

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На X редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.09.2014. године, прихваћен је извештај ментора др Славише Станковића о урађеној докторској дисертацији Ивице З. Димкића, истраживача сарадника на Катедри за микробиологију Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом „**Карактеризација антимикуробних супстанци природних изолата *Bacillus* sp. за примену у биолошкој контроли фитопатогених бактерија и гљива**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Славиша Станковић, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Тања Берих, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Ђорђе Фира, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Јелена Лозо, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду и др Татјана Стевић, научни сарадник, Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ Београд. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Ивице Димкића, под насловом „**Карактеризација антимикуробних супстанци природних изолата *Bacillus* sp. за примену у биолошкој контроли фитопатогених бактерија и гљива**“, обухвата 199 страна и садржи 7 поглавља: Увод (31 страна), Циљеви (1 страна), Материјал и методе (25 стране), Резултати и дискусија (90 стране), Закључци (4 стране), Литература (28 страна) и Прилог (20 страна). На почетку дисертације приложен је апстракт на српском и енглеском језику. Дисертација садржи: 24 табеле и 52 слике. Поглавље литература садржи 342 библиографске јединице.

Анализа докторске дисертације:

У докторској дисертацији кандидат Ивица Димкић је приказао и окарактерисао различите аспекте примене антимикуробних супстанци природних изолата *Bacillus* sp. у биолошкој контроли фитопатогених бактерија и гљива.

У поглављу **УВОД**, кандидат је у оквиру три подпоглавља дао детаљан приказ досадашњих истраживања, која се односе на допринос биолошке контроле и развој биопестицида, са посебним освртом на врсте из род *Bacillus*, као веома значајне изворе биолошки активних једињења. Посебну пажњу кандидат је посветио нерибозомално синтетисаним липопептидним једињењима са антагонистичком активношћу, са нагласком на итуринску, сурфактинску, фенгицинску и курстакинску фамилију. Кандидат се бави и директним утицајем наведених фамилија на раст фитопатогена, као и недостацима и будућим улогама биопестицида базираних на врстама рода *Bacillus*.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ** кандидат је поставио неколико циљева: тестирање колекције *Bacillus* sp. изолата на присуство гена одговорних за производњу различитих класа нерибозомално синтетисаних липопептида; одређивање антимикуробног спектра изабраних

изолата продуцентата липопептидних једињења и праћење динамике њихове синтезе; испитивање антимикробног ефекта липопептидних екстраката одабраних изолата *in vitro*; утврђивање типа интеракција и минималне инхибиторне концентрације липопептидних екстраката појединачно и у различитим комбинацијама *in vitro*, као и типа интеракција екстракта и етарских уља на клијавост и инфицираност семена невена *in situ*; испитивање ефекта липопетидних екстраката одабраних изолата, на некрозе ткива листова, изазване бактеријама и некрозе плодова изазване гљивама, *in planta*; изоловање и пречишћавање липопептидних једињења одабраних изолата и карактеризација масеном спектрометријом; карактеризација активних антимикробних супстанци липопептидних једињења одабраних изолата високоефикасном танкослојном хроматографијом праћеном индиректном биоаутографијом.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** организовано је у 2 подпоглавља. Дат је приказ антагонистичких изолата рода *Bacillus*, као и бактеријских и фунгалних фитопатогена, различитог порекла, на којима је испитиван антимикробни потенцијал одређених *Bacillus* изолата. Описани су поступци рада са бактеријама, гљивама и генетичким материјалом антагониста. Такође, описани су и поступци изоловања и пречишћавања липопептидних једињења, као и њихова детекција коришћењем масене спектрометрије и високоефикасне танкослојне хроматографије. Приказана је методологија изолације ДНК и умножавања пет различитих гена, одговорних за продукцију антимикробних једињења, као и филогенетска анализа одређених изолата. Описани су и поступци испитивања директног антимикробног ефекта *Bacillus* изолата и њихових липопептидних екстраката *in vitro*, *in situ* и *in planta*, као и експерименти за одређивање динамике раста и производње антимикробних супстанци. Такође, приказани су поступци којима кандидат доказује потенцијалне синергистичке ефекте међу самим екстрактима и заједно са етарским уљима, коришћењем дифузионих и дилуционих метода. У статистичкој обради података кандидат користи параметријске статистичке анализе (One and Two-way ANOVA) у програму Statistica v.7.0 (StatSoft, UK) и IBM SPSS Statistics v.20 (SPSS, Inc.).

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА**, кандидат је добијене резултате организовано у 4 подпоглавља дискутујући их кроз литературне податке. У првом и другом подпоглављу су представљени резултати изолације и детерминације изолата рода *Bacillus* и фунгалних патогена једанаест ново окарактерисаних гљива изолованих са семена невена. У трећем подпоглављу, кандидат је приказао резултате детекције, производње и начина деловања одређених изолата *Bacillus*, односно липопептидних екстраката. Кандидат на самом почетку овог подпоглавља приказује резултате скрининга на присуство биосинтетичких оперона најзначајнијих биоактивних липопептида из фамилија итурина, сурфактина, фенгицина и курстакина. Одређени фрагменти добијени у PCR реакцијама су секвенцирањем потврдили присуство биосинтетичких оперона, са високим степеном хомологије на нивоу секвенце са претходно анализираним генима. За највећи број изолата (171 изолат) је детектован ДНК фрагмент који одговара бациломицин Д синтетази. Такође, код великог броја изолата су добијене очекиване величине фрагмената у случају курстакинског (154 изолата) и сурфактинског оперона (142 изолата), за разлику од очекиваних фрагмената итуринског оперона чије је присуство потврдило свега 84 изолата. Најмања учесталост у колекцији је детектована за ген за фенгицин синтетазу са 59 изолата. Укупно 11 изолата колекције је показало присуство на свих пет биосинтетских гена. Даљи приказ резултата кандидата, укључује почетни скрининг антимикробне активности пет изабраних изолата *Bacillus* који је извршен дифузионом методом на 20 сојева бактеријских патогена. Снажан антибактеријски ефекат је потврђен против 17 изолата *X. arboricola* pv. *juglandis*. Упоредо, методом двојне култивације одабраних *Bacillus* изолата и најзначајнијих фитопатогених гљива изолованих са плодова воћа и поврћа (*Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Botryosphaeria obtusa*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Fusarium*

oxysporum, *F. solani*, *Monilinia fructigena*, *Mucor* sp., *Penicillium expansum*), показан је јак антифунгални ефекат. Кандидат затим приказује и резултате везане за утврђивање корелације нивоа биосинтезе активних супстанци и фазе раста бактеријске културе одабраних изолата, однос производње и уласка у фазу спорулације, као и утицај различитих медијума и услова гајења на укупну антимикуробну активност. Сојеви гајени у ЛБ медијуму дали су највеће зоне инхибиције у стационарној фази, у поређењу са осталим медијумима за гајење, што је показало да квалитет медијума значајно утиче на активност. Показано је да синтеза и/или секреција ових супстанци почиње у раној експоненцијалној фази, пре процеса спорулације, а максимум активности је достигнут на почетку стационарне фазе и траје све до њеног завршетка. Поред доказаних позитивних резултата антимикуробног деловања изолата, кандидат је посебну пажњу у наставку овог подпоглавља, посветио испитивању деловања липопептидних екстраката одабраних изолата *Bacillus*. За изоловање цикличних нерибозомално синтетисаних липопептида коришћена је директна екстракција из супернатанта бактеријске културе помоћу различитих органских растварача. Приликом утврђивања минималне инхибиторне концентрације (МИС), кандидат је користио екстрате добијене различитим методама екстракције појединачно и у различитим комбинацијама, како би се утврдио допринос и однос појединачних екстраката у антибактеријској и антифунгалној активности. Тестиране комбинације против већине бактеријских патогена су показале углавном индиферентан или адитивни ефекат, а синергизам је уочен за комбинацију изолата SS-12.6 и SS-38.4 у случају одређених сојева патогена *X. arboricola*. Микродилуционом методом показана је и веома добра антифунгална активност тестираних екстраката и уочене су значајно ниже концентрације потребне за инхибицију раста, него што је то био случај у тестирању бактеријских патогена. Најниже МИС вредности су добијене за гљиве рода *Fusarium* и врсту *Aspergillus ochraceus*. Такође, остварени синергистички тип интеракције према *A. flavus* је потврђен у свим комбинацијама екстраката, као и у појединим комбинацијама екстраката против *F. oxysporum*. Кандидат је овај антагонистички ефекат потврдио и у експериментима *in planta*, с обзиром да је то једини приступ који може да доведе до идентификације сојева са стварним капацитетом за употребу у биолошкој контроли. Тестирање је дало одговарајуће резултате на плодовима јабука, где су одређени сојеви из рода *Bacillus* показали значајан капацитет у редукцији појаве болести и пропадања биљног ткива изазваним фитопатогеним гљивама. Такође, кандидат је представио и тестирања директног антагонизма липопептидних екстраката и утврђивања антибактеријске активности коришћењем метода инокулације листова. Када је испитивао протективни ефекат пет метанолних екстраката (SS-10.7, SS-12.6; SS-13.1; SS-27.2 и SS-38.4) на раст индикаторског соја високе патогености *X. arboricola* pv. *juglandis*, користио је биљни модел систем *Arabidopsis thaliana*. На основу литературних података до којих је дошао кандидат, ово је први резултат коришћења овог модел система и бактеријске врсте *X. arboricola*, која је довела до сушења листова као и одумирања читаве биљке. Након 14 дана од инокулације контролне биљке, инокулисане само патогеном, показивале су симптоме сушења целе биљке, за разлику од биљака инокулисаних смешом патогена и екстрактами сојева SS-12.6, SS-27.2 и SS-38.4, где симптоми сушења нису забележени. Такође, показано је да сами липопетидни екстракти нису токсични за биљку. Највећу пажњу у *in planta* експериментима кандидат је посветио изолатима *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, патогену шећерне репе. Приказан антибактеријски ефекат одређених липопептидних екстраката, а индиректно и продуцентских изолата овим истраживањем добија на значају у будућим истраживањима и потенцијалној примени у биолошкој контроли имајући у виду да је Србија велики произвођач шећерне репе југоисточне Европе. У следећем сегменту кандидат је посветио пажњу приказу потенцијалног синергизма липопептида у комбинацији са етарским уљима чубра и мајчине душице против фитопатогених гљива пореклом са семена невена, *in vitro*. Изузетно добра антифунгална активност, са правим синергистичким ефектом детектована је у комбинацији екстракта SS-12.6 са уљем чубра на раст *A. alternata*, са уљем мајчине душице против *F. nygamai* и у комбинацији са оба уља на *F. solani*. Поред испитивања *in vitro*,

кандидат је тестирао и потенцијал синергистичког деловања у *in situ* условима, на семену невена, при чему је испитивана антифунгална активност и ефекат на клијавост семена. Показано је да шестосатни третман семена невена (са природном инфекцијом гљивама) само са липопептидним екстрактом соја SS-12.6, као и у комбинацији са етарским уљима чубра и мајчине душице (адитивни ефекат) доводи до значајне редукције у инфекцији гљивама, без штетног ефекта на клијавост семена. Кандидат је такође приказао и резултате пречишћавања и екстракције липопептидних екстраката. Приказани су и резултати детекције липопептидних једињења у различитим екстрактима коришћењем МАЛДИ-ТОФ уређаја (енг. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight). Коришћењем масене спектрометрије показана је њихова разноврсност и доминантно присуство чланова итуринске и сурфактинске фамилије на основу претпостављених *m/z* вредности. Овом методом је показано да етил-ацетатна екстракција даје најбољи принос ових једињења. Истовремено, за потврду и анализу добијених профила липопептида кандидат приказује резултате добијене високо ефикасном танкослојном хроматографијом, односно индиректном биоаутографском методом и пореди их са комерцијално доступним стандардима липопептида. На тај начин кандидат показује да је за антибактеријски ефекат липопептидних екстраката највероватније одговорно једињење из итуринске фамилије. У последњем подпоглављу кандидат описује карактеризацију одабраних сојева до нивоа врсте коришћењем биохемијских комерцијалних тестова (API 50 СНВ и API 20 Е), као и на основу анализе резултата секвенцирања гена за 16S рРНК. Филогенетска реконструкција одабраних *Bacillus* sp. изолата базирана на секвенци гена за 16S рРНК је показала да изолати: SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 и SS-38.4 показују највише сличности са *Bacillus amyloliquefaciens*, односно *Bacillus pumilus* у случају изолата SS-10.7.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидат сумира добијене резултате из докторске дисертације. Изводи закључке на основу резултата добијених у *in vitro*, *in situ* и *in planta* студијама који се односе на сагледавање доприноса липопептидних једињења, изолата из различитих еколошких ниша, у смислу начина продукције, спектра деловања, типа интеракција и минималних инхибиторних концентрација, као и протективних ефеката редукцијом некрозе ткива листова и плодова. Такође, изводи и закључке о типу интеракција липопептида и етарских уља на клијавост и инфективност семена невена пет одабраних, биохемијски и молекуларно детерминисаних изолата. Исто тако, закључује и резултате структурне карактеризације липопептидних једињења остварене масеном спектрометријом, високо-ефикасном танкослојном хроматографијом и индиректном биоаутографском. На основу свих резултата презентованих у дисертацији, кандидат закључује да се испитивани сојеви могу сматрати безопасним уз опште прихваћени статус сигурних микроорганизама „Generally recognized as safe - GRAS”, а уз остварене резултате потентног антимикуробног деловања, кандидује их за даља истраживања и примену у биоконтроли.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 342 библиографске јединице. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

У поглављу **ПРИЛОГ** детаљно су приказани резултати анализе присуства биосинтетских оперона на основу анализе електофоретских агарозних гелова са ПЦР продуктима, пет умножених гена липопептида. Приказани су и подаци МАЛДИ-ТОФ анализе масених спектра бесћелијских супернатаната, метанолних и етил-ацетатних екстраката изолата SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 и SS-38.4.

Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом урађена су у оквиру националног пројекта “Молекуларна карактеризација бактерија из родова *Bacillus* и *Pseudomonas* као потенцијалних агенаса за биолошку контролу“, ОИ 173026. Добијени резултати, приказани у докторској дисертацији као и они који ту нису укључени, објављени

су у 5 радова, од чега 2 категорије M21, 1 категорије M23, 1 категорије M33 и 1 категорије M52, што потврђује актуелност и перспективу овог приступа у истраживањима примењене микробиологије.

Радови и конгресна саопштења, који чине део докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21** Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., Fira, Dj., 2013. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi, *Biological Control* 65, 312-321.
2. **M21** Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Gođevac, D., Dimkić, I., Stanković, S., 2014. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant, *Industrial Crops & Products* 55, 116-122.
3. **M23** Stanković, S., Mihajlović, S., Draganić, V., Dimkić, I., Vukotić, G., Berić, T., Fira, Đ., 2012. Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp. *Archives of Biological Sciences* 64(4), 1425-1432.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M34** Mihajlović, S., Draganić, V., Dimkić, I., Vukotić, G., Berić, T., Stanković, S., Fira, Đ., 2011. Distribution of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp., 7th Balkan Congress of Microbiology, Belgrade, Serbia, CD of Abstracts.
2. **M34** Živković, S., Ivanović, Ž., Dimkić, I., Gavrilović, V., Stanković, S., Fira, Đ., 2011. Biological control of postharvest fungal pathogens by *Bacillus* sp. 12.6, 7th Balkan Congress of Microbiology, Belgrade, Serbia, CD of Abstracts.
3. **M34** Dimkić, Z.I., Ivanović, Ž., Berić, T., Gavrilović, V., Draganić, D.V., Fira, Đ., Stanković, S., 2013. Biocontrol activity of *Bacillus* strains against natural isolates of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and their molecular characterization. 5th FEMS Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, USB Drive Abstract Book, 2164.
4. **M34** Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Živković, S., Popović, T., Dimkić, I., Stanković, S., Fira, Đ., 2013. Antagonistic effect of *Bacillus* spp. on different phytopathogenic *Agrobacterium* isolates. 5th FEMS Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, USB Drive Abstract Book, 2530.
5. **M34** Fira, Đ., Draganić, V.D., Dimkić, I., Berić, T., Stanković, S., 2013. Antimicrobial activity of new bacteriocin from *Bacillus licheniformis* VPS50.2. 5th FEMS Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, USB Drive Abstract Book, 2403.
6. **M34** Dimkić, Z.I., Stević, R.T., Pavlović, Đ.S., Berić, S.T., Fira A.Đ., Stanković M.S., 2014. The effect of essential oils and antagonistic *Bacillus* isolate on fungal infection and seed germination. 8th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries – CMAPSEEC, Durrës, Albania, Book of Abstracts, 283.

7. **M34** Stević, R.T., Berić, S.T., Šavikin, P.K., Godevac, M.K., **Dimkić, Z.I.**, Stanković, M.S., 2014. Chemical composition and antifungal activity of selected essential oils. 8th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries – CMAPSEEC, Durrës, Albania, Book of Abstracts, 220.
8. **M34** **Dimkić, I.**, Shevic, D., Knezevic, O., Beric, T., Fira, Dj., Stankovic, S., 2014. Monitoring of production of antimicrobial substances from five *Bacillus* sp. isolates in different media. 5-th Congress of Macedonian microbiologists with international participation, Ohrid, Macedonia, Book of Abstracts and Programme, 138-139.
9. **M34** **Dimkić, I.**, Šević, D., Lozo, J., Berić, T., Fira, Đ., Stanković, S., 2014. Detection of genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus* sp. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, Book of Abstracts, 217.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M64** **Dimkić, I.**, Stević, T., Berić, T., Draganić, D.V., Fira, Đ., Stanković, S., 2012. Antagonistička aktivnost prirodnih izolata *Bacillus* sp. prema fitopatogenim gljivama izolovanih iz lekovitog bilja, XIV Simpozijum o zaštiti bilja i IX Kongres o korovima, Zlatibor, Zbornik rezimea radova, 100-101.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Ивица Димкића, под насловом “**Карактеризација антимикробних супстанци природних изолата *Bacillus* sp. за примену у биолошкој контроли фитопатогених бактерија и гљива**” представља свестрано и савремено урађену студију из области примењене микробиологије. По свом обиму, садржају, оригиналности резултата, начину њиховог представљања и интерпретацији, уз осврт на обимну и релевантну литературу, поднети текст има све одлике докторске дисертације. Кандидат је на примерен начин представио истраживачку област у којој је радио и резултате до којих је дошао. Треба истаћи да је кандидат, на основу резултата вишегодишњих истраживања и прегледа веома обимне литературе, формулисао правце даљих истраживања који су, судећи по савременим литературним подацима, веома перспективни.

Комисија сматра да докторска дисертација Ивице Димкића по свом приступу и интерпретираним резултатима представља значајан допринос у примени липопептидних једињења у биолошкој контроли. Поред одговора на постављене непосредне циљеве истраживања, добијени резултати представљају основу за будућа мултидисциплинарна истраживања, уз могућу сарадњу са иностраним истраживачима и институцијама. Комисија са посебним задовољством истиче да је кандидат до сада, из резултата који представљају део докторске дисертације, публиковао 3 рада у часописима од чега 2 у категорији M21, и један у категорији M23. У припреми су још 3 рада из области докторске дисертације, од којих је један тренутно на ревизији. Такође, учествовао је са 10 саопштења на научним скуповима. Ивица Димкић је у току израде докторске дисертације добро оспособљен за самосталан научни рад, што се може закључити на основу увида у досадашње научне активности, као и публикованих резултата у истакнутим научним часописима.

На основу свега изложеног, комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

Београд, 11. фебруар 2014.

Комисија:

др Славиша Станковић, ментор, ванредни професор,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Тања Берић, доцент, члан
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Ђорђе Фира, редовни професор, члан
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Јелена Лозо, ванредни професор, члан
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Татјана Стевић, научни сарадник, члан
Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф
Панчић“, Београд