111-118.

Lohans, T. C., Towle, M. K., Miskolzie, M., McKay, T. R., van Belkum, J. M., McMullen, M. L. and Vederas, C. J. (2013). Solution structures of the linear leaderless bacteriocins enterocin 7A and 7B resemble carnocyclin A, a circular antimicrobial peptide. *Biochemistry* 52(23):3987–3994. DOI: 10.1021/bi400359z.

Ludwig, W., and H.-P. Klenk. (2001). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics, 49–65. In G. M. Garrity (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. Springer, New York, N.Y.

Lutz, G., Chavarria, M., Arias, M. L. and Mata-Segreda, J. F. (2006). Microbial degradation of palm (*Elaeis guineensis*) biodiesel. *Rev Biol Trop (Int J Trop Biol)* 54:59–63.

Maass S., Sievers, S., Zuhlke, D., Kuzinski, J., Sappa, P. K., Muntel, J., Hessling, B., Bernhardt, J., Sietmann, R., Volker, U., Hecker M. and Becher, D. (2011). Efficient, global-scale quantification of absolute protein amounts by integration of targeted mass spectrometry and two-dimensional gel-based proteomics. *Anal Chem.* 83(7):2677-84.

Macwana, S. and Muriana, P. M. (2012). Spontaneous bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* as a susceptibility screen for identifying different mechanisms of resistance and modes of action by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods.* 88(1):7-13. doi: 10.1016/j.mimet.2011.09.009.

Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., Clark P. D., (2012). *Brock - Biology of Microorganisms* 13th ed, *Benjamin Cummings*.

Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L. (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PloS ONE* 4:5822; DOI:10.1371/journal.pone.0005822.

Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G., and De Felice, M. (2002). Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories* 1(1):1.

Meltzer, E., Stienlauf, S., Leshem, E., Sidi, Y., Schwartz, E., (2014). A Large Outbreak of *Salmonella* Paratyphi A Infection Among Israeli Travelers To Nepal. *Clin. Infect. Dis.* 58:359–364.

Molitor, E., Kluczny, C., Brotz, H., Bierbaum, G., Jack, R. and Sahl, H. G. (1996). Effects of the lantibiotic mersacidin on the morphology of staphylococci. *Zbl Bakt* 284:318–328.

Montesinos, E. (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol. Lett.* 270:1–11.

Morgulis, A. Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., Schaffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24:1757–1764.

Murchan, S., M. E. Kaufmann, A. Deplano, R. De Ryck, M. Struelens, C. E. Zinn, V. Fussing, S. Salmenlinna, J. Vuopio-Varkila, N. El Solh, C. Cuny, W. Witte, P. T. Tassios, N. Legakis, W. Van Leeuwen, A. Van Belkum, A. Vindel, I. Laconcha, J. Garaizar, S. Haeggman, B. Olsson-Liljequist, U. Ransjo, G. Coombes, and B. Cookson. (2003). Harmonization of pulsed- field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41:1574–1585.

Mutus, R., Kocabagli, N., Alp, M., Acar, N., Eren, M. and Gezen, S. S. (2006). The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. *Poultry Sci* 85:1621–1625.

Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Baah, J., Teather, R., Drider, D. (2011). Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 162:99–107.

Naghmouchi, K., Baah, J., Hober, D., Jouy, E., Rubrecht, C., Sané, F., Dridere, D. (2013). Synergistic Effect between Colistin and Bacteriocins in Controlling Gram-Negative Pathogens and Their Potential To Reduce Antibiotic Toxicity in Mammalian Epithelial Cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(6):2719–2725. doi: 10.1128/AAC.02328-12.

Nakamura, L. K., Roberts, M. S., Cohan, F. M., (1999). Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. *nov.* *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. *nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1211-1215.

Nes, I. F., Yoon, S., and Diep, D. B. (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology* 16(5):675.

Nishie, M., Nagao, J., Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* 17(1):1±16. PMID: 22451427.

O'Sullivan, L., Ross, R. P., and Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84(5):593-604.

Oguntoyinbo, A., Sanni, A. I., Franz, C. M. A. P. and Holzapfel, W. H. (2007). In vitro fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starter cultures for the production of okpehe, a traditional African fermented condiment. *Int J Food Microbiol* 113:208–218.

Okuda, K., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K. and Mizunoe, Y. (2013). Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(11):5572–5579.

Oman, T. J. and van der Donk, W. A. (2009). Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin. *ACS Chem Biol* 4:865–874.

Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y., Balci, I. (2005). Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol* 43:140-3.

Oscáriz, J. C., and Pisabarro, A. G. (2000). Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology* 89(2):361-369.

Oscáriz, J. C., Cintas, L., Holo, H., Nes, I. F., and Pisabarro, A. G. (2006). Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *FEMS Microbiology Letters* 254(1):108-115.

Otlewska A., Oltuszek-Walczak, E., Walczak, P. (2013). Differentiation of strains from the *Bacillus cereus* group by RFLP-PFGE genomic fingerprinting. *Electrophoresis* 34:3023–3028.

Paik, S. H., Chakicherla, A., and Hansen, J. N. (1998). Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry* 273(36):23134-23142.

Parisot, J., Carey, S., Breukink, E., Chan, W. C., Narbad, A., and Bonev, B. (2008). Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(2):612-618.

Pattnaik, P., Kaushik, J. K., Grover, S., and Batish, V. K. (2001). Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. *Journal of Applied Microbiology* 91(4):636-645.

Priest, F. G. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. *Bacillus Subtilis and Other Gram-Positive Bacteria* (Sonenshein AL, Hoch JA & Losick R, eds), 3–16. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Ramu, R., Shirahatti, P. S., Devi, A. T., Prasad, A., Kumuda J., Lochana M. S., Zameer F., Dhananjaya B. L., and Nagendra Prasad M. N. (2015). Bacteriocins and Their Applications in Food Preservation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. Jul 20:0. DOI:10.1080/10408398.2015.1020918

Rauch, P. J. G., de Vos, W. M. (1992). Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 174(4):1280-1287.

Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S. et al. (2007). The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8113-8.

Riley, M. A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu Rev Genet* 32:255-78.

Riley, M. A., and Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology* 56(1):117-137.

Roberts, M. S., Nakamura, L. K., Cohan, F.M., (1996). *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *Int J Syst Bacterio* 470-475.

Robichon, D., Gouin, E., Debarbouille, M., Cossart, P., Cenatiempo, Y., Hechard, Y. (1997). The *rpoN* (σ 54) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Bacteriol.* 179(23):7591±7594. PMID: 9393729

Rode, T. M., Langsurd, S., Holck, A., Moretro, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *IJ Food Microbiol* 116:372-383.

Ruiz, F. O., Pascual, L., Giordano, W., Barberis, L. (2015). Bacteriocins and other bioactive substances of probiotic lactobacilli as biological weapons against *Neisseria gonorrhoeae*. *Pathog Dis.* 73(3):10.

Saising, J., Dube, L., Ziebandt, A. K., Voravuthikunchai, S. P., Nega, M., Gotz, F. (2012). Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(11):5804±5810. doi: 10.1128/AAC.01296-12 PMID: 22926575.

Saleem, F., Ahmad, S., Yaqoob, Z. and Rasool, S. A. (2009). Comparative study of two bacteriocins produced by representative indigenous soil bacteria. *Pak J Pharm Sci* 22:252–258.

Sass, P., Jansen, A., Szekat, C., Sass, V., Sahl, H. G. & Bierbaum, G. (2008). The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 8:186.

Schnell, N., Engelke, G., Augustin, J., Rosenstein, R., Ungermann, V., Götz, F., Entian, K-D. (1992). Analysis of genes involved in the biosynthesis of lantibiotic epidermin. *Eur J Biochem* 204:57-68.

Schwartz, D. C., Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37(1):67–75.

Sebei, S., Zendo, T., Boudabous, A., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2007). Characterization, N-terminal sequencing and classification of cerein MRX1, a novel bacteriocin purified from a newly isolated bacterium: *Bacillus cereus* MRX1. *Journal of Applied Microbiology* 103(5):1621-1631.

Sela S., Yogev D., Razin S., Bercovier H. (1989) Duplication of the *tuf* gene: a new insight into the phylogeny of eubacteria. *J. Bacteriol* 171:581–584.

Senesi, S., Celandroni, F., Tavanti, A. and Ghelardi, E. (2001). Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* strains marketed for use in oral bacteriotherapy. *Appl Environ Microb* 67:834–839.

Snyder, A. B. and Worobo, R.W. (2014). Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J. Sci. Food. Agric.* 94:28–44.

Shanks, R. M. Q., Dashiff, A., Alster, J. S. and Kadouri, D. E. (2012). Isolation and identification of a bacteriocin with antibacterial and antibiofilm activity from *Citrobacter freundii*. *Arch. Microbiol.* 194:575–587.

Sharma, N. and Gautam, N. (2008). Antibacterial activity and characterization of bacteriocin of *Bacillus mycoides* isolated from whey. *Indian Journal of Biotechnology* 7(1):117.

Sharma, N., Attri, A. and Gautam, N. (2009). Purification and characterization of bacteriocin like substance produced from *Bacillus lentus* with perspective of a new biopreservative for food preservation. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 52:191-199.

Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A., (1980). Approved lists of bacterial names (Amended). Washington (DC): ASM Press.

Stanković, S., (2003). Identifikacija introna kod *Bacillus* sp. izolovanih iz prirodnih staništa, doktorska disertacija - Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.

Stein, T., Borchert, S., Conrad, B., Feesche, J., Hofemeister, B., Hofemeister, J. and Entian, K. D. (2002). Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3. *Journal of bacteriology* 184(6):1703-1711.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56(4):845–857.

Stein, T., Heinzmann, S., Dusterhus, S., Borchert, S. and Entian, K-D. (2004). Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spaIFEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *J Bacteriol* 187:822–828.

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiterplate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40:175-9.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Djukic, S., Cirkovic, I., Svabic-Vlahovic, M. (2007a). Long-term analysis of *Listeria monocytogenes* vaginal carriage frequency in Belgrade, Serbia. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 54(2):195±199. doi: 10.1556/AMicr.54.2007.2.9 PMID: 17899798.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., Ruzicka, F. (2007b). Quantification of biofilm microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115:891-9.

Stewart, P. S., Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358(9276):135±138. PMID: 11463434.

Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol.* 292(2):107±113. doi:10.1078/1438-4221-00196 PMID: 12195733.

Subramanian, A. R. (1975). Copies of proteins L7 and L12 and heterogeneity of the large subunit of *Escherischia coli* ribosome, *J. Mol. Biol.* 95:1-8.

Sutyak, K. E., Wirawan, R. E., Aroutcheva, A. A. and Chikindas, M. L. (2008). Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Appl Microbiol* 104:1067–1074.

Svetoch, E. A., Stern, N. J., Eruslanov, B. V., Kovalev, Y. N., Volodina, L. I., Perelygin, V. V. and Kudriavtseva, T. Y. (2005). Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. *Journal of Food Protection* 68(1):11-17.

Swaminathan, B., Barrett, T. J., Hunter, S. B., Tauxe, R. V. and Force, C. P. T. (2001). Pulsenet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7:382–389.

Switzer Blum, J., Burns Bindi, A., Buzzelli, J., Stolz J.F. and Oremland, R.S. (1998). *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov. two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.* 171:19–30.

Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N. and Horikoshi, K. (2000). Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 28(21):4317-4331.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2729.

Tansarli, G. S., Kostaras, E. K., Athanasiou, S., Falagas, M. E. (2013). Prevalence and treatment of aerobic vaginitis among non-pregnant women: evaluation of the evidence for an underestimated clinical entity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32(8):977±984. doi: 10.1007/s10096-013-1846-4 PMID: 23443475.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. and Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9):2233–2239.

Terlabie, N. N., Sakyi-Dawson, E. and Amoa-Awua, W. K. (2006). The comparative ability of four isolates of *Bacillus subtilis* to ferment soybeans into dawadawa. *Int J Food Microbiol* 106:145–152.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22):4673-4680.

Ticknor, L. O., Kolstø, A.-B., Hill, K. K., Keim, P., Laker, M. T., Tonks, M. and Jackson, P. J. (2001). Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4863–4873.

Uguen, P., Le Pennec, J. P., Dufour, A. (2000). Lantibiotic biosynthesis: interactions between prelactacin 481 and its putative modification enzyme, LctM. *J Bacteriol* 182:5262-6.

Urdaci, M. C., and Pinchuk, I. (2004a). Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics. In: Ricca, E., Henriques, A. O., Cutting, S. M., eds. *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications* 171-182.

Urdaci, M. C., Bressollier, P., and Pinchuk, I. (2004b). *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 38:S86-S90.

Usta, A. and Demirkan, E. (2013). The effect of growth parameters on the antibiotic activity and sporulation in *Bacillus* spp. isolated from soil. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2(5):2310-2313.

Van Belkum, M. J., and Stiles, M. E. (2000). Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Product Reports* 17(4):323-335.

Von Tersch, M. A., and Carlton, B. C. (1983). Megacinogenic plasmids of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* 155(2):872-877.

Vos, P. D., Garrity, M. G., Jones, D., Krieg, R. N., Ludwig, W., Rainey, A. F., Schleifer, H. K, Whitman, B. W. (2009). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology vol3*, 2nd ed, Springer.

Watnick, P., Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182:2675-9.

Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J. and Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1846-1850. DOI 10.1099/ijs.0.64685-0

White, R. L., Burgess, D. S., Mandru, M., Bosso, J. A. (1996). Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E-test. *Antimicrobial Agents Chemother* 40:1914-18.

Willey, J. M., & van Der Donk, W. A. (2007). Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology* 61:477-501.

Wolska, I. K., Grzes, K. and Kurek, A. (2012). Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics or bacteriocins. *Polish Jour. of Microb.* 61(2):95-104.

Workowski, K. A., Levine, W. C., and Wasserheit, J. N. (2002). U.S. Centers for Disease Control and Prevention guidelines for the treatment of sexually transmitted diseases: an opportunity to unify clinical and public health practice. *Annals of Internal Medicine* 137(4):255–262.

Worobo, R. W., Van Belkum, M. J., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C., Stiles, M. E. (1995). A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J Bacteriol* 177:3143-9.

Worthington, R. J., Richards, J. J., Melander, C. (2012). Small molecule control of bacterial biofilms. *Org Biomol Chem* 10:7457-74.

Xie, J., Zhang, R., Shang, C., and Guo, Y. (2009). Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *African Journal of Biotechnology* 8:5611–5619.

Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 5:241. doi: 10.3389/fmicb.2014.00241 PMID: 24904554.

Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., and Shirata, A. (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91(2):181-187.

Zendo, T. (2013). Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77:893–899.

Zhao, W. H., Hu, Z., Hara, Y., Shimamura, T. (2002). Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase producing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2266–2268.

Zhao, X. and Kuipers, P. O. (2016). Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *Genomics* 17:882. DOI 10.1186/s12864-016-3224-y

Zheng, G., Yan, L. Z., Vederas, J. C., and Zuber, P. (1999). Genes of the sbo-alb locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin. *Journal of Bacteriology* 181(23):7346-7355.

8. DODACI

8. DODACI

Dodatak 1. Kolekcija prirodnih izolata *Bacillus* sp. koji su korišćeni u ovom radu, sa lokalitetom izolovanja i opisom kolonija (Stanković, 2003; Berić, 2010).

a) Uzorci iz sena i slame

Lokalitet	Izolat	Opis kolonije
Točane	1.1	Jedna kolonija: okrugla, ispupčena i sjajna
Bresnica	2.1	okrugla, ispupčena, zatamnjena
	2.2	okrugla, sjajna, sitna
	2.3	okrugla, nepravilnih ivica, velika
	2.4	krugla, unutrašnji prsten, ispupčena.
	2.5	nepravilnih ivica, dosta ispupčena, velika
	2.6	okrugla, mat
	2.7	okrugla, prošarana brazdama
	2.8	nepravilnih ivica, velika, mat
	2.9	okrugla, sjajna
	2.10	veoma sitna
	2.11	okrugla, zatamnjena u sredini, mala.
	2.12	okrugla, sa ispupčenim tačkama u sredini.
	2.13	okrugla, prosušena, išarana brazdama, malo ispupčena.
	2.14	okrugla, sitna
	2.15	okrugla sa smenjivanjem koncentričnih krugova sa tačkama
Točane	3.1	okrugla, nepravilnih ivica, u sredini zatamnjena i ispupčena.
	3.2	okrugla, mat.
Konjuša	4.1	Jedna kolonija okrugla, mala, ispupčena.
Točane	5.1	okrugla, sjajna, ispupčena

	5.2	okrugla, mat, ispupčena.
	5.3	okrugla, ispupčena, delimično sjajna.
	5.4	okrugla, veoma sitna.

b) Uzorci iz zemljišta

Lokalitet	Izolat	Opis kolonije
Paraćin	6.1	okrugla, nepravilnih ivica, dosta ispupčena, izbrazdana.
	6.2	nepravilan krug, oivičen belom trakom izdignutom od kolonije.
	6.3	okrugla, sjajna, malo ispupčena.
	6.4	nepravilan krug i ivice, u sredini ispupčena i izbrazdana.
	6.5	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
	6.6	okrugla, mat-sjajna, izdignuta tačka u sredini.
Mala Plana	7.1	veoma sitne i okrugle kolonije.
Paraćin-kej	8.1	okrugla, mat.
	8.2	okrugla, sjajna, malo izdignuta.
	8.3	okrugla, sitna sa tačkom u sredini.
	8.4	okrugla, sa tačkom u sredini.
Paraćin dvorište	9.1	okrugla, mat.
	9.2	okrugla, sjajna, malo izdignuta.
	9.3	okrugla, sitna sa tačkom u sredini.
	9.4	okrugla, sa tačkom u sredini.
Mala Plana-njiva	10.1	nepravilnog oblika, velika, mat, plato izdignuta.
	10.2	nepravilnog oblika, velika, mat, ispupčena na jednom mestu.
	10.3	okrugla sa izdignutim ivicama.
	10.4	nepravilnog oblika, velika, izbrazdana po obodu (bela), ispupčena na jednom mestu.

	10.5	okrugla, mat-sjajna, sa tačkom u sredini.
	10.6	okrugla, mat-sjajna
	10.7	okrugla, veoma sitna, sjajna.
	10.8	okrugla, izbrazdana na sredini, mala.
	11.1	okrugla, mat-sjajna, u sredini malo izdignuta.
	11.2	okrugla, mat, izbrazdane ivice.
	11.3	okrugla, sjajna, mala.
	11.4	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
Paraćin-park	12.1	nepravilnog oblika, bela, izdignut čep u sredini.
	12.2	kao prethodna sa još dosta nepravilnih izraslina.
	12.3	okruglasta, žućkasto pigmentisana.
	12.4	nepravilnog oblika, mukoidan rast, mat.
	12.5	okrugla, beličasta, sjajna.
	12.6	nepravilnog oblika, izbrazdana po obodu, sa ispupčenjem.
	12.7	okrugla, mala, beličasta.
	12.8	kao prethodna i još delimično prozirna.
	12.9	okrugla, mat-prozirna.
Donje Vidovo	13.1	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
	13.2	sitne kolonije, okrugle, žućkasto pigmentisane u sredini.
	13.3	okrugla, mat sjajna sa tačkom u sredini.
	13.4	okrugla, mat.
	13.5	okrugla, mala, sjajna.
Paraćin-kej	14.1	okrugla, mat-sjajna.
	14.2	okrugla, mala, sa prstenom u centru.
	14.3	okrugla, sjajna.
	14.4	okrugla, mat-sjajna sa tačkom u sredini.
	14.5	nepravilnog oblika, bela sa čepom u sredini.

	14.6	okruglasta, nepravilnih ivica, mat.
Donje Vidovo-plac	15.1	okrugla, mat, nepravilnih ivica, izdignuta u sredini.
	15.2	okrugla, mat-sjajna, mala tačka u sredini.
	15.3	okrugla, nepravilnih ivica, izbrazdano uzvišenje.
	15.4	okrugla, mala, mat-sjajna.
Striža-put	16.1	okrugla, nepravilnih ivica, sa izdignutom tačkom u sredini.
	16.2	okrugla, mat-sjajna.
	16.3	okrugla, mat-sjajna sa izdignutom tačkom u sredini.
	16.4	okrugla, mat.
	16.5	nepravilnog oblika, sa izdignutim prstenom unutra.
	17.1	okrugla, prozirna, sa tamnijim tačkama u sredini.
	17.2	okrugla, žućkasta.
	17.3	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
	17.4	okruglasta, nepravilnih ivica, mat.
	17.5	sitne, sjajne u grozdu.
Zvečka put	18.1	nepravilnog oblika, prozirna.
	18.2	okrugla, mat-sjajna.
	18.3	okrugla, nepravilnih ivica, sitna.
	18.4	Nepravilnog oblika,prozirna
Zvečka-njiva	19.1	u obliku rozete, mat.
	19.2	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
	19.3	okrugla, mat-sjajna i ispupčena.
	19.4	okrugla, žućkasto sjajna.
Zvečka-dvorište	20.1	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
	20.2	okrugla, sjajna.
	20.3	okrugla, mat-sjajna, ispupčena u sredini.
	20.4	okrugla, žućkasto sjajna.

Mala Plana-potok	21.1	okrugla, bela, smežurana u sredini.
	21.2	okrugla, žućkasto-sjajna.
	21.3	okrugla, mat, prozirna u centru.
	21.4	okrugla, mat-sjajna, žućkasta u sredini.
	21.5	okrugla, mat-sjajna.
	21.6	okrugla, žuta.
	21.7	okrugla, mat, beličasta zona po obodu.
Valjevo	22.1	okrugla, žućkasto-narandžasta tačka u sredini.
	22.2	Okrugla, mat
	22.3	okrugla, mat-bela.
	22.4	nepravilnog oblika, sjajna.
	22.5	okrugla, sa izdignutom tačkom, mat.
Valjevo	23.1	okrugla, sa izraženim prstenom, mat.
	23.2	okrugla, mat-sjajna.
	23.3	okrugla sa izraženim prstenom, u centru bela.
	23.4	okrugla mat
Beograd	31.1	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
	31.2	okrugla, bela, cela ispupčena.
	31.3	nepravilnog oblika, mat-prozirna.
	35.1	okrugla, bela, mat, sa istaknutim prstenom po obodu.
Kaluđerica	35.2	nepravilnog oblika, žućkasto-prozirna.
	35.3	okrugla, bela, sjajna.
	35.4	okrugla, bela, mat-sjajna, izdignuta u sredini.
Kaluđerica	35.5	okrugla, bela, mat.
	35.6	okruglasta, nepravilnih ivica, prozirna.
	35.7	okrugla, žućkasta, mala.
	35.8	okrugla, žuta, sjajna.
Erdevik	36.1	okrugla, nepravilnih ivica, mat-bela.
	36.2	okrugla, mala, sa prstenom u sredini.
	36.3	okrugla, mat bela, izdignuta u centru.

	36.4	okrugla, sjajna, bela, izdignuta u centru.
	36.5	okruglasta, velika, mat.
	36.6	okruglasta, mala, sjajna.
Ovča	37.1	okrugla, mat-bela.
	37.2	okrugla, sjajna, bela.
	37.3	okrugla, mat-bela, sa istaknutim prstenom po obodu.
	37.4	nepravilnog oblika i ivica, prozračna.
	37.5	okrugla, mat, deluje izbrazdano i isušeno.
	37.6	okrugla, žućkasta, prozirna.
	37.7	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
D.Vidovo	38.1	okrugla, mat, nepravilnih ivica.
	38.2	okrugla, mat-sjajna, izdignuta u sredini, bela.
	38.3	okrugla, sitna, sjajna, bela.
	38.4	okrugla, sitna, sjajna, žuta.
Košutnjak	39.1	okrugla, bela, mat, izdignuta u sredini.
	39.2	okrugla, bela, sjajna.
	39.3	okrugla, bela, sa istaknutim prstenom po obodu.
Prokuplje	40.1	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
	40.2	okrugla, žućkasta, prozirna.
	40.3	okrugla, po površini išarana, deluje isušeno, tačka u centru.
	40.4	okrugla, deluje isušeno.
	40.5	okrugla, sa izdignutim čepom u sredini.
	40.6	okrugla, bela, sjajna.
Beograd	50.1	okrugla, nepravilnih ivica, suva, žućkasta
	50.2	okrugla, nepravilnih ivica, pahuljičasta, suva, žućkasta
	50.4	okrugla, podseća na plik, vlažna, bež

c) Uzorci iz đubriva

Lokalitet	Izolat	Opis kolonije
26	26.1	nepravilnog oblika, mat, sa izdignutim pečatom.
	26.2	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
	26.3	nepravilnog oblika, mukoidna, mat.
	26.4	okrugla, mat bela.
	26.5	okrugla, sjajna, bela.
	26.6	okrugla sa ispupčenjem u sredini.
	26.7	okrugla, prozračna sa mat ivicama.
26	26.8 *	okrugla, prozračna sa mat ivicama.
	26.9 *	okrugla, prozračna sa mat ivicama.
	26.10*	okrugla, deluje paučinasta sa belim uzvišenjem.
27	27.1	okrugla, mat, nepravilnih ivica.
	27.2	okrugla, mat-sjajna, malo izdignuta u sredini.
	27.3	okrugla, mat-sjajna, sa sjajnim uzdignućem u sredini.
	27.4	okrugla, deluje isušeno, nabrana ka sredini uzdužno.
	27.5	okrugla, bela, sjajna.
	27.6	okrugla, bela, sa čepom u sredini.
	27.7	okrugla, oivičena belim prstenom, u sredini providna.
	27.8 *	pravilnog oblika, velika
	27.9 *	okrugla, mala, prozračni prsten,
28	28.1	okrugla, bela, sjajna.
	28.2	okruglasta, beličast prsten po ivici, prozirno-žuta.
	28.3	nepravilnog oblika i ivica, mat.
	28.4	okrugla, beličast prsten okolo i u centru beličasto uzvišenje.
	28.5	okrugla, mat-bela.

	28.6	okruglasta, mat, malo uzvišena u sredini.
29	29.1	okrugla, žućkasta, sjajna.
	29.2	okrugla, nepravilnih ivica, mat.
	29.3	okrugla, bela, sjajna.
	29.4	okrugla, sa prstenom, mat-sjajna.
	29.5	okrugla, mat, izdignuta u sredini.
	29.6	okrugla, belo-prozirna, sjajna.
	29.7 *	okrugla, belo-žuta, sa velikom belom površinom u centru.
30	30.1	okrugla, bela sa nepravilnim uzdignućem u sredini.
	30.2	okruglasta, mat providna.
	30.3	okrugla, veoma sitna.
	30.4	okruglasta, nepravilna, žućkasto-prozirna.
	30.5 *	nepravilnih ivica, mat, prozirna.
	30.6 *	nepravilnog oblika, velika, deluje sluzavo.
	30.7 *	ogromna, prekriva polovinu petri kutije, prozirna.
32	32.1	okrugla, beličasta, mat.
	32.2	okrugla, žuta, sa tačkom u sredini.
	32.3	okrugla, bela, bela, izdignuta u sredini.
	32.4	okrugla, beličasta sa crnom tačkom u sredini.
	32.5 *	okrugla, bela, prikriivena drugom.
	32.6 *	okrugla, sa prstenom, u sredini providna.
	32.7 *	nepravilnog oblika i deluje sluzavo.
	32.8 *	okrugla i sa providnim prstenom, u sredini mat.
33	33.1	okrugla, nepravilnog oblika po svim nivoima.
	33.2	okrugla, nepravilnih ivica, malo zatamnjena u centru.
	33.3	beličasta, prozirna, nepravilnih ivica.
33	33.4	okrugla, bela, mat.
	33.5 *	nepravilnog oblika, smežurana.

	33.6 *	bela, izdignuta, okrugla.
	33.7 *	okruglasta sa prstenom spolja i tamnija u centru.
	33.8 *	prekriva celu petri kutiju.
34	34.1	neppravilnog oblika po svim nivoima, sjajna.
	34.2	okrugla, mat-ptovidna.
	34.3	okrugla, bela-mat.
	34.4	okrugla, žućkasta, providna.
	34.5 *	okrugla, bela, sa tačkicama u sredini.
	34.6 *	okrugla, mat, sa belim tačkicama.
	34.7 *	prekriva celu petri kutiju.

Dodatak 2. Uticaj bakteriocina liheniocina i ekstrakta bakteriocina soja BGBU1-4 na produkciju biofilma stafilokoka i *L. monocytogenes*

Tabela 21. Uticaj liheniocina 50.2 na produkciju biofilma stafilokoka

Soj	Liheniocin 50.2 (AU/ml)					
	12,5 AU	6,25 AU	3,12 AU	1,5 AU	0,75 AU	Kontrola
<i>S. epidermidis</i> 1	2	2	2	2	2	2
<i>S. epidermidis</i> 18	2	2	2	3	3	3
<i>S. epidermidis</i> 20	2	1	2	2	2	2
<i>S. epidermidis</i> 24	2	2	3	3	3	3
<i>S. lugdunensis</i> 9	1	2	2	2	2	2
<i>S. hominis</i> 10	2	2	2	2	2	2
<i>S. hominis</i> 27	1	1	1	1	2	3
<i>S. haemolyticus</i> 16	1	1	1	1	1	3
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3	3	3	3	3	3
Statist. značajnost	p<0.05	p<0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	

* 0 – ne formira se biofilm; 1- slaba produkcija biofilma; 2 - umerena produkcija biofilma; 3 - izražena produkcija biofilma

Tabela 22. Uticaj liheniocina 50.2 na produkciju biofilma *L. monocytogenes*

<i>L. monocytogenes</i>	Liheniocin 50.2 (AU/ml)					
	25 AU	12,5 AU	6,25 AU	3,12 AU	1,5 AU	Kontrola
3	2	3	2	2	2	1
4	3	3	3	3	3	3
5	3	3	3	3	3	3
9	3	2	2	2	2	2
10	3	3	3	3	3	2
11	3	3	3	3	2	2
14	3	3	3	3	2	3
16	3	3	3	3	3	3
17	3	2	3	2	2	3
18	2	2	3	3	2	3
19	2	2	2	2	2	3
20	1	1	2	1	2	3
ATCC 19111	2	1	1	1	2	2
Statist. značajnost	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	

* 0 – ne formira se biofilm; 1- slaba produkcija biofilma; 2 - umerena produkcija biofilma; 3 - izražena produkcija biofilma

Tabela 23. Uticaj ekstrakta soja BGBU1-4 na produkciju biofilma stafilokoka

Soj	Ekstrakt soja BGBU1-4 (AU/ml)					
	25 AU	12,5 AU	6,25 AU	3,12 AU	1,5 AU	Kontrola
<i>S. epidermidis</i> 1	3	3	3	3	3	2
<i>S. epidermidis</i> 18	3	3	3	3	3	3
<i>S. epidermidis</i> 20	3	3	3	3	3	2
<i>S. epidermidis</i> 24	3	3	3	3	3	3
<i>S. haemolyticus</i> 16	3	3	3	2	2	3
<i>S. hominis</i> 10	3	3	3	3	3	2
<i>S. hominis</i> 27	3	3	3	3	3	3
<i>S. lugdunensis</i> 9	3	2	3	2	2	2
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3	3	3	3	3	3
Statist. značajnost	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	

* 0 – ne formira se biofilm; 1- slaba produkcija biofilma; 2 - umerena produkcija biofilma; 3 - izražena produkcija biofilma

Tabela 24. Uticaj ekstrakta soja BGBU1-4 na produkciju biofilma *L. monocytogenes*

<i>L. monocytogenes</i> izolat	Ekstrakt soja BGBU1-4 (AU/ml)								
	6,25 AU	3,12 AU	1,50 AU	0,75 AU	0,31 AU	0,15 AU	0,07 AU	0,03 AU	Kontrola
3	0	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	3	3	3	3	3	3	3	3
5	0	1	3	3	3	3	3	3	3
9	0	1	1	1	2	2	2	2	2
10	1	1	1	1	2	2	2	2	2
11	0	1	1	2	2	2	2	2	2
14	0	2	2	2	2	3	3	3	3
16	2	3	3	3	3	3	3	3	3
17	1	1	2	3	3	3	3	3	3
18	1	2	3	3	3	3	3	3	3
19	1	3	3	3	3	3	3	3	3
20	1	1	3	3	3	3	3	3	3
21	0	1	2	2	2	2	2	2	2
Statist. značajnost	p<0.01	p<0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	

* 0 – ne formira se biofilm; 1- slaba produkcija biofilma; 2 - umerena produkcija biofilma; 3 - izražena produkcija biofilma

OPŠTI I PODACI O AUTORSKIM PRAVIMA

BIOGRAFIJA AUTORA

Veselin D. Draganić je rođen 30.06.1986. godine u Nikšiću, Republika Crna Gora. Osnovnu i srednju školu je završio u Nikšiću. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2005./06, studijska grupa Biologija, a diplomirao 2010. godine. Diplomski rad pod nazivom „Sezonska dinamika populacija mikroorganizama šaranskih ribnjaka na oglednom dobru Radmilovac“, uradio je na Katedri za Mikrobiologiju Biološkog fakulteta pod rukovodstvom dr Slaviše Stankovića, docenta Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Jedan je od osnivača studentskog Parlamenta Biološkog i njegov član od osnivanja. Tokom studija je u dva mandata obavljao funkciju studenta prodekana Biološkog fakulteta.

Školske 2010./11 godine upisao je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Mikrobiologija. Od januara 2011. do septembra 2012. godine angažovan je kao istraživač-pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije OI 173026 „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“, a od septembra 2012. do februara 2013. godine u zvanju istraživač-saradnik. Na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 2008-2013. godine je bio uključen u praktični deo nastave na predmetima Mikrobiologija i Mikrobiološki praktikum, a od 2011. – 2013. u okviru seminara u Istraživačkoj stanici Petnica, u svojstvu saradnika. Od 2013. godine angažovan je na radnom mestu embriologa na Odeljenju za arteficialne reproduktivne tehnike na Ginekološko akušerskoj klinici „Narodni front“. Veselin Draganić je član Evropskog udruženja za humanu reprodukciju i embriologiju (ESHRE). Dobitnik je oktobarske nagrade za 2013. godinu opštine Rakovica iz oblasti ekologije.

Do sada je objavio 3 naučna rada i imao 8 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Изјава о ауторству

Потписани Веселин Д. Драганић

број уписа Б3036/2010

Изјављујем

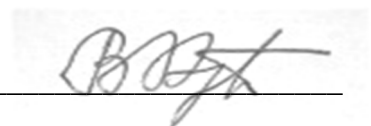
да је докторска дисертација под насловом

„Идентификација и генотипизација колекције *Bacillus* spp. изолата:
карактеризација бактериоцина лихениоцина 50.2“

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

У Београду, 29.07.2017.

Потпис докторанда



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

Име и презиме аутора Веселин Д. Драганић

Број уписа Б3036/2010

Студијски програм Биологија/Микробиологија

Наслов рада „Идентификација и генотипизација колекције *Bacillus*
spp. изолата: карактеризација бактериоцина
лихеницина 50.2“

Ментори проф. др Тања Берић
 проф. др Елиана Гаралејић

Потписани Веселин Д. Драганић

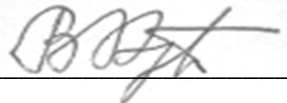
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 29.07.2017.



Изјава о коришћењу

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

Идентификација и генотипизација колекције *Bacillus* spp. изолата:

карактеризација бактериоцина лихениоцина 50.2

која је моје ауторско дело.

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

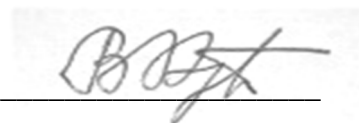
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

У Београду, 29.07.2017.

Потпис докторанда



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 прераде. 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 прераде. 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.