



Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Izolacija, identifikacija i karakterizacija sojeva

***Bacillus thuringiensis* iz rizosfere pšenice**

-Master rad-

Mentori:

prof. dr Slaviša Stanković
dr Snežana Đorđević, viši naučni saradnik

Student

Anđela Dujović

B1005/2021

Beograd, 2024.

Zahvalnica

Zahvaljujem se ovom prilikom mentorima: prof. dr Slaviši Stankoviću, šefu Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, kao i višem naučnom saradniku dr Snežani Đorđević i kompaniji Biounik u čijim laboratorijama je urađen praktični deo ovog master rada, na ukazanom poverenju, znanju i podršci.

Neizmernu zahvalnost dugujem Nikoli Đorđeviću na sugestijama i smernicama tokom istraživanja.

Posebno se zahvaljujem svim kolegama, prijateljima i porodici na podršci za vreme studija

Ovaj rad posvećujem svojim sestrićima, Jakši i Mateji, sa željom da kroz život idu putem obrazovanja i nauke.

Sadržaj

1. UVOD.....	3
1.1. PGP bakterije	3
1.2. Direktni mehanizmi.....	4
1.3. Indirektni mehanizmi.....	6
1.4. <i>Bacillus spp.</i>	7
1.5. <i>Bacillus thuringiensis</i>.....	8
1.5.1. Diverzitet Cry toksina	9
1.5.2. Modeli insekticidnog delovanja Cry proteina.....	10
1.5.3. Primena <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
2. CILJEVI RADA	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Izolacija <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
3.2. Bojenje po Gramu	14
3.3. Biohemijske karakteristike.....	15
3.3.1. Katalaza test.....	15
3.3.2. Test sposobnosti produkcije egzopolisaharida.....	15
3.4. Izolacija DNK i PCR amplifikacija gena za 16s rRNK, <i>tuf</i> i <i>recA</i> gena.....	16
3.5. Molekularna detekcija insekticidnih gena	18
3.5.1. Cyt 1 i Cyt 2.....	18
3.5.2. C1B.....	18
3.5.3. Kurstakin	19
4. REZULTATI	20
4.1. Izolacija bakterija.....	20
4.2. Biohemijske karakteristike.....	20
4.3. Filogenetska analiza- gen za 16s rRNK, <i>tuf</i> i <i>recA</i>.....	21
4.4. Geni za insekticidne proteine- <i>cyt1</i>, <i>cyt2</i>, <i>cry1B</i>, <i>kurstakin</i>	25
6. ZAKLJUČCI.....	30

1. UVOD

Najveći izazov za svetsku poljoprivredu je da obezbedi dovoljnu količinu hrane za populaciju, čije potrebe godišnje rastu za 1,05%. Rast biljaka, prinos i kvalitet hrane biljnog porekla su pod uticajem biotičkog i abiotičkog stresa. Biotički stres obuhvata oštećenja i infekcije, čiji su uzročnici štetočine ili patogeni, dok abiotički stres predstavljaju suša, salinitet zemljišta, temperatura, teški metali i drugi organski zagađivači (Kumar & Singh, 2020).

Primena mineralnih đubriva i hemijskih sredstava za zaštitu bilja je deo savremene poljoprivredne proizvodnje, što obezbeđuje adekvatne prinose. Međutim, unos hemikalija uzrokuje čitav niz negativnih posledica po proizvod, zdravlje ljudi i životnu sredinu, što čini poljoprivredu jednim od najvećih zagađivača, naročito zemljišta i vode. Sa porastom svesti o štetnosti hemijskih proizvoda i neobnovljivosti resursa kao što je zemljište, tragalo se za alternativnim rešenjima, a jedno od njih su bakterije koje promovišu rast biljaka (PGPB, *Planth Growth Promoting Bacteria*) (Karličić, 2017)

Preparati na bazi PGP bakterija su ekološki prihvatljivi, povećavaju prinos useva i proizvodnje i pored toga, u zemljama u razvoju predstavljaju jeftiniju alternativu u odnosu na hemijska đubriva. Ove bakterije mogu uticati na rast biljke svojim direktnim ili indirektnim mehanizmima. (Olanrewaju, 2017)

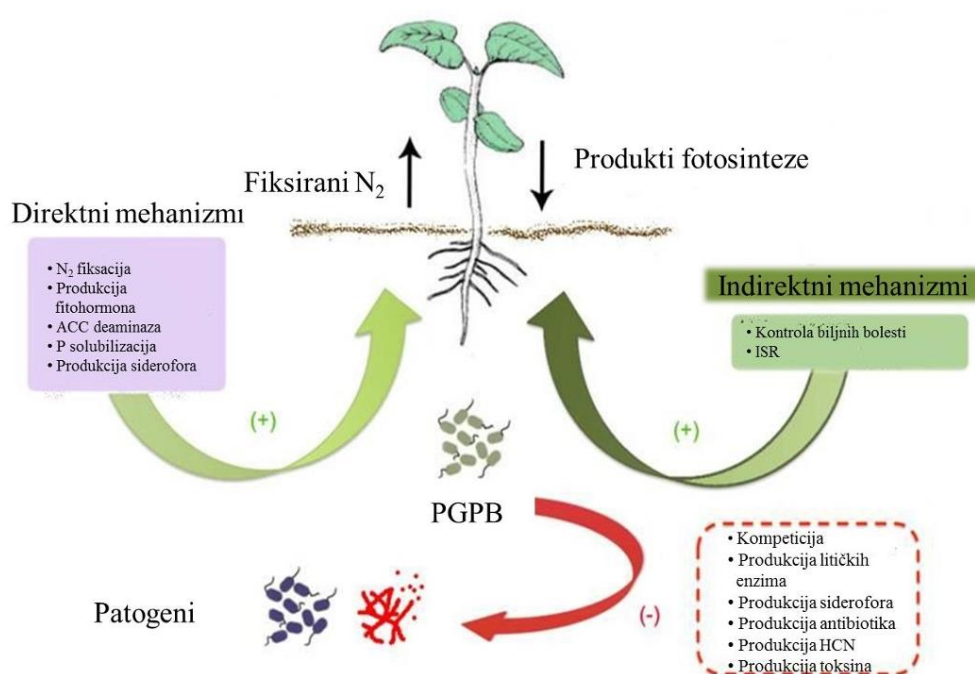
1.1. PGP bakterije

Zemljište obiluje različitim mikroorganizmima, među kojima su bakterije, gljive, aktinomicete, protozoe i alge. Bakterije su najbrojnije, i čine oko 95% zajednice mikroorganizama u zemljištu. Broj i vrsta bakterija koje se nalaze u različitim zemljištima zavise od uslova koji vladaju: vlažnost, temperatura, prisustvo soli i drugih materija. Bakterije nisu ravnomerno raspoređene u zemljištu, najveća koncentracija je u rizosferi. (Glick, 2012). Rizosfera se definiše kao zona zemljišta koja okružuje koren i nalazi se pod njegovim direktnim uticajem (Karličić, 2017). Ključni razlog zašto su bakterije najbrojnije upravo u rizosferi se može pronaći u tome što je u ovoj zoni najveća koncentracija malih molekula (npr. šećera, organskih kiselina, aminokiselina) koji se izlučuju iz korena (Olanrewaju, 2017). Interakcija između biljaka i bakterija može biti korisna, štetna ili neutralna po biljku. Efekti delovanja bakterija na biljku mogu se menjati sa promenama uslova sredine (Glick, 2012). Korisne bakterije, endofite ili slobodnoživeće, na biljku mogu delovati direktno ili indirektno (Majeed, 2018). Procenjuje se da 2-5% rizosfernih bakterija pripada grupi PGPB. Među njima su najzastupljeniji predstavnici roda

Bacillus, Arthrobacter, Azospirillum, Azotobacter, Burkholderia, Beijerinckia, Enterobacter, Erwinia, Flavobacterium, Pseudomonas, Ralstonia, Rhizobium, Serratia, Rhizobium spp., Frankia spp., Anabaena spp., Nostoc spp. (Karličić, 2017).

1.2. Direktni mehanizmi

Direktno delovanje (Slika 1) PGPB ogleda se u procesima fiksacije azota, solubilizacije fosfata, formiranje siderofora i helacija gvožđa, kojima ove bakterije olakšavaju biljci pribavljanje nutrijenata koji su joj neophodni za rast, a često su deficitarni u samom zemljištu. Takođe, PGPB mogu modulirati nivo biljnih hormona, koji imaju ključnu ulogu u rastu i razvoju biljke, kao i u procesu prilagođavanja na uslove sredine. (Glick, 2012)



Slika 1 Direktni i indirektni mehanizmi PGPB (preuzeto iz Karličić, 2017)

Azot je jedan od glavnih limitirajućih faktor za rast biljaka (Yadav, 2017). Iako se obilje azota nalazi u atmosferi (oko 78%), ovakav, gasoviti N₂ oblik azota nije dostupan biljkama, već ga one mogu usvajati samo u obliku amonijum jona (NH₄⁺). Mikroorganizmi koji imaju mogućnost prevođenja atmosferskog oblika azota u amonijum jon, nazivaju se azotofiksatori ili diazotrofi. Nedostatak azota koji nastaje emisijom ili spiranjem (Karličić, 2017), u poljoprivredi se uglavnom nadoknađuje azotnim đubrivima, međutim biološka fiksacija azota je jedna od bioloških alternativa, koja omogućava produktivniju i održivu poljoprivredu bez štete po životnu sredinu (Yadav, 2017).

Fosfor je neophodan nutrijent za svaku živu ćeliju i sastavni je deo važnih makromolekula kao što su ATP, enzimi, fosfolipidi i nukleinske kiseline. U zemljištu je prisutan u nerastvorljivom mineralnom (apatit, hidroksiapatit, oksiapatit) i organskom (inositol fosfati, fosfomonoestri, fosfodiestri, fosfotriestri) obliku (Karličić, 2017). Iako je prisutan u zemljištu nalazi se u nerastvornom obliku, koji je nedostupan za biljku (Glick, 2012). Grupa bakterija označena kao fosfat solubilizujuće bakterije poseduje sposobnost da nerastvorljivi fosfor prevede u rastvorljivu formu i time ga učine dostupnim (Karličić, 2017).

Gvožđe je četvrti element po zastupljenosti na zemlji. Mala količina gvožđa je dostupna živim organizmima, (Gamalero, 2011). Gvožđe ima veoma važnu ulogu za biljku u procesu fotosinteze, deo je sistema koji apsorbuju svetlost, a neophodan je i za brojne puteve biosinteze. Kako bi rešili problem nedostupnog gvožđa, neke bakterije, glive i biljke sintetišu siderofore, koje predstavljaju molekule male molekulske mase (400-1000 Da) čija je uloga vezivanje i sakupljanje gvožđa iz zemljišta. Siderofore koje proizvode PGPB vezuju Fe^{3+} jone sa velikim afinitetom (Olanrewaju, 2017).

Kada se govori o pozitivnim efektima PGPB po rast biljke, ističe se njihova mogućnost da proizvode auksine. Čak 80% rizosfernih bakterija sintetiše i oslobađa auksine kao svoje sekundarne metabolite (Olanrewaju, 2017). Iako postoji nekoliko auksina koji se pojavljuju u prirodi, najbolje proučen je indol-3-acetatna kiselina, IAA, koja se u biljkama uglavnom nalazi u konjugovanom obliku koji je pogodan za skladištenje, transport i zaštitu IAA od degradacije (Gamalero, 2011). Rezultat dejstva IAA na biljku zavisi od koncentracije IAA, vrste biljke i tkiva, kao i od razvojnog stadijuma u kom se biljka nalazi i količine endogenog auksina (Glick, 2012).

Citokinini su široko rasprostranjeni u algama, bakterijama i biljkama. Kontrolišu diferencijaciju ćelija u meristemskim tkivima, deobu ćelija, izduživanje korena, klijanje semena, diferencijaciju ksilema i hloroplasta, razviće cveta i ploda, scenescenciju lista i interakciju sa patogenima (Olanrewaju, 2017). Poznato je da i neke vrste patogena proizvode citokinine. U poređenju sa PGPB koji proizvode manju koncentraciju citokinina, koji imaju stimulatorno dejstvo na rast biljke, patogeni proizvode citokinine u većoj koncentraciji, što deluje inhibitorno na biljku (Glick, 2012).

Giberelini imaju važnu ulogu u stimulaciji rasta i aktiviranju različitih procesa rastezanja, uključujući izduživanje biljke, klijanje semena, cvetanje, zretanje plodova i pospešivanje fotosinteze (Olanrewaju, 2017). Opisano je 136 različitih giberelina. Giberelini su takođe uključeni i u rast korena, regulisanjem broja korenskih dlačica. U ovom procesu, giberelini interaguju sa drugim biljnim hormonima i regulišu njihov nivo. (Gamalero, 2011).

Etilen učestvuje u regulaciji različitih faza u životu biljke poput sazrevanja plodova, starenja cvetova i listova, ali reguliše i odgovor biljke na biotičke i abiotičke stresove. Etilen se u biljci akumulira kao odgovor na abiotički i biotički stres (Karličić, 2017). Etilen na biljku utiče na različite načine: promovisanje i inhibicija izduživanja korena, stimuliše klijanje semena, sazrevanje plodova i opadanje listova (Glick, 2012). Povećane koncentracije mogu inhibirati proces infekcije i nodulacije, dovesti do inhibicije rasta korena, opadanja listova, smanjenja prinosa, uvenuća i starenja biljke (Karličić, 2017). U istraživanjima je otkriveno da veliki broj PGPB produkuje enzim ACC deaminaza, čija je uloga prevođenje prekursora etilena, ACC, u amonijak i α -ketobutirat, što dovodi do smanjenja količine etilena u biljci, i sprečavanja njegovog inhibitornog delovanja na rast biljke (Glick, 2012).

1.3. Indirektni mehanizmi

Različite bolesti biljaka godišnje smanje prinos oko 10% u razvijenim i oko 20% u nerazvijenim delovima sveta (Olanrewaju, 2017). Primena zemljišnih mikroorganizama u borbi protiv biljnih bolesti je jedna od alternativa hemijskim sredstvima zaštite. PGP bakterije mogu i putem indirektnih mehanizama ostvariti svoj uticaj na biljku (Slika 1): indukovanjem sistemske rezistencije (ISR) i suzbijanjem patogena, što postižu uspostavljanjem kompeticijskih odnosa za mesto i hranu, kao i produkcijom metabolita koji deluju mikrobicidno ili mikrobistatički (Karličić, 2017).

Biljka poseduje različite mehanizme odbrane od patogena, koji mogu biti aktivni i pasivni u odnosu na to da li već postoje u biljci ili se aktiviraju nakon infekcije. U pasivne mehanizme odbrane spadaju ćelijski zid, kutikula i različita inhibitorna jedinjenja. Dok aktivna odbrana otpočinje prilikom prvog kontakta biljke sa patogenim mikroorganizmom. (Gašić, 2012) PGPB u biljkama mogu izazvati odbrambeni mehanizam poznat kao Indukovana sistemska rezistencija – ISR. ISR nije specifična prema patogenu. Najveći broj PGPB aktiviraju ISR posredstvom signalnih puteva koje regulišu jasmonati i etilen. ISR od strane PGPB najčešće dovodi do jačanja ćelijskog zida i promene fiziologije domaćina što se ogleda u proizvodnji jedinjenja kao što su peroksidaza i hitinaza. (Karličić, 2017) Za razliku od ISR, kod SSR – stečene sistemske rezistencije, dolazi do akumulacije salicilne kiseline kao signalnog molekula i povećane sinteze PR proteina (proteini koje proizvodi biljka domaćin u stresnim uslovima). (Gašić, 2012)

Kompeticija između patogenih i nepatogenih mikroorganizama, može da ograniči učestalost i težinu bolesti. Nepatogene bakterije, koje se nalaze u zemljištu, vrlo brzo kolonizuju površinu korena i koriste većinu dostupnih hranljivih materija, što otežava rast patogenih mikroorganizama (Glick, 2012).

Najrasprostranjeniji način na koji PGP bakterije regulišu uticaj fitopatogena na biljku je produkcija jednog ili više antibiotika. Antibiotik koji suzbija jednu vrstu biljnog patogena, možda neće imati efekta na druge biljne patogene. Takođe, PGPB koje proizvode antibiotike i njihov efekat mogu zavisi i od uslova sredine u koji se nalaze. Da PGPB proizvode antibiotike koji mogu suzbiti fitopatogene i sprečiti oštećenje biljke dokazano je kroz dva eksperimenta. U prvom je ispitivano dejstvo mutiranih bakterija, koje ne proizvode antibiotike, pri čemu nije došlo do zaštite biljke od oštećenja. U drugom eksperimentu korišćeni su ekstrahovani i prečišćeni antibiotici nekih PGPB i dokazano je njihovo dejstvo protiv biljnih patogena. Veliki broj antibiotika sintetišu vrste rodova *Bacillus* i *Pseudomonas*. Oni proizvode različite metabolite koji imaju antifungalno, antibakterijsko, antihelminičko, antivirno, fitotoksično, antioksidativno, citotoksično i antitumorsko dejstvo (Olanrewaju, 2017).

Mnoge PGP bakterije imaju sposobnost sinteze litičkih enzima, kao što su hitinaza, celulaza, β 1-3 glukanaza, proteaze, lipaze, koje razgrađuju deo ćelijskog zida patogenih bakterija. Bakterije koje sintetišu jednu ili više vrsta ovih enzima, deluju protiv brojnih gijva, parazita biljaka, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* i *Pythium ultimum* (Glick, 2012)

1.4. *Bacillus* spp.

Veliki broj vrsta roda *Bacillus* takođe pokazuje PGP aktivnost. Ćelije roda *Bacillus* su Gram pozitivne, štapićaste bakterije, ravnih ili blago zakrivljenih ivica. Javljaju se pojedinačno, neke formiraju parove, dok se povremeno mogu javiti i u vidu kraćih lanaca, a ređe kao dugačka vlakna. Formiraju spore, ne više od jedne po ćeliji, koje su veoma otporne na nepovoljne uslove sredine. Najveći broj vrsta raste na neselektivnim hranljivim podlogama kao što je hranjivi agar. Morfologija i veličina kolonija se veoma razlikuju između i unutar vrsta. (Logan & Vos, 2009)

Fiziološke sposobnosti su raznolike – od psihrofilnih do termofilnih; od acidofilnih do alkalofilnih. Neki sojevi su tolerantni na soli, dok su drugi halofilni. Najčešće se izoluju iz zemljišta ili okruženja koje je direktno ili indirektno kontaminirano zemljištem. Većina vrsta uopšte nema ili ima veoma mali patogeni potencijal po ljude i životinje.. (Logan & Vos, 2009)

Tri vrste iz *Bacillus cereus* grupe imaju važan uticaj na čoveka. Dok su *Bacillus anthracis* i *Bacillus cereus* označeni kao patogeni, odnosno oportuni patogeni sisara (respektivno), uključujući i ljude, *Bacillus thuringiensis* se koristi u biokontroli insekata. (Vilas-Bôas, Peruca, & Arantes, 2007)

Bacillus anthracis je izazivač bolesti koja se naziva antraks. U odnosu na ostale pripadnike grupe *B. cereus*, većina sojeva *B. anthracis* se može jednostavno prepoznati i izdvojiti. Karakteriše ih nedostatak motiliteta, produkcija kapsule, nedostatak hemolitičke aktivnosti pri gajenju na krvnom agaru i senzitivnost na penicilin. (Vilas-Bôas, Peruca, & Arantes, 2007)

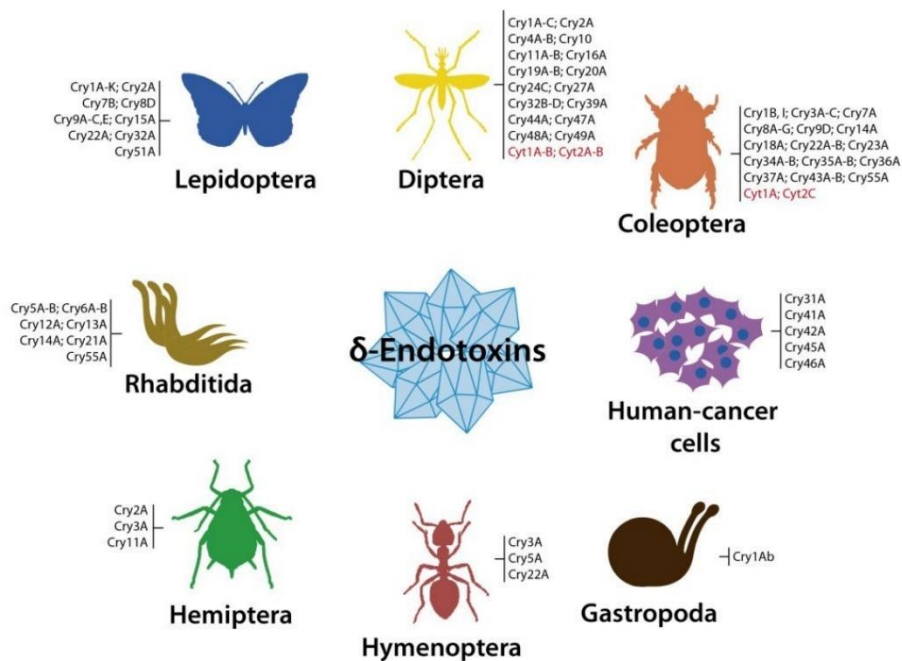
Bacillus cereus je gram pozitivna bakterija, mezofilna, anaerobna bakterija. Može rasti na temperaturama od 10 do 48 °C, sa optimalnim rastom na temperaturama od 28 do 35 °C. Široko je rasprostranjen, može se naći u zemljištu kao saprofit, a takođe i u hrani, biljnog i životinjskog porekla, posebno u mlečnim proizvodima. Najčešće *B. cereus* je pokretna bakterija koja poseduje peritrihe. Na čvrstom medijumu odlikuju je kolonije nepravilnog oblika, a kao izvor ugljenika koristi saharozu. Hidrolizuje škrob i želatin, pokazuje hemolitičke sposobnosti i rezistenciju na ampicilin. (Vilas-Bôas, Peruca, & Arantes, 2007)

1.5. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) je aerobna Gram-pozitivna štapičasta bakterija koja formira spore i može se pronaći u različitim supstratima kao što su zemljište, voda, paukova mreža, skladišteno žito, mrtvi insekti. (Valicente, 2019). Najveći broj karakteristika deli sa sojevima *B. cereus*, kao što su motilitet, potrebe za nutrijentima, hemolitičku aktivnosti i rezistencija na ampicilin. (Vilas-Bôas, Peruca, & Arantes, 2007).

Bt sojevi sintetišu kristalne (Cry) i citolitičke (Cyt) toksine, poznati još i kao δ -endotoksini, (Slika 2) na početku spoulacije i tokom stacionarne faze rasta kao parasporalne kristalne inkluzije. Kada ih larve insekata progutaju, ovi kristali se rastvore u srednjem crevu i proteolitički aktiviraju proteazama srednjeg creva. Nakon toga se vezuju za specifične receptore koji se nalaze na membrane ćelija creva što dovodi do prekida veza među ćelijama i smrti insekta (Palma, 2014)

Takođe, pored pomenutih, Bt su u mogućnosti da sintetišu i druge insekcidalne proteine tokom vegetativne faze rasta – Vip (*vegetative insecticidal proteins*). Vip proteini su klasifikovani u 4 familije – Vip1, Vip2, Vip3 i Vip4 prema stepenu sličnosti amino-kiselinske sekvence. Binarni toksin izgradjen od Vip1 i Vip2 kao i Sip toksin deluju protiv nekih koleoptera, dok su Vip3 toksini efikasni protiv lepidoptera. Spektar domaćina toksina Vip4A1 zasada je nepoznat (Palma, 2014)



Slika 2: Diverzitet δ -endotoksina i njihovo toksično dejstvo na različite organizme i ćelije (preuzeto iz Palma, 2014)

1.5.1. Diverzitet Cry toksina

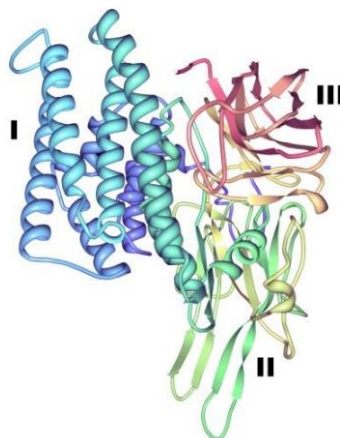
Svi geni za insekticidne toksine kod Bt su smešteni na velikim konjugativnim plazmidima. Cry geni se često nalaze u blizini mobilnih genetičkih elemenata kao što je transpozon Tn4430 i insercione sekvence IS231 i IS232. Lokalizacija Cry gena na elementima koji su odgovorni za horizontalni transfer gena je najverovatnije dovela do njihove višestruke raznovrsnosti među sojevima vrste *Bacillus thuringiensis*. (EHLING-SCHULZ, LERECLUS, & KOEHLER, 2019)

Do sada identifikovano je oko 700 cry gena koji kodiraju Cry kristalne protein, najčešće su ovi geni lokalizovani na velikim plazmidima. Iako mnogo Cry proteina ima insekticidno dejstvo, i našli su svoju primenu u poljoprivredi, postoje Cry proteini čije dejstvo na beskičmenjake nije poznato, oni su nazvani parasporini, pokazuju snažno dejstvo protiv ćelija humanog karcinoma različitog porekla. (Palma, 2014)

Cry proteini su prema primarnoj amino-kiselinskoj sekvenci klasifikovani u 67 grupa (Cry1eCry67) koje su podeljene na 4 filogenetski nesrodne familije: familija Cry proteina koji sadrže tri domena (3D), familija Cry proteina koja deluje protiv komaraca (Mtx), familija binarno sličnih Cry proteina (Bin) I Cyt familija toksina. (Bravo, Likitvivanavong, Gill, & Soberón, 2011)

Najveću grupu čine Cry proteini koji sadrže tri domena. Cry toksini koji pripadaju ovoj porodici, pokazuju različitosti u amino-kiselinskoj sekvenci, ali im je zajedničko da svi ispoljavaju strukturu koja sadrži tri domena. (Slika 3)

Domen I ili perforirajući domen koji je smešten prema N terminusu, izgrađen je od sedam α -heliks klastera koji podležu hidrolizi kod svih Cry toksina izgrađenih od tri domena tokom njihove aktivacije. Ovaj domen može biti odgovoran za umetanje proteina u membranu ćelije o formiranje pora. Domen II (centralni ili srednji domen) sastoji se od tri antiparalelne β -ploče i ima važnu ulogu u interakciji toksin-receptor. Domen III (galaktoza-vezujući domen) koji se takođe proteolitički razlaže kod nekih Cry proteina izgrađen je od dve antiparalelne β -ploče i takođe je uključen u formiranje pora i vezivanje receptora. (Palma, 2014) Domeni II i III su uključeni u vezivanje Cry toksina za proteine srednjeg creva insekata. Zamena domena III bi mogla da dovede do selekcije proteina sa različitim specifičnostima za insekte. (Bravo, Likitvivanavong, Gill, & Soberón, 2011)



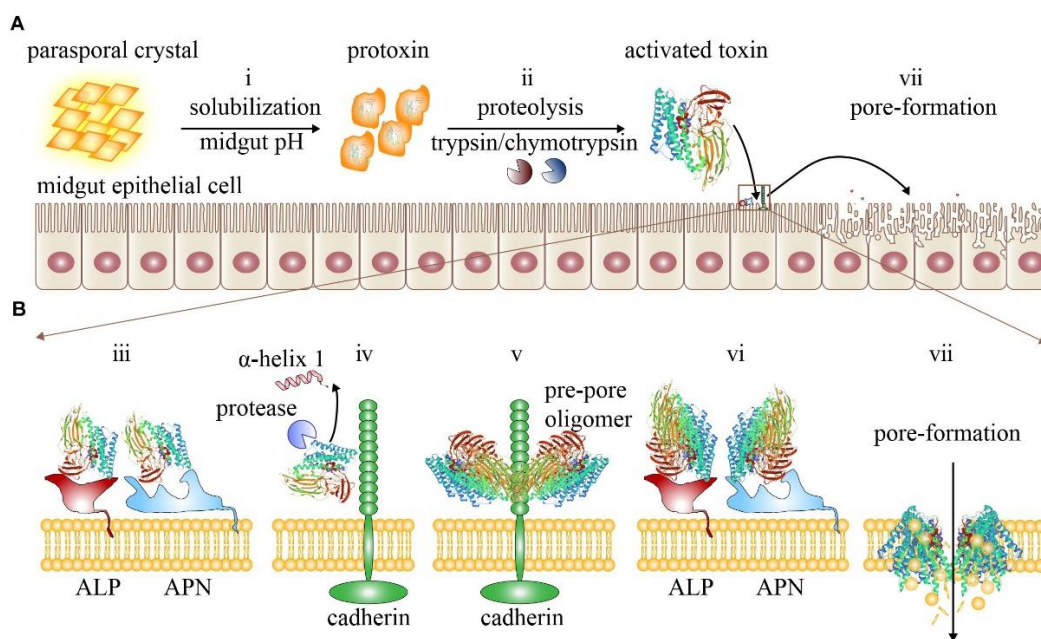
Slika 3: Cry protein sa 3 domena (preuzeto iz Palma, 2014)

Cyt (citotoksični) proteini, kodirani *cyt* genima, čine još jedan relevantan insekticidni protein. Za razliku od Cry proteina, Cyt proteini pokazuju opštu citolitičku (hemolitičku) aktivnost in vitro i pretežno specifičnost prema dipterama in vivo. To su jednodomenski, troslojni alfa-beta proteini. (Bravo, Likitvivanavong, Gill, & Soberón, 2011) Nasuprot Cry proteinima Cyt proteini direktno komuniciraju sa lipidima membrane i umeću se u nju. Cyt sinergizuju sa Cry toksinima ili prevazilaze rezistenciju organizma na njih, tako što npr. kod komaraca, predstavljaju receptor u membrani za koji se vezuju Cry toksini. (Bravo, Gill, & Soberon, 2007)

1.5.2. Modeli insekticidnog delovanja Cry proteina

Postoje dva opšteprihvaćena mehanizma insekticidnog delovanja Cry proteina: model sekvencijalnog vezivanja i model signalnog puta.

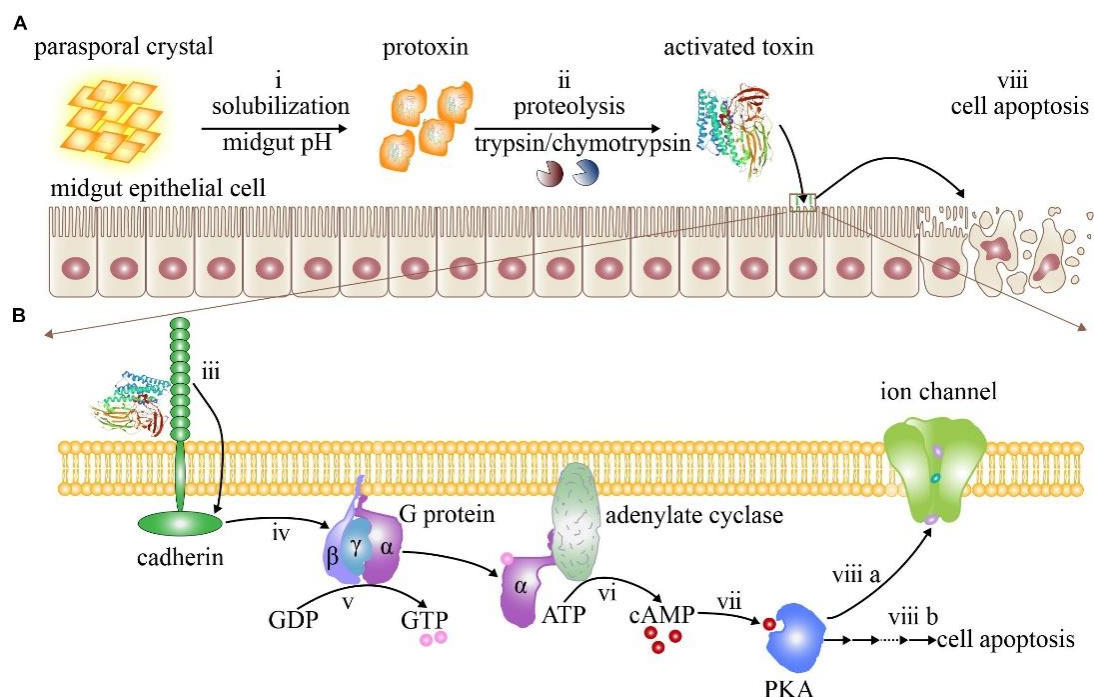
Model sekvencijalnog vezivanja ili klasičan model delovanja (Slika 4): podrazumeva model u više koraka sa posebnim osvrtom na specifično vezivanje Cry toksina za različite receptore membrane epitelnih ćelija srednjeg creva na sekvencijalan način, ovi toksini postanu zreli i formiraju oligomere koji se naknadno ubacuju u ćeliju uzrokujući perforacije i osmotsku neravnotežu i dovode do lize ćelija i smrti insekata. Parasporalni kristali se najpre rastvaraju i oslobađaju u tečnosti creva kako bi se formirali protoksini. Protoksini se zatim hidrolizuju proteazama creva kako bi se formirali monomerni Cry toksini. Aktivni Cry toksini mogu da se vezuju sekvencijalno za receptore epitelnih ćelija srednjeg creva insekta kako bi mogli da iniciraju formiraju pore. Monomerni Cry toksini se najpre reverzibilno vezuju za ALP i APN receptore ćelijske membranje. Kada je region oko membrane obogaćen monomernim Cry toksinima, oni se nepovratno vezuju za kadherinske receptore, sa većim afinitetom olakšavajući proteolizu α -heliksa na N terminusu domena I. Monomeri Cry toksina se odvajaju, vezuju se za kadherinske receptore formirajuć pre-pora oligomere. Nakon formiranja pre-pora oligomera Cry toksini se vezuju za ALP i APN receptore sa visokim afinitetom. Oligomeri se insertuju u membranu epitelnih ćelija dovodeći do perforacije i lize ćelija.



Slika 4: Model sekvencijalnog vezivanja (preuzeto iz Liu i sar., 2021)

Model signalnog puta -proces aktivacije Cry toksina i apoptoze ćelija u epitelnim ćelijama srednjeg creva (Slika 5). Parasporalni kristali se rastvaraju i oslobađaju u crevnu tečnost insekata nakon što ih insekti progutaju. Protoksini se hidroliziraju i aktiviraju kako bi se oslobodili aktivni Cry toksini. Aktivni Cry toksini se vezuju za kadherinske receptore. Pokreće se serija nizvodnih ćelijskih signalnih kaskada zavisnih od Mg^{2+} . G proteini se aktiviraju da sintetišu GTP. Adenilat

ciklaze su sada aktivirane da sintetišu cAMP. PKA se aktiviraju nakon vezivanja sa cAMP. Aktivirani PKA zatim destabilizuju jonske kanale u membrani epitelnih ćelija srednjeg creva ili pokreću dalje nizvodne ćelijske signalne kaskade, što dovodi do apoptoze ćelije. (Liu, i drugi, 2021)



Slika 5: Model signalnog puta (preuzeto iz Liu i sar., 2021)

1.5.3. Primena *Bacillus thuringiensis*

Povećana je popularnost bioloških sredstava za kontrolu u odnosu na sintetičke hemikalije, koje imaju neselektivno smrtonosno dejstvo i brzo izazivaju razvoj rezistencije insekata štetočina na sintetičke insekticide. Bt toksini su zauzeli centralno mesto kao glavni biološki agens za kontrolu insekata i njihova upotreba je široko rasprostranjena. Sprovedene su različite procene da bi se proverila bezbednost Bt toksina u obliku spreja ili transgenih biljaka prema neciljanim vrstama u okruženju i to pokazalo se da je uglavnom ekološki bez značajnih štetnih efekata, iako je nedavno došlo do laboratorijskog zapažanja za koje je impliciralo da Bt soj u komercijalnim sredstvima izaziva smanjenje reprodukcije kod bumbara (*Bombus terrestris*) pri primeni u koncentraciji od 0,1% kroz šećer, vodu i polen. (George & Crickmore, 2012)

Bacillus thuringiensis se koristi kao biopesticid za suzbijanje štetočina u poljoprivredi zbog različitih insekticidnih proteina. Osim što se koristi kao pesticid, Bt se takođe koristi kao bakterija koja podstiče rast biljaka za poboljšanje produktivnost useva. (Pradeep Kumar, 2021)

2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog rada su bili:

- Izolacija sojeva *Bacillus thuringiensis* iz rizosfere pšenice
- Molekularna identifikacija izolovanih uzoraka
- Analiza prisustva gena značajnih za produkciju endotoksina

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Izolacija *Bacillus thuringiensis*

Primenjen je protokol izolacije bakterija iz zemljišta po Traversu, što podrazumeva aseptičnu inokulaciju 1g zemljišta iz rizosfere pšenice u 10ml sterilnog Lauria-Bertani tečnog medijuma uz dodatak Na-acetatnog, takođe sterilnog pufera (0,25M, pH 6,8) u sudu zapremine 125ml. Inokulat je inkubiran u šejkeru na 200rpm, 4h na 30°C. Alikvot od 1 ml se dodatno inkubira u termomikseru na 80°C, 15 min, kako bi se eliminisale nesporulišujući organizmi. Nakon toga aseptično se zasejava na hranljivu agaroznu podlogu i inkubira 48-72h na 30°C. (Ammouneh, Harba, & Makee, 2011). Nakon završene inkubacije, vrši se presejavanje kolonija različitih morfologija radi dobijanja čistih kultura.

3.2. Bojenje po Gramu

Za proveru čiste kulture, vrši se bojenje po Gramu, kako bi se bakterijske ćelije vizuelizovale radi posmatranja pod svetlosnim mikroskopom.

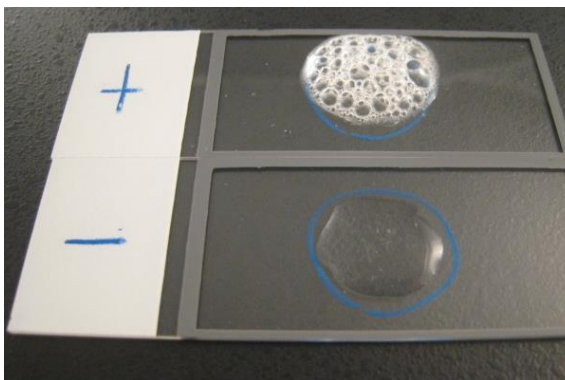
Na mikroskopsko staklo, u kapi destilovane vode, sterilnom ezom se vrši razmazivanje bakterijske kolonije u što tanjem sloju u prečniku oko 15 mm. Nakon toga vrši se fiksiranje laganim pokretom kroz plamen nad plamenikom, kako bi se sprečilo ispiranje bakterijske kulture sa mikroskopskog stakla. Preko fiksirane kulture, najpre se dodaje kristalno ljubičasta boja, koja se ispira vodom nakon 10 do 60 sekundi, pažljivo kako se ne bi isprala fiksirana kultura. Potom se dodaje rastvoj joda u kalijum jodidu (Lugolov rastvor), ovaj korak je poznatiji kao "fiksiranje boje". Nakon 60 sekundi vodom se ispira rastvor joda. Dodaje se dekolorizator koji je obično smeša etanola i acetone, koji se ispere nakon 5 sekundi. Poslednji korak je bojenje rastvorom 0.25% safranina, koji se ispira nakon 60 sekundi. Nakon toga preparate se suši na vazduhu. (Tripathi & Sapra, 2020)

Nakon što je preparat suv, posmatra se pod mikroskopom. Gram-pozitivne bakterije, među kojima su vrste roda *Bacillus*, boje se primarnom bojom, kristalno ljubičastom, i pod mikroskopom se vide ljubičasto.

3.3. Biohemijske karakteristike

3.3.1. Katalaza test

Katalaza test se izvodi tako što se na mikroskopsku staklenu pločicu sterilnom ezom ili drvenim štapićem nanese kolonija iz kulture stare 18 do 24 sata. Treba voditi računa da se sa kolonijom ne prenese i agar (posebno ako je kao podloga korišćen krvni agar) jer može doći do lažno pozitivne reakcije, kao i pri korišćenju eze od platine. Kapaljkom ili Pasterovom pipetom se na mikroskopsku pločicu nakapa 1 kap 3% H₂O₂ bez mešanja. Katalaza razlaže vodonik peroksid na O₂ i H₂O što se uočava kao pojava mehurića – u ovom slučaju katalaza test je pozitivan. Ukoliko ne dolazi do izdvajanja mehurića, katalaza test je negativan. (Slika 6) (Reiner, 2010)



Slika 6: Katalaza test (preuzeto iz Reiner, 2010)

3.3.2. Test sposobnosti produkcije egzopolisaharida

Test produkcije egzopolisaharida izvodi se na prekonočnoj kulturi koja je inkubirana na odgovarajućoj temperaturi. Ukoliko dolazi do pojave sluzi kada se kolonija dodiruje ezom, prisutni su egzopolisaharidi, test je pozitivan. (Ivanović, 2022.)

3.4. Izolacija DNK i PCR amplifikacija gena za 16s rRNK, *tuf* i *recA* gena

Nakon što je pod mikroskopom detektovana čista kultura, pristupa se molekularnoj identifikaciji u kojoj je prvi korak izolacija bakterijske DNK. Za izolaciju se koristi komercijalni Zymo Research Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit, prema priloženom protokolu.

Radi indentifikacije odabranih nepoznatih bakterijskih uzoraka umnožava se sekvenca gena za rRNK 16S, gene *tuf* i *recA*. Korišćeni su 10 μ M prajmeri i komercijalni OneTaq 2X Master Mix sa standardnim puferom (New England Biolabs, SAD). Za PCR reakcije su korišćeni prajmeri i protokoli opisani u Tabeli 1. Dobijeni PCR produkti provereni su na 2% agaroznom gelu, a potom prečišćeni pomoću komercijalnog kita za prečišćavanje - Zymo Research Clean&Concentrator, po priloženom protokolu.

Horizontalna elektroforeza fragmenata umnoženih PCR metodom rađena je na 2% agaroznom gelu. Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u 1x TBE puferu, uz dodavanje 1 μ l etidijum-bromida u 40 ml gela. Uzorci su mešani sa bojom (6x DNA Orange Loading Buffer, Jena Bioscience, Nemačka) Trajanje elektroforeze je 15 minuta, na naponu od 100V. Određivane dužine dobijenih PCR produkata vršeno je poređenjem DNK standardom koji sadrži DNK fragmente poznatih dužina.

Prečišćeni PCR produkti gena su poslani na sekvenciranje, metodom Sangerovo sekvenciranje, kompaniji Macrogen (Holandija). Dobijene sekvence su upoređene sa BLAST referentnom bazom podataka.

Ciljani gen	Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')	Temperatura i trajanje inicijalne denaturacije	Br. ciklusa	Temperatura i trajanje denaturacije	Temperatura i trajanje hibridizacije	Temperatura i trajanje elongacije	Temperatura i trajanje finalne elongacije
16s rRNK	UNI16SF	GAGAGTTTGATCCTGGC	94 °C 30 sekundi	34	94 °C 30 sekundi	53 °C 30 sekundi	68 °C 1,5 min	68 °C 5 min
	UNI16SR	AGGAGGTGATCCAGCCG						
tuf – faktor elongacije Tu	tufGPF	ACGTTGACTGCCCAGGACAC	94 °C 30 sekundi	34	94 °C 30 sekundi	60 °C 30 sekundi	68 °C 45 sekundi	68 °C 5 min
	tufGPR	GATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA						
recA- rekombinaza A	recA-F	TGAGTGATCGTCAGGCAGCCTTAG	95 °C 5 minuta	29	95 °C 30 sekundi	55 °C 30 sekundi	72 °C 1 min	72 °C min
	recA-R	CYTBGATAAGARTACCAWGMACCCGC						

Tabela 1: Prajmeri i PCR protokoli korišćeni za amplifikaciju gena od interesa

3.5. Molekularna detekcija insekticidnih gena

3.5.1. Cyt 1 i Cyt 2

PCR metodom provereno je prisustvo *cyt* gena koji kodiraju insekticidne protein. Korišćeni su parovi prajmera za *cyt1* i *cyt2* gene. Za *cyt1*: *cyt1gral-F* (5-CCTCAATCAACAGCAGGGTTATT-3) i *cyt1gral-R* (5-TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT-3) (Macrogen, Holandija) uz očekivan broj baznih parova između 477 i 480. (Ibarra, Rincon, & Orduz, 2003). Korišćeni su 10µM prajmeri i komercijalni OneTaq 2X Master Mix sa standardnim puferom (New England Biolabs, SAD). PCR reakcija je rađena po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 2 minuta, praćena sa 34 ciklusa denaturacija na 94°C, 1 minut, hibridizacija na 54°C, 1 minut i elongacija na 68°C, 1 minut. Nakon čega je usledila finalna elongacija na 68 °C u trajanju od 5 minuta. Za *cyt2*: *cyt2gral-F* (5-ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC-3) i *cyt2gral-R* (5-TTTC AACATCCACAGTAATTTCAAATGC-3) (Macrogen, Holandija) uz očekivan broj baznih parova između 355 i 356. (Ibarra, Rincon, & Orduz, 2003). Korišćeni su 10µM prajmeri i komercijalni OneTaq 2X Master Mix sa standardnim puferom (New England Biolabs, SAD). PCR reakcija je rađena po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 2 minuta, praćena sa 34 ciklusa denaturacija na 94°C, 1 minut, hibridizacija na 48°C, 1 minut i elongacija na 68°C, 1 minut. Nakon čega je usledila finalna elongacija na 68 °C u trajanju od 5 minuta. Dobijeni PCR produkti provereni su na 2% agaroznom gelu.

3.5.2. C1B

Takođe, provereno je i prisustvo insekticidnih *cry1B* gena, korišćenjem prajmera *c1B-F* (5-CAGAAACAACAGAACGACC-3) i *c1B-R* (5-CACTTCCCCACCATCCAT-3) (Macrogen, Holandija) uz očekivan broj baznih parova produkta 921. (Thammasittirong & Attathom, 2008). Korišćeni su 10µM prajmeri i komercijalni OneTaq 2X Master Mix sa standardnim puferom (New England Biolabs, SAD). PCR reakcija je rađena po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju od 3 minuta, praćena sa 34 ciklusa denaturacija na 95°C, 30 sekundi, hibridizacija na 51°C, 30 sekund i elongacija na 72°C, 1 minut. Nakon čega je usledila finalna elongacija na 72°C u trajanju od 5 minuta. Dobijeni PCR produkti provereni su na 2% agaroznom gelu.

3.5.3. Kurstakin

Kurstakin je lipopeptid izolovan iz sojeva vrste *Bacillus thuringiensis* koji pokazuje antifungalno dejstvo. (Hathout, Ho, Ryzhov, Demirev, & Fenselau, 2000). Korišćeni su prajmeri Aks-F (5-TCHACWGGRAATCCAAAGGG-3 I Tks-R (5-CCACCDKTCAA AAKAARKW-ATC-3) (Macrogen, Holandija) sa očekivanim brojem baznih parova produkta od 1125 do 1173. (Tapi, 2011). Korišćeni su 10 μ M prajmeri i komercijalni OneTaq 2X Master Mix sa standardnim puferom (New England Biolabs, SAD). PCR reakcija je rađena po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 3 minuta, praćena sa 34 ciklusa denaturacija na 94°C, 1 minut, hibridizacija na 43°C, 40 sekund i elongacija na 68°C, 2 minuta. Nakon čega je usledila finalna elongacija na 68 °C u trajanju od 10 minuta. Dobijeni PCR produkti provereni su na 2% agaroznom gelu.

4. REZULTATI

4.1. Izolacija bakterija

Metodom izolacije po Traversu iz rizosfere pšenice i kvržica soje izolovani su baterijski uzorci. Presejavanjem, na LB agaru dobijene su 43 čiste kulture *Bacillus spp.* koje su bojene po Gramu i analizirane pod mikroskopom. Uzorci koji su bili Gram-pozitivni i bojili se ljubičasto, analizirani su molekularnim metodama. Zaključeno je da je 15 uzoraka sojevi vrste *Bacillus thuringiensis*, od toga, 13 je izolovano iz rizosfere pšenice, dok su 2 uzorka izolovana iz kvržica soje. (Slika 7)



Slika 7: Poreklo uzoraka *Bacillus thuringiensis*

4.2. Biohemijske karakteristike

Katalaza testom utvrđeno je da su svi uzorci pozitivni na katalazu, dok je sposobnost produkcije egzopolisaharida utvrđena kod 12 uzoraka. (Tabela 2)

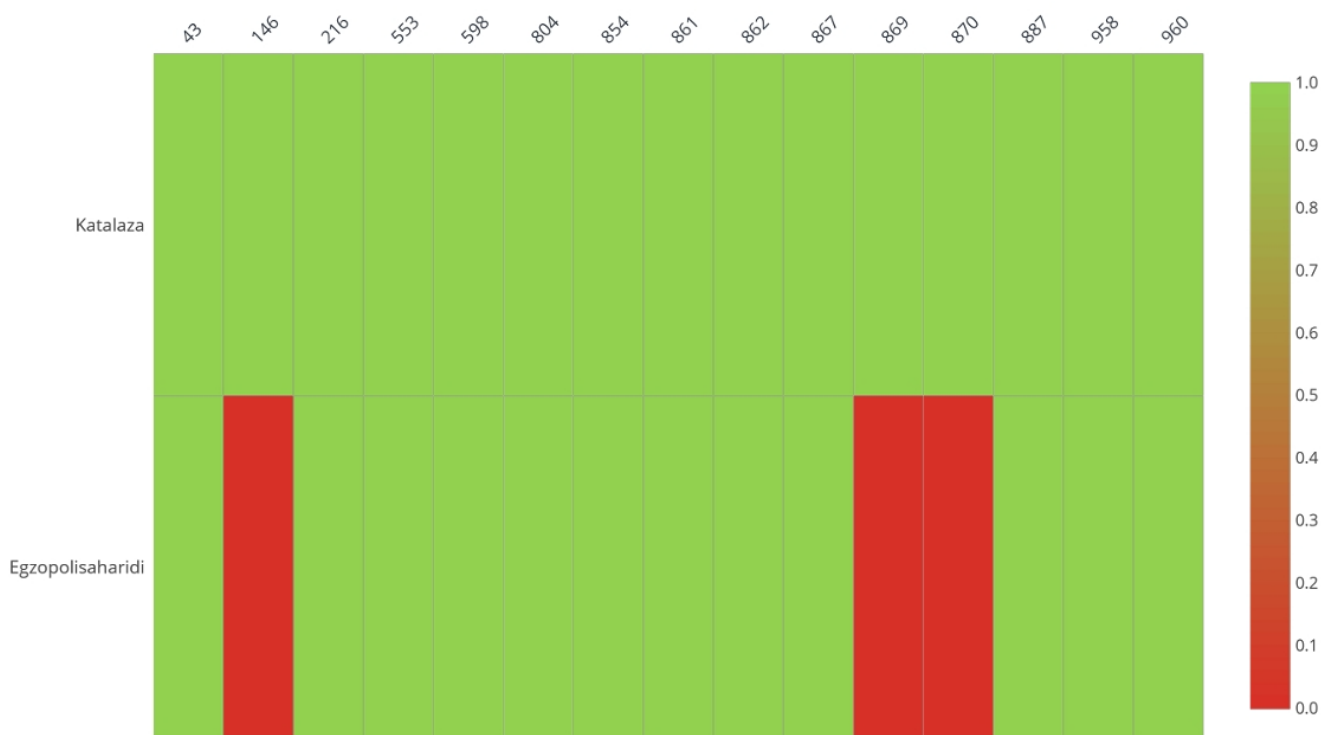
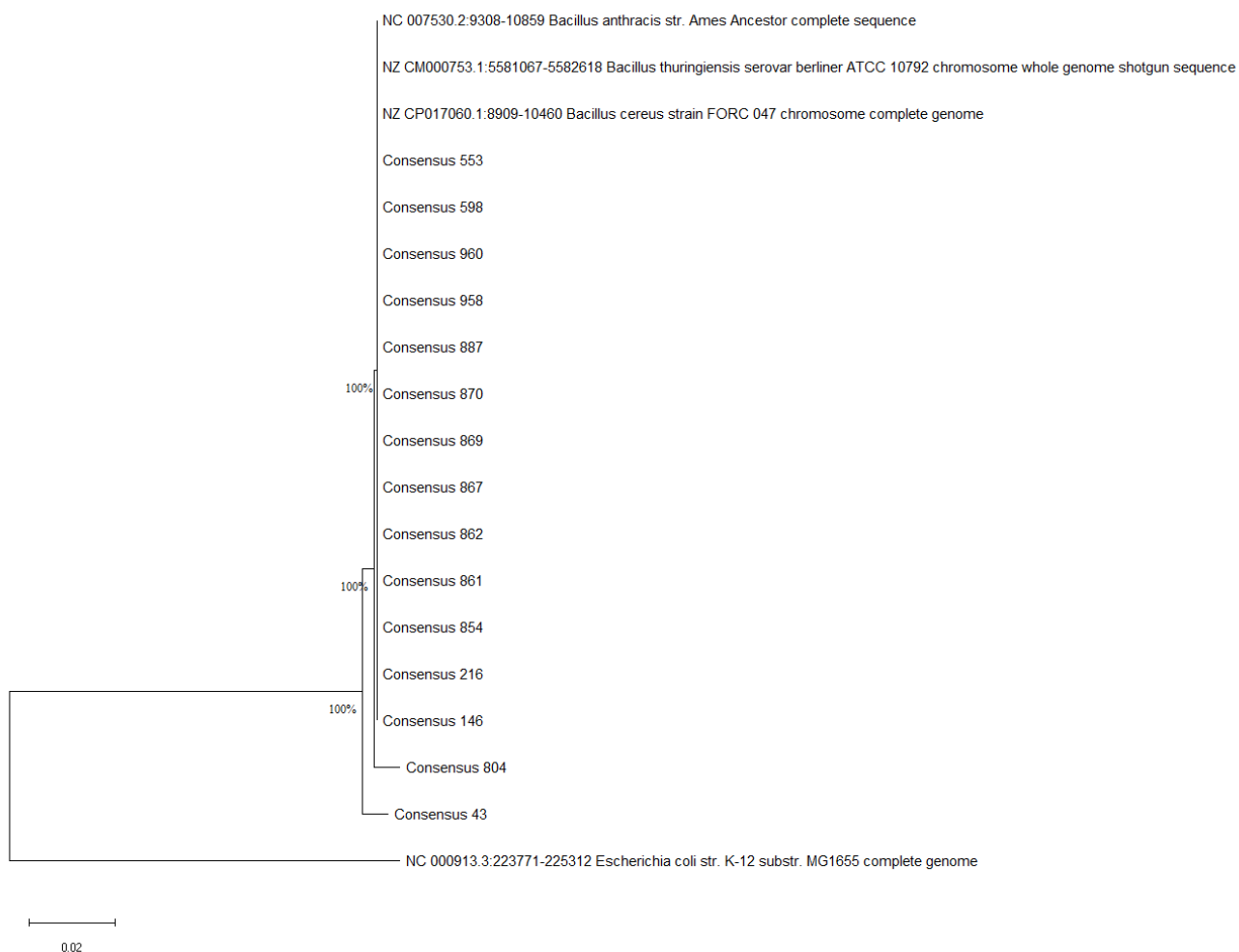


Tabela 2: Rezultati katalaza i testa sposobnosti produkcije egzopolisaharida

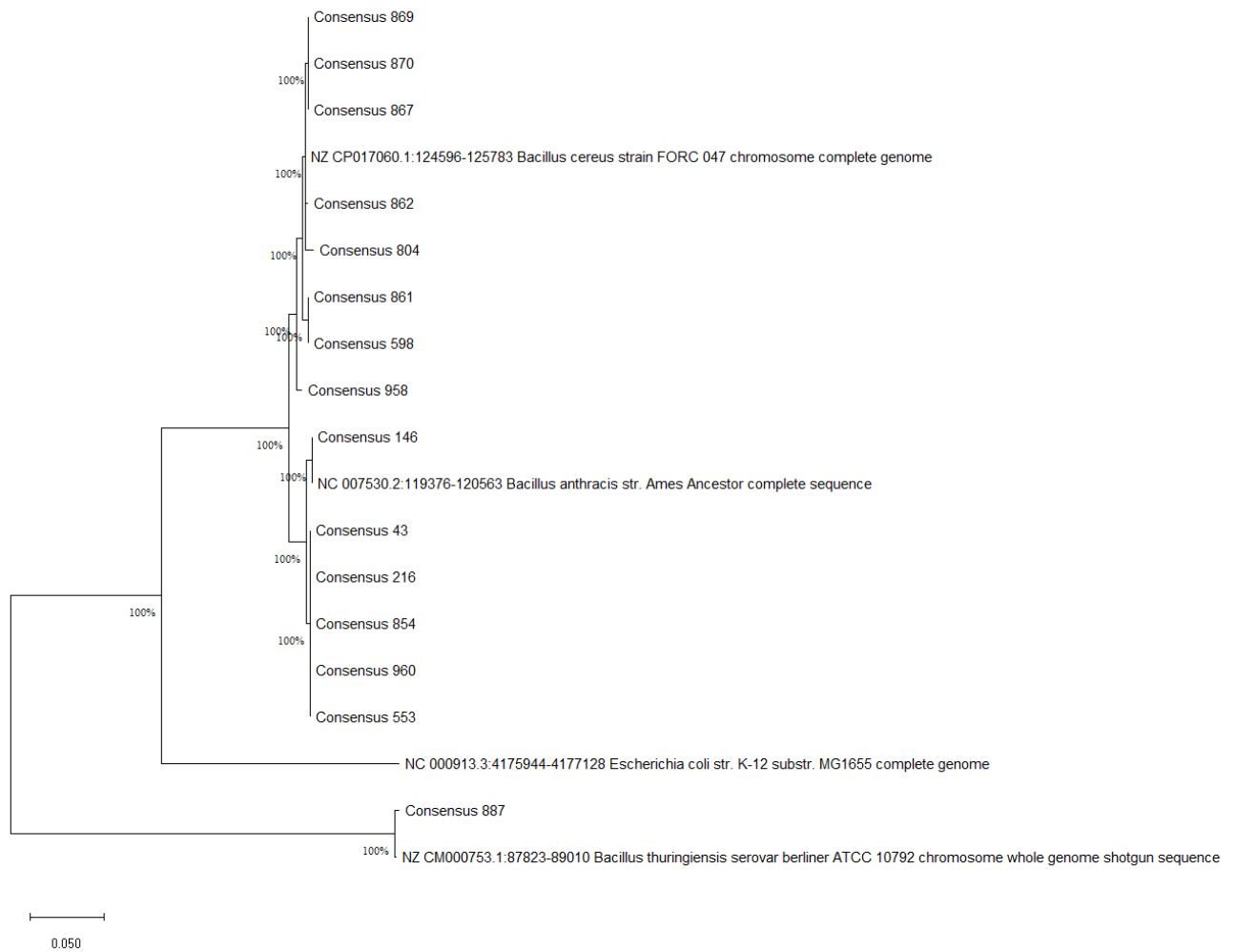
4.3. Filogenetska analiza- gen za 16s rRNK, *tuf* i *recA*

Sekvence amplifikata za gen koji kodira za 16s rRNK, dobijene Sangerovim sekvenciranjem, dužine oko 1500 bp, obrađeni su pomoću softvera BioEdit i upoređene sa referentnom bazom podataka BLAST. Uzorci koji su identifikovani kao *Bacillus thuringiensis* korišćeni su u izradi „Neighbour-joining“ filogenetskog stabala u softveru Mega11 (Tamura K, 2007). Korišćeni su uporedni 16s geni iz referentnih genoma vrsta roda *Bacillus* - *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* i *Bacillus thuringiensis* iz NCBI baze. Za ukorenjavanje stabla korišćena je *Escherichia coli*. Uočeno je da su uzorci najveću srodnost pokazali sa *Bacillus cereus*, dok je najudaljenija vrsta *Bacillus anthracis*. Nijedan od uzoraka, kako je i očekivano, nije pokazao srodnost sa *E. coli*. (Slika 8)



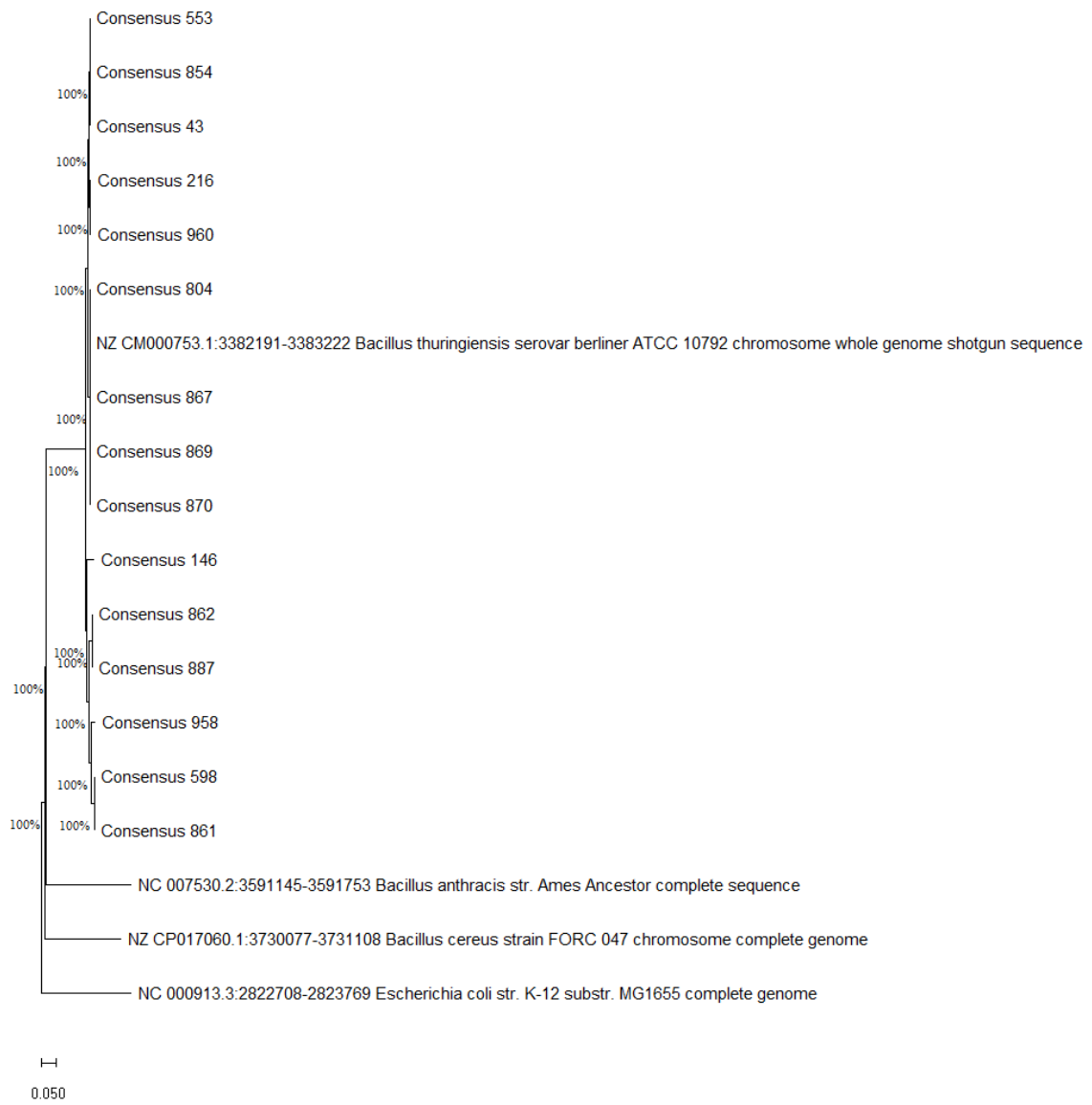
Slika 8: Filogenetsko stablo za gen koji kodira za 16s rRNK

Osim gena za 16s rRNK, uradjena je filogenetska analiza i konstruisano filogenetsko stablo za *tuf* gen. Kao uporedni, korišćeni su *tuf* gen iz istih referentnih genoma kao u prethodnom slučaju. Dobijeni rezultati ukazuju na srodnost 8 uzoraka sa *Bacillus cereus*, dok je 6 uzoraka srodno sa *Bacillus anthracis*, dok *tuf* gen jednog uzorka pokazuje blisku srodnost sa *tuf* genom iz referentnog genoma *Bacillus thuringiensis*. (Slika 9)



Slika 9: Filogenetsko stablo za *tuf* gen

Radi dobijanja detaljnijih podataka uradjena je filogenetska analiza *recA* gena. Za poređenje korišćeni su referentni genomi isti kao u analizi gena za 16s i *tuf* gena i njihovi *recA* geni. Nedvosmislena je srodnost svih uzoraka sa vrstom *Bacillus thuringiensis*, dok je najudaljenija vrsta u filogenetskom stablu *E. coli*. (Slika 10)



Slika 10: Filogenetsko stablo za *recA* gen

4.4. Geni za insekticidne proteine- *cyt1*, *cyt2*, *cry1B*, *kurstakin*

Korišćenjem odgovarajućih prajmera i protokola opisanih u poglavlju 4, PCR metodom izvršena je amplifikacija insekticidnih gena *cyt1*, *cyt2*, *cry1B* i *kurstakin* i analizirano njihovo prisustvo na agaroznom gelu. Rezultati su opisani u tabeli 3.

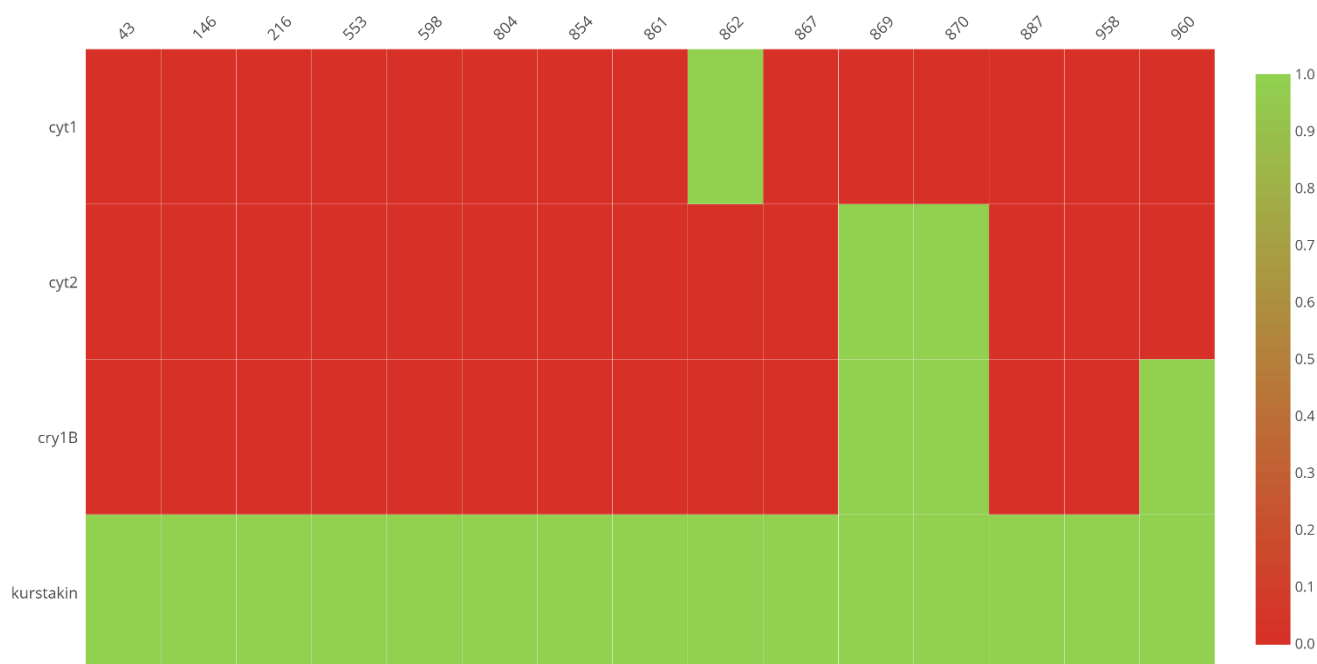
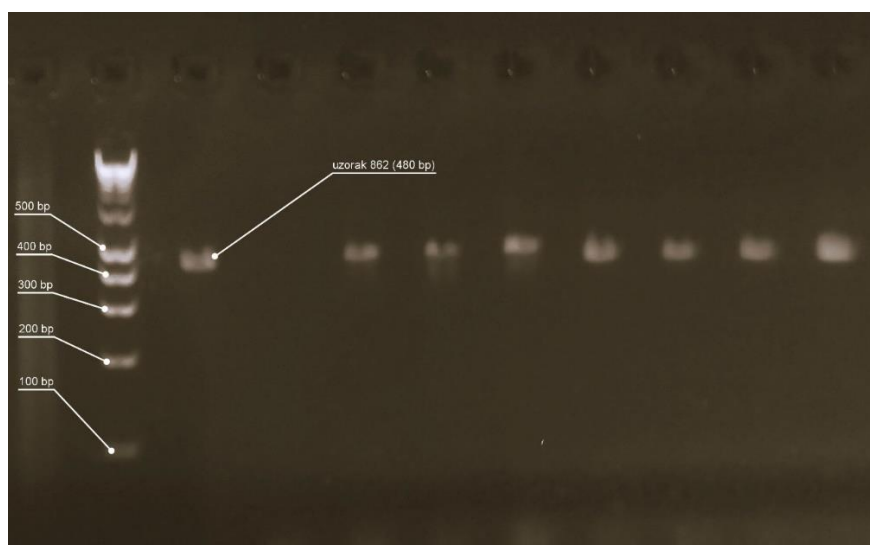


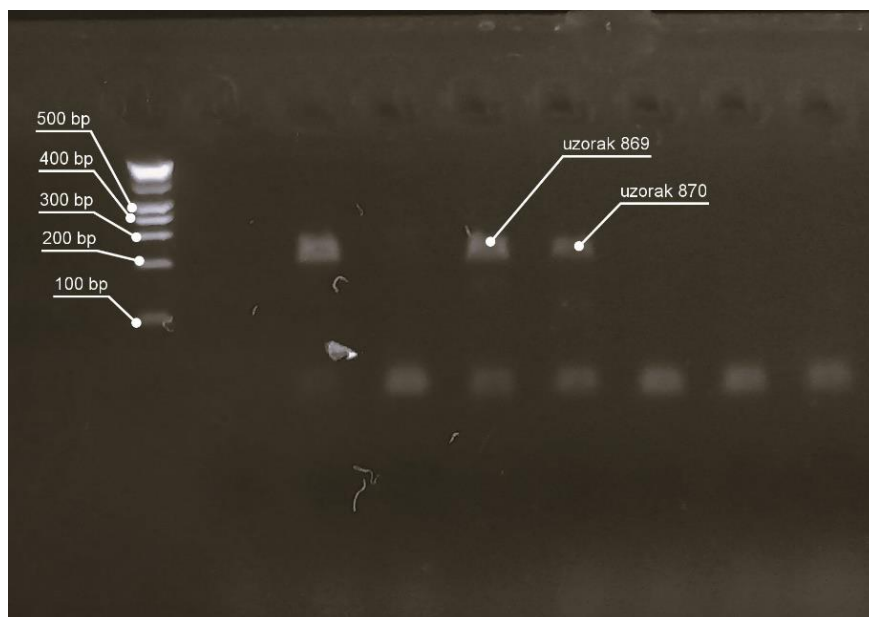
Tabela 3: Prisustvo gena *cyt1*, *cyt2*, *cry1B*, *kurstakin* u ispitivanim uzorcima

Gen *cyt1* prisutan je kod samo kod uzorka 862. Kako je očekivano, dobijen je produkt oko 480 bp, što je provereno pomoću elektroforeze na agaroznom gelu (Slika 11).



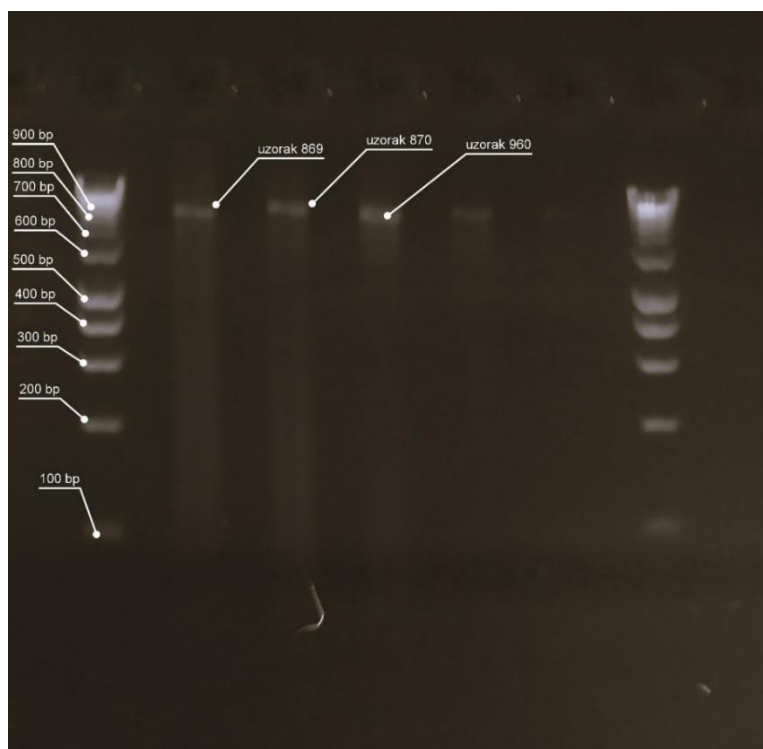
Slika 11: Prisustvo *cyt1* gena kod uzorka 862

Na isti način, provereno je prisustvo gena *cyt2*, koji je detektovan kod uzoraka 869 i 870, produkt oko 250bp. (Slika 12).



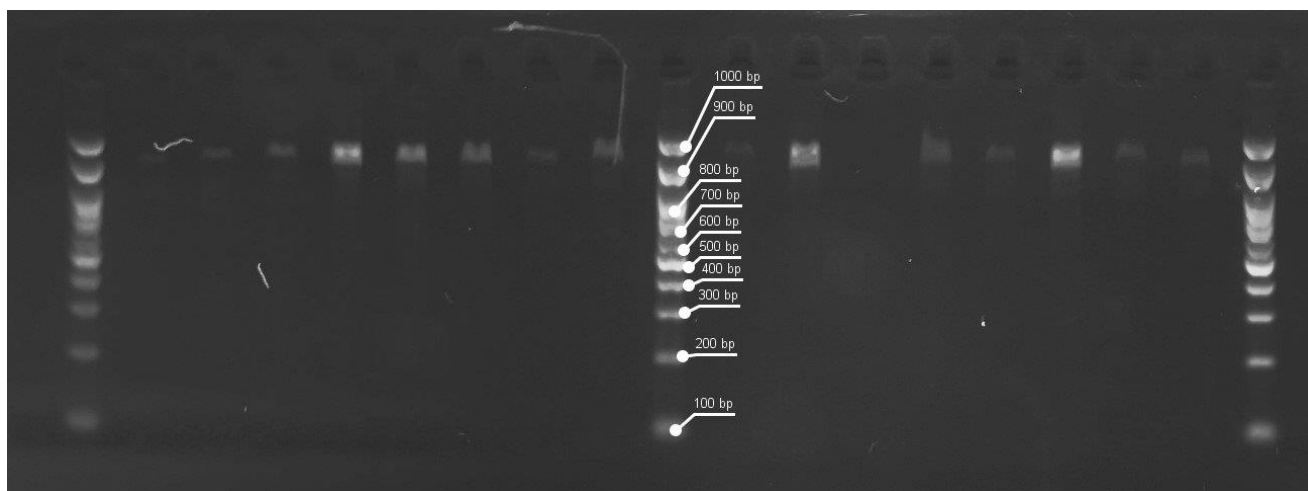
Slika 12: Prisustvo *cyt2* gena kod uzorka 869 i 870

Gen *cryIB* detektovan je kod uzoraka broj 869, 870 i 960, amplifikat oko 900 bp, kako je i očekivano. (Slika 13).



Slika 13: Prisustvo *cryIB* gena kod uzorka 869, 870 i 960

Gen za lipopeptid *kurstakin*, detektovan je kod svih 15 uzoraka, produkt oko 1000 bp. (Slika 14).



Slika 14: Prisustvo *kurstakin* gena kod svih 15 uzorka

5. DISKUSIJA

Rastuća svetska populacija i sve veće potrebe za hranom iziskuju ekološki prihvatljiva i održiva rešenja u razvoju poljoprivredne proizvodnje. U intenzivnoj poljoprivredi javlja se veliki broj bolesti i štetočina biljaka, na tržištu je dostupan veliki broj hemijskih sredstava za njihovo suzbijanje. Iako se na ovaj način uspešno rešava problem bolesti i štetočina, a prinos povećava, negativan uticaj ovih sredstava na životnu sredinu i zdravlje ljudi je veliki. Osim što upotrebom direktno zagađuju vodu i zemljište, gde se akumuliraju, njihova proizvodnja iziskuje veliku količinu energije kao i potrošnju vode. (Wei Wu, 2015)

Gram pozitivna bakterija, iz *Bacillus cereus* grupe, *Bacillus thuringiensis* (Bt) zauzela je važno mesto kada je u pitanju upotreba biopesticida. Kristalne inkluzije, izgrađene od proteina, koje bakterija formira tokom sporulacije, uočeno je da su visokoefikasne za suzbijanje štetočina i biljnih patogenata. U sojevima *Bacillus thuringiensis* otkrivene su grupe proteinskih toksina koji su selektivno toksični za različite organizme – patogene mikroorganizme i štetočine. (Palma, 2014)

U istraživanju koje je predmet ovog rada, bavili smo se izolacijom različitih sojeva bakterijske vrste *Bacillus thuringiensis* iz rizosfere pšenice, s obzirom da se u rizosferi nalazi najveći broj PGPB. Određene su bihomijske karakteristike izolata – katalaza testom I testom sposobnosti produkcije egzopolisaharida. Molekularnom metodom, uzorci bakterija su identifikovani do nivoa vrste, a potom je, takođe molekularnom metodom, analizirano prisustvo gena koji kodiraju proteine koji poseduju insekticidno dejstvo i koji imaju ulogu u industriji biopesticida.

Mikroorganizmi kao što su laktobacili i endofite proizvode različite egzopolisaharide, s tim da je mali broj istraživanja koji je fokusiran na procenat sojeva u okviru jedne vrste koji proizvode egzopolisaharide. U istraživanju Wang M. i saradnika je rađeno ispitivanje na 170 sojeva Bt iz „*Bacillus* Genetic Stock Center“ kolekcije i zaključak je da 164 soja, odnosno 96,5% proizvode egzopolisaharide. (Wang, Geng, & Xue, 2021) U ovom radu, utvrđeno je da 12 od 15 sojeva Bt proizvode egzopolisaharide, što je 80% ispitivanih uzoraka. Rezultati katalaza testa su pozitivni za 100% uzoraka, kako je opisano i u radovima Afriani i saradnika i Pagare i saradnika, što ukazuje da sojevi Bt poseduju enzim katalazu.

Nakon sekvenciranja amplifikata gena za 16s rRNK, radjena je filogenetska analiza konsenzusnih sekvenci uzoraka i formirano je filogenetsko stablo NJ (neighbor-joining) metodom pomoću softvera Mega11 gde je pokazano 100% poklapanje nukleotidnih sekvenci među Bt uzorcima, dok je u sličnoj studiji procenat poklapanja bio 99%. (Soufiane & Cote, 2009) Na isti

način je analizirano i filogenetski stablo za konsenzusne sekvence *tuf* gena, gde je očekivano kao što je navedeno u literature da će se Bt uzorci grupisati kako međusobno blisko, tako blisko i u odnosu na druge pripadnike grupe *B. cereus sensu lato*. (Xu, Johan, & Nielsen, 2023) U našem istraživanju došlo je do blagog odstupanja gde se uzorak 887 izdvojio i blisko grupisao sa referentnim genomom Bt, dok su drugi uzorci grupisani blisko jedni drugima i u odnosu na pripadnike *B. cereus sensu lato*. Filogenetsko stablo za *recA* gen prikazuje nedvosmisleno grupisanje Bt uzoraka o referentnog Bt genoma.

U jednoj od studija molekularne detekcije gena za insekticidne protein dobijeni su amplifikati gena *cyt1* dužine od 480 bp, dok je dužina *cyt2* amplifikata bila 350 bp. (Ibarra, Rincon, & Orduz, 2003) Oba gena kodiraju proteine koji su toksični za insekte iz reda Coleoptera i Diptera. (Palma, 2014) U ovom istraživanju korišćeni su prajmeri iz rada Ibarra i saradnici, za pomenute gene, s tim da je za gen *cyt2* dobijen amplifikat od 250 bp koji u dužini odstupa od očekivanog, ovaj gen detektovan je kod uzorka 862, dok je za gen *cyt1* dobijen amplifikat očekivane dužine i to kod uzorka 869 i 870. Prema podacima iz literature gen *cry1B* kodira proteine koji imaju toksično dejstvo na insekte iz reda Coleoptera i Lepidoptera (Palma, 2014), dok je za amplifikat gena očekivana dužina oko 900 bp. (Thammasittirong & Attathom, 2008) Dužina amplifikata je potvrđena i u našem istraživanju, gde je ovaj gen detektovan kod 3 uzorka – 869, 870 i 960. Gen za lipopeptid kurstakin detektovan je kod svih uzoraka.

6. ZAKLJUČCI

87% *Bacillus thuringiensis* sojeva, 13 od ukupno 15 izolata, izolovano je iz rizosfere pšenice. Svih 15 izolata (100%) je pozitivno na katalazu, dok 12 od 15 uzoraka (80%) pokazuje sposobnost sinteze egzopolisaharida.

Od tri gena koja su bila uključena u filogenetsku analizu – gen za 16s rRNK, *tuf* i *recA* gen, analiza *recA* gena dala je najinformativnije rezultate, dokazana je srodnost svih uzoraka Bt i referentnog *Bacillus thuringiensis* iz NCBI baze.

Kod izolata 862 detektovan je gen *cyt1*, dok je kod izolata 869 i 870 detektovan *cyt2*. Gen *cry1B* detektovan je kod izolata 869, 870 i 960

Na osnovu daljih molekularnih istraživanja, utvrđeno je da svi izolovani Bt poseduju gen koji kodira za lipopeptid kurstakin.

7. LITERATURA

- Afriani, S. R., Pujiastut, Y., & Irsan, C. (2018). Isolation and toxicity test of *Bacillus thuringiensis* from Sekayu region soil, South Sumatra on Spodopteralitura. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing.
- Ammouneh, Harba, & Makee. (2011). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 421-431.
- Beveridge, T. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *SYMPOSIUM*, 111-118.
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 423-435.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 423-431.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, 10-1128.
- Gamalero, G. (2011). Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. U D. K. Maheshwari, *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management* (str. 17-46). Springer.
- Gašić, O. (2012). Indukovana otpornost biljaka. *Ratar. Povrt.*, 326-334.
- George, Z., & Crickmore, N. (2012). *Bacillus thuringiensis* Applications in Agriculture. U E. Sansinenea, *Bacillus thuringiensis Biotechnology* (str. 19-39). Brighton: Department of Biochemistry, School of Life Sciences, University of Sussex, Falmer.
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 1-2.
- Hathout, Y., Ho, Y.-P., Ryzhov, V., Demirev, P., & Fenselau, C. (2000). Kurstakins: A New Class of Lipopeptides Isolated from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Natural Products*, 1492-1496.
- Ibarra, J. E., Rincon, M. C., & Orduz, S. (2003). Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 5269–5274.
- Ivanović, M. P. (2022.). *POTENCIJAL PRIMENE AUTOHTONIH BAKTERIJA MLEČNE KISELINE KAO ANTILISTERIJSKIH KULTURA U PROIZVODNJI HRANE*. Beograd : Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Karličić, V. M. (2017). *Bakterije stimulatori biljnog rasta kao potencijal u ekoremedijaciji oštećenih zemljišta*. Belgrad: Doctoral dissertation, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet.
- Kumar, A., & Singh, S. (2020). Plant growth-promoting bacteria: The biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. *Frontiers in Microbiology*, 2.
- Liu, L., Li, Z., Luo, X., Zhang, X., Chou, S.-H., Wang, J., & He, J. (2021). Which Is Stronger? A Continuing Battle Between Cry Toxins and Insects. *Sec. Evolutionary and Genomic Microbiology*.

- Logan, N. A., & Vos, P. D. (2009). Bacillus. U *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (str. 1-163). John Wiley & Sons.
- Majeed, M. A. (2018). Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. *Plant cell reports*, 1599-1609.
- Olanrewaju, G. B. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 1-2.
- Pagare, K., Khot, G., & Mohite, P. (2018). Isolation and identification of Bacillus Thuringiensis. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* , 1015-1017.
- Palma, M. (2014). Bacillus thuringiensis Toxins: An Overview of. *Toxins*, 3296-3325.
- Pradeep Kumar, M. K. (2021). Bacillus thuringiensis as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 95.
- Reiner, K. (2010). Catalase Test Protocol. *American Society for Microbiology*, 1-9.
- Sancar, A., C. Stachelek, W. K., & Rupp, W. D. (1980). Sequences of the recA gene and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2611-2615.
- Soufiane, B., & Cote, J.-C. (2009). Discrimination among Bacillus thuringiensis H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, gyrB and aroE gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek* , 33-45.
- Tamura K, D. J. (2007). Preuzeto sa MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tapi, A. A. (2011). Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from Bacillus thuringiensis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 571-581.
- Thammasittirong, A., & Attathom, T. (2008). PCR-based method for the detection of cry genes in local isolates of Bacillus thuringiensis from Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 121-126.
- Travers, M. R. (1987). *Selective Process for Efficient Isolation of Soil Bacillus spp.* American Society for Microbiology.
- Tripathi, & Sapra. (2020). Gram Staining. *StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)*.
- Valicente. (2019). *Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems*. Springer Nature Switzerland.
- Vilas-Bôas, G., Peruca, A., & Arantes, O. (2007). Biology and taxonomy of Bacillus cereus, Bacillus anthracis, and Bacillus thuringiensis. *Canadian Journal of Microbiology*, 673-687.
- Wang, M., Geng, L., & Xue, B. (2021). Structure characteristics and function of a novel extracellular polysaccharide from Bacillus thuringiensis strain 4D19 . *International Journal of Biological Macromolecules*, 956-964.
- Wei Wu, B. M. (2015). Integrated nutrient management (INM) for sustaining crop productivity and reducing environmental impact: A review. *Science of the Total Environment*, 415-427.

- Wusirika Ramakrishna, R. Y. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 10-18.
- Xu, X., Johan, L., & Nielsen, D. (2023). Enhanced specificity of Bacillus metataxonomics using a tuf-targeted amplicon sequencing approach. *Spring Nature*, 3(1), 126.
- Yadav, V. S. (2017). Plant Growth Promoting Bacteria: Biodiversity and Multifunctional Attributes for Sustainable Agriculture. *Biotechnology and Microbiology*, 1-18.