
LEK. SIROV.	God. XXXIII	Broj 33	Str. 119 – 131	Beograd 2013.
LEK. SIROV.	Vol. XXXIII	No. 33	PP. 119 – 131	Belgrade 2013.

Prikaz doktorske teze – Ph.D. Thesis prewiev
UDC

Rukopis primljen: 21.12.2013.

KOMPARATIVNA ANALIZA AGENASA ZA BIOLOŠKU KONTROLU PATOGENIH GLJIVA IZOLOVANIH SA LEKOVITIH BILJAKA

Tatjana Stević

Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Tadeuša Koščuška 1, 11000
Beograd, Srbija

IZVOD

Ispitivanjem mikopopulacije na određenom lekovitom bilju utvrđene su mešovite infekcije gljivama iz različitih rodova, ali većina pripada rodu *Fusarium*, potom *Aspergillus* i *Alternaria* koji su potencijalni producenti mnogih mikotoksina. U cilju prevencije i zaštite lekovitog bilja biološkom kontrolom tj. primenom preparata prirodnog porekla, ispitivali smo mogućnost primene etarskih ulja i izolata *Bacillus* sp. Sva testirana etarska ulja su pokazala antifungalnu aktivnost na sve fitopatogene gljive sa različitim stepenom inhibitorne aktivnosti. Etarska ulja čubra, origana i timijana pokazala su najveći antifungalni potencijal na sve testirane gljive, dok je etarsko ulje vetivera ispoljilo najslabiju inhibitornu aktivnost. Ispitivanjem sinergističke aktivnosti odabranih etarskih ulja može se reći da su kombinacije ulja ispoljile bolju antifungalnu aktivnost nego kada su ulja ispitivana pojedinačno. Ispitivanjem antagonističke aktivnosti 14 izolata *Bacillus* sp. prema odabranim gljivama pokazan je različit stepen inhibicije prema različitim vrstama testiranih gljiva. Najbolji antagonizam ispoljili su izolati SS-12.6, SS-13-1, SS-27.7, SS-38.3, SS-38.4 i SS-40.2, kao i lipopeptidni ekstrakt izolovan iz *Bacillus* sp. SS-12.6. Ovi rezultati ukazuju da etarska ulja i izolati *Bacillus* sp. predstavljaju dobru osnovu za potencijalnu formulaciju preparata sa efikasnošću u kontroli fitopatogenih gljiva, bilo prevencijom kontaminacije u polju, ili dekontaminacijom u zatvorenom prostoru.

Ključne reči: fitopatogene gljive, biološka kontrola, etarska ulja, antifungalna aktivnost, izolati *Bacillus* sp., ekstrakti izolata antagonista, antagonizam

UVOD

Primena lekovitog bilja i njihovih preparata u prevenciji i lečenju različitih poremećaja u ljudskom organizmu može biti ograničena njihovom mogućom kontaminacijom fitopatogenim gljivama i njihovim sekundarnim metabolitima, mikotoksinima.

Među svim mikotoksinima, aflatoksin B1, fumonizin B1 i ohratoksin A su najtoksičniji za sisare i ispoljavaju nefrotoksičnu, hepatotoksičnu, teratogenu i mutagenu aktivnost, uzrokujući oštećenja kao što su toksični hepatitis, hemoragiju, edem i imunosupresiju [1]. U novijim istraživanjima dovode se u direktnu vezu sa primarnim karcinomom jetre i jednjaka [2].

Iako prisustvo gljiva ne mora da bude uvek praćeno produkcijom mikotoksina, mnogi literaturni podaci ukazuju na njihovo prisutvo u biljnim drogama, čajevima i drugim biljnim preparatima. Smatra se da najpoznatije i najvažnije mikotoksine sintetišu gljive iz rodova *Aspergillus* (aflatoksin i ohratoksin), *Fusarium* (fumonozine, toksin zearalenon i strukturno blisku grupu trihotecene) i *Penicillium* (ohratoksin i druge), mada i pripadnici ostalih rodova takođe mogu proizvoditi, po ljudsko zdravlje, opasne mikotoksine [3].

Prema literaturnim podacima *A. flavus* je najzastupljenija gljiva na biljnim drogama što predstavlja opasnost od moguće kontaminacije aflatoksinima. Međunarodna agencija za istraživanje kancera [4] je *aflatoksin B1* klasifikovala u Grupu 1 humanih karcinogena i proglasila ga najjačim poznatim karcinogenom prirodnog porekla.

Saznanja o riziku konzumiranja droga zaraženih gljivama i potencijalno mikotoksinima, kao i riziku pri primeni hemijskih fungicida po rukovaoca, potrošača i životnu sredinu, dovela su do povećanja interesa za uvođenje alternativnih mera u zaštiti bilja, gde posebno mesto pripada preparatima prirodnog porekla tzv. agensima biološke kontrole. **Biološka kontrola** podrazumeva primenu korisnih mikroorganizama (bakterija, kvasaca, gljiva) ili produkata njihovog metabolizma, kao i primenu biljnih ekstrakata i etarskih ulja u zaštiti biljaka [5].

Biljke su bogat izvor metabolita za koje je dokazano da poseduju fungitoksičan efekat na rast micelija raznih fitopatogenih gljiva kao i na germinaciju spora. Efekat etarskih ulja na gljive se može pratiti na morfološkom nivou i na nivou ćelije. Neke od morfoloških promena su izostanak sporulacije, gubitak pigmenta, aberantni razvoj konidiofora, promena u broju konidija, povećano grananje hifa ili promena u njihovoj veličini. Smatra se da su ove promene posledica delovanja ulja na enzimatske reakcije sinteze ćelijskog zida što utiče na rast gljive i na morfogenezu, kao i na povlačenje citoplazme u hifama što dovodi do smrti micelijuma [6, 7]. Na nivou ćelije gljiva etarska ulja najčešće deluju ili inhibicijom sinteze ćelijskog zida ili na nivou citoplazmatične membrane. Etarska ulja mogu da remete aktivnost membrane mitohondrija, odnosno aktivnost

enzima u respiratornom lancu. Dokazano je da etarska ulja mogu inhibirati i sintezu DNK, RNK, proteina i polisaharida u ćelijama bakterija i gljiva u kojima izazivaju promene slično delovanju antibiotika [8]. Najveći broj ispitivanja posvećen je mogućoj primeni etarskih ulja u redukciji kontaminacije uskladištenog voća i povrća. Rezultati ovakvih istraživanja ukazuju da etarska ulja različitih biljnih vrsta redukuju nivo kontaminacije na takvom voću i povrću bilo njihovim *prskanjem* i *premazivanjem*, ili *potapanjem* u rastvor etarskog ulja. Međutim, veoma malo je studija o efikasnosti etarskih ulja u zaštiti lekovitog bilja u *in vivo* uslovima.

Sa druge strane, među različitim pristupima biološke kontrole, upotreba korisnih mikroorganizama tzv. biokontrolnih agenasa, kao što su bakterije, kvasci i gljive, je najviše ispitivana i postignuto je najviše uspeha [9]. Od bakterija agenasa biokontrole najviše su proučavane vrste rodova *Pseudomonas* i *Bacillus*. Vrste roda *Bacillus* su vrlo atraktivni mikroorganizmi za praktičnu primenu jer proizvode stabilne endospore koje im obezbeđuju otpornost na visoku temperaturu, isušivanje, UV zračenje i organske rastvarače [10]. Neki od antagonista su patentirani, prihvaćeni za komercijalnu upotrebu i već se intenzivno koriste. Tako, brojni sojevi, posebno vrste *B. subtilis*, su komercijalizovani kao biopesticidi, pri čemu su nosioci ovih preparata bakterijske ćelije ili njihovi produkti [11].

Iz svega iznetog proizašlisu ciljeiovog rada: a) izolacija i identifikacija gljiva sa odabranih biljnih droga, b) hemijska analiza odabrana 22 etarska ulja, c) ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja *in vitro* (utvrđivanje MIC i MFC vrednosti), d) ispitivanje antagonističkog potencijala različitih izolata *Bacillus* sp., kao i lipopeptidnih ekstrakta, prema odabranim fitopatogenim gljivama, e) ispitivanje potencijalnog sinergističkog efekta različitih bioloških agenasa i f) poređenje efekata biokontrolnih agenasa.

MATERIJAL I METODE

Determinacija kolonija gljiva, formiranih na medijumu, vršena je na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika izolata.

Ispitivan je kvalitativni i kvantitativni sastav, kao i antifungalna aktivnost 22 etarska ulja. Za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava etarskih ulja korišćene su GC-FID (gasna hromatografija sa plameno jonizacionim detektorom) GC-MS (gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom) tehnike.

Antifungalna aktivnost etarskih ulja određivana je u *in vitro* testu, mikrodilucionom metodom na mikrotitracionim pločama. Određivane su minimalne inhibitorne i minimalne fungicidne koncentracije (MIC i MFC).

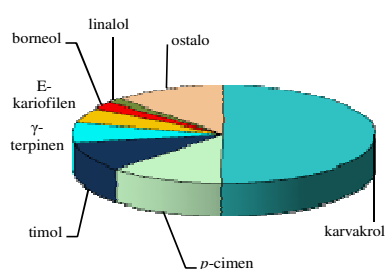
Primenom *in vitro* testa dvojne kultivacije ispitivana je antagonistička aktivnost 14 izolata *Bacillus* sp. prema odabranim gljivama.

REZULTATI I DISKUSIJA

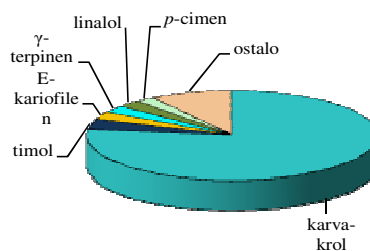
Ispitivanjem preko 40 vrsta lekovitog bilja najlošiji mikrobiološki kvalitet utvrđen je za sledeće droge: kukuruznu svilu, list i herbu nane, list koprive, herbu rastavića i cvet nevena [12]. Iako su na svim biljnim drogama utvrđene mešovite infekcije gljivama iz različitih rodova, većina izolovanih vrsta gljiva pripada rodu *Fusarium*, a potom *Aspergillus* i *Alternaria*. Osim pomenutih, identifikovani su i predstavnici rodova: *Penicillium*, *Phoma*, *Cephalosporium*, *Nigrospora*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Cercospora*, *Septoria*, *Phomopsis*, *Verticillium*, *Dreschlera* (= *Bipolaris*), *Rhizoctonia*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Stahybotrys*, *Trichotecium*, *Puccinia*, *Botrytis*, *Mucor* i *Rhizopus* sp., u zavisnosti od biljne droge.

Grafikon 1. Udeo dominantnih komponenti u etarskim uljima: čubra, origana i timijana

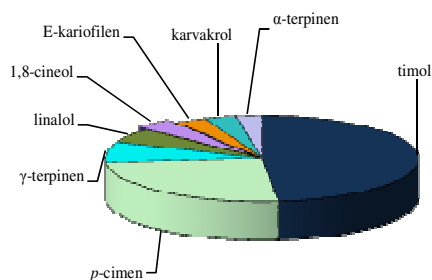
Chart 1. The share of dominant components of essential oils: savory, oregano and thyme



Ulje čubra



Ulje origana



Ulje timijana

U cilju pronalaženja efikasnog biokontrolnog agensa ispitivali smo mogućnost primene 22 etarska ulja i 14 izolata *Bacillus* sp. u kontroli odabranih identifikovanih gljiva. U tom smislu, odabrali smo sledeće vrste gljiva: *Fusarium solani*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* (izolovani sa kukuruzne svile i nevena), *F. tricinctum*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia lunata*, *Trichoderma viride*, *Trichotecium roseum*, *Gliocladium roseum*, *Myrothecium verrucaria*, *Phoma* sp., *Phomopsis* sp. i *Verticillium dahliae*.

Etarska ulja čubra, origana i timijana, sa fenolima kao dominantnim komponentama, karvakrolom i timolom, pokazala su najveći antifungalni potencijal na sve testirane gljive, pri najnižim koncentracijama. Sličnost u hemijskom sastavu sva tri etarska ulja, bez obzira na izvesne razlike u procentualnom udelu pojedinačnih komponenti, verovatno utiče i na sličnost u antifungalnoj aktivnosti (Grafikon 1). Ujednačenost delovanja, posebno etarskih ulja čubra i origana, ogleđa se kroz sličnu osetljivost većine gljiva.

Rast najvećeg broja testiranih gljiva inhibiran je istom koncentracijom, od 0,14 mg/ml (MIC i MFC). Ovo je MIC i etarskog ulja timijana za izvestan broj gljiva (Grafikon 2).

Ovako izrazito niske minimalne inhibitorne i fungicidne vrednosti sva tri ulja ukazuju na njihovu izuzetnu antifungalnu aktivnost u odnosu na sve testirane fitopatogene gljive i njihov ogromni potencijal u praktičnoj primeni u biokontroli istih. Posebno važna je činjenica da ova ulja podjednako dobro inhibiraju rast gljiva koje su potencijalni producenti mikotoksina kao što je *A. flavus* i *F. verticillioides*.

Po literaturnim podacima, ova tri etarska ulja efikasno inhibiraju sintezu različitih mikotoksina u *in vitro* ispitivanjima. Merenjima produkcije najpotentnijeg mikotoksina, aflatoksina, od strane mnogih *Aspergillus* vrsta, pokazano je da ulja inhibiraju 100% produkciju aflatoksina pri koncentraciji manjoj od 0,5 mg/ml [8].

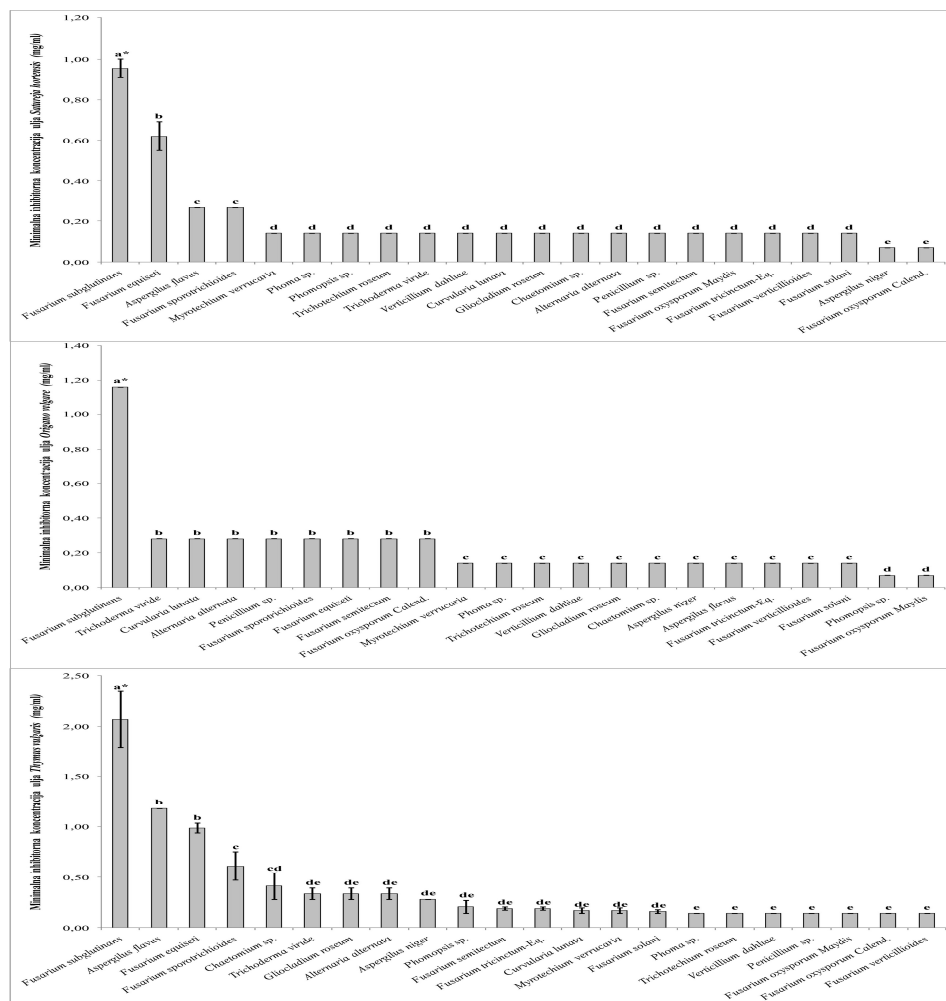
Smatra se da u ovoj aktivnosti dominantnu ulogu imaju fenolne komponente karvakrol i timol, ali doprinos imaju i druge komponente ovih ulja, kao što su njihovi biološki prekursori, p-cimen i γ -terpinen [13].

Neznatno manju aktivnost ispoljilo je etarsko ulje ruže, a odmah potom i ulja anisa i čajnog drveta. U odnosu na sintetički fungicid, najslabija antifungalna aktivnost zabeležena je za etarska ulja kamilice i vetivera, sa seskviterpenima kao dominantnim komponentama (MIC vrednosti za pojedine gljive su bile iznad 20 mg/ml).

Među vrstama roda *Fusarium*, *F. subglutinans*, *F. semitectum* i *F. sporotrichioides*, generalno su najotpornije gljive na većinu analiziranih etarskih ulja, a od predstavnika drugih rodova to su *T. viride*, *A. alternata*, *A. flavus* i *Chaetomium* sp. Najosetljivije gljive na većinu etarskih ulja su *F. oxysporum* izolovan sa kukuruzne svile, kao i *M. verrucaria* i *T. roseum*.

Grafikon 2. MIC vrednosti etarskog ulja čubra (gore), origana (u sredini) i timijana (dole) (mg/ml) na rast odabranih gljiva.

Chart 2. MIC values of essential oils savory (above), oregano (in the middle) and thyme (below) (mg / ml) on the growth of the selected fungi.



Mean values of MIC and standard errors are shown. * Values shown with the same letter are not statistically significant ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Prema literaturnim podacima, ispitivana etarska ulja ostvaruju antifungalnu aktivnost na morfološkom i citološkom nivou. Od morfoloških promena, pojedina

ulja osim što inhibiraju rast micelije, mogu inhibirati rast germinativnih tuba kao i rast hifa, germinaciju konidija i formiranje spora [14]. Na nivou ćelije etarska ulja mogu ostvariti antifungalnu aktivnost kroz nekoliko mehanizama: inhibicijom sinteze ćelijskog zida, narušavanjem integriteta ćelijske membrane, inhibicijom funkcije citoplazmatične membrane, inhibicijom sinteze proteina kao i sinteze nukleinskih kiselina [8, 7, 15].

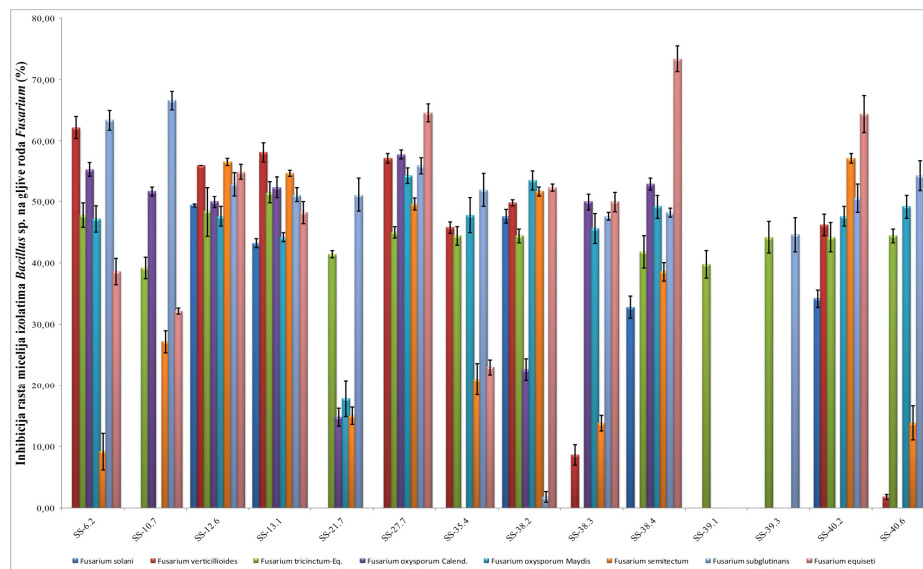
Prema rezultatima ispitivanja sinergističke aktivnosti odabranih etarskih ulja može se reći da su kombinacije etarskih ulja ispoljile bolju antifungalnu aktivnost nego kada su ulja ispitivana pojedinačno. U *in situ* ispitivanjima, najveću efikasnost u redukciji ukupnog broja gljiva u uzorcima biljne droge, ispoljila su ulja timijana, origana i ruže.

Ispitivanja antagonističkog potencijala različitih izolata *Bacillus* sp.

Osim etarskih ulja, naša istraživanja bila su usmerena na *in vitro* ispitivanja antagonističkog potencijala 14 različitih izolata *Bacillus* sp. izolovanih sa različitih staništa Srbije. Inhibitorno delovanje različitih izolata *Bacillus* sp. ispitivano je testovima dvojne kultivacije gajenjem kultura fitopatogenih gljiva u kombinaciji sa odgovarajućim antagonistom na istoj Petrijevoj šolji.

Grafikon 3. Efekat izolata *Bacillus* sp. na rast vrsta roda *Fusarium*.

Chart 3. Effect of *Bacillus* sp. isolates on the growth of *Fusarium* species.



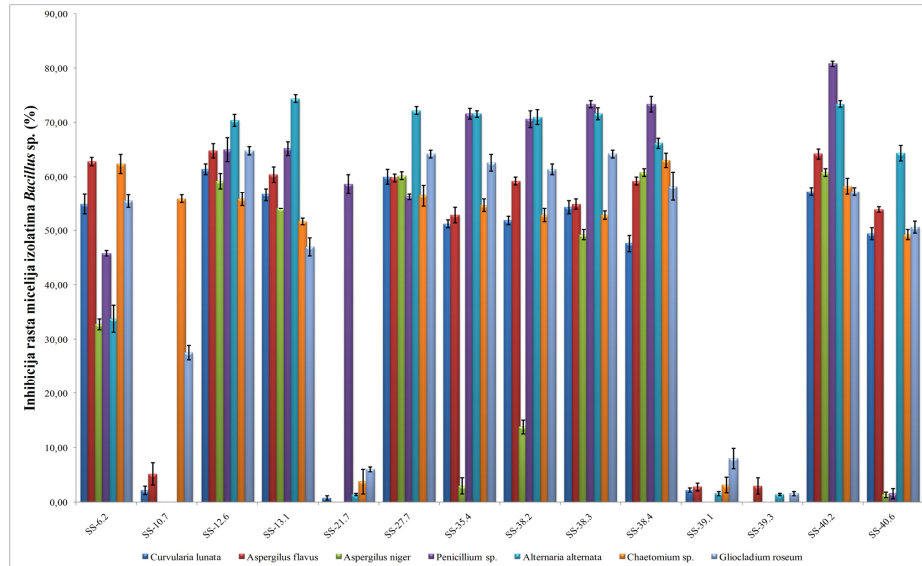
Prikazane su srednje vrednosti procenta inhibicije rasta i standardna devijacija.

Na osnovu rezultata skrining ispitivanja odabrane su sledeće gljive za dalji rad: *F. solani*, *F. verticillioides*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum* (izolovane sa nevena i kukuruzne svile), *F. semitectum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti*, *A. alternata*, *G. roseum*, *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Chaetomium* sp. i *C. lunata*. Ove vrste su korišćene i u prethodnim ispitivanjima antifungalne aktivnosti etarskih ulja, ali su pojedine izostavljene, npr. *F. sporotrichioides*, *Phoma*, *T. roseum* i dr., zbog rezistentnosti na *Bacillus* izolate, ili su i same antagonisti, kao što je *T. viride*.

Testirani *Bacillus* sp. izolati su ispoljili različit stepen inhibicije prema različitim vrstama testiranih gljiva. Najbolji antagonizam prema odabranim fitopatogenim gljivama ispoljili su izolati SS-12.6, SS-13-1, kao i SS-27.7, SS-38.3, SS-38.4 i SS-40.2. Izolati SS-39.1 i SS-39.3 su u oglecima dvojne kultivacije manifestovali najslabiji antagonistički efekat prema gotovo svim patogenim gljivama. Slabiji antagonizam u odnosu na većinu gljiva ispoljili su i *Bacillus* sp. izolati SS-10.7 i SS-21.7. Ostali izolati (SS-6.2, SS-35.4, SS-38.2, SS-40.6) ispoljili su različite antifungalne potencijale u zavisnosti od testirane gljive (Grafikon 3 i 4).

Grafikon 4. Efekat izolata *Bacillus* sp. na rast odabranih gljiva drugih rodova.

Chart 4. Effect of *Bacillus* sp. isolates on the growth of selected fungi of other genera.



Prikazane su srednje vrednosti procenta inhibicije rasta i standardna devijacija.

U poređnom analizom dobijenih rezultata može se reći da su *Fusarium* vrste nešto otpornije na *Bacillus* sp. izolate od vrsta drugih rodova gljiva. *F.*

subglutinans je najosetljivija na antagonistički najaktivnije izolate SS-12.6, SS-13.1, SS-27.7 i SS-6.2. Ovi rezultati su posebno zanimljivi zato što su u suprotnosti sa rezultatima prethodnih ispitivanja etarskih ulja u kojima je ova gljiva ispoljila najveću toleratnost na najveći broj testiranih ulja.

Na osnovu dobijenih rezultata *in vitro* ispitivanja može se reći da su najbolji antagonistički potencijal na većinu testiranih gljiva ispoljili izolati *Bacillus* sp. SS-12.6, SS-13.1, a zatim i SS-38.3 i SS-38.4, SS-40.2, SS-27.7, SS-38.3, SS-38.4, SS-35.4, SS-38.2 i SS-6.2.

Antagonistički efekat pojedinih *Bacillus* sp. izolata na rast odabranih gljiva prikaza je na Grafikonu 5.

Grafikon 5. Efekat pojedinih izolata *Bacillus* sp. na rast odabranih gljiva

Chart 5. The effect of certain strains of *Bacillus* sp. on the growth of selected fungi



Može se pretpostaviti da testirani izolati ispoljavaju svoj antagonizam prema odabranim gljivama produkcijom antimikrobnih supstanci, ali se ne mogu isključiti ni ostali mehanizmi antagonizma kao što su: kompeticija za nutrijente, produkcija litičkih enzima i indukcija imunog odgovora.

Široki dijapazon antimikrobnih supstanci koje proizvode bakterije roda *Bacillus* uključuje i lipopeptide. Lipopeptidi iz familije iturina, fengicina i surfaktina koji se sintetišu uz pomoć velikih multienzimskih kompleksa, a ne ribozomalno, ispoljavaju širok antimikrobni spektar i izuzetnu surfaktantsku aktivnost [16, 17]. Iturini i fengicini ispoljavaju jaku antifungalnu aktivnost kroz potpunu inhibiciju rasta širokog spektra biljnih patogena [18], dok surfaktini ispoljavaju izvestan sinergistički efekat na antifungalnu aktivnost iturina A [19].

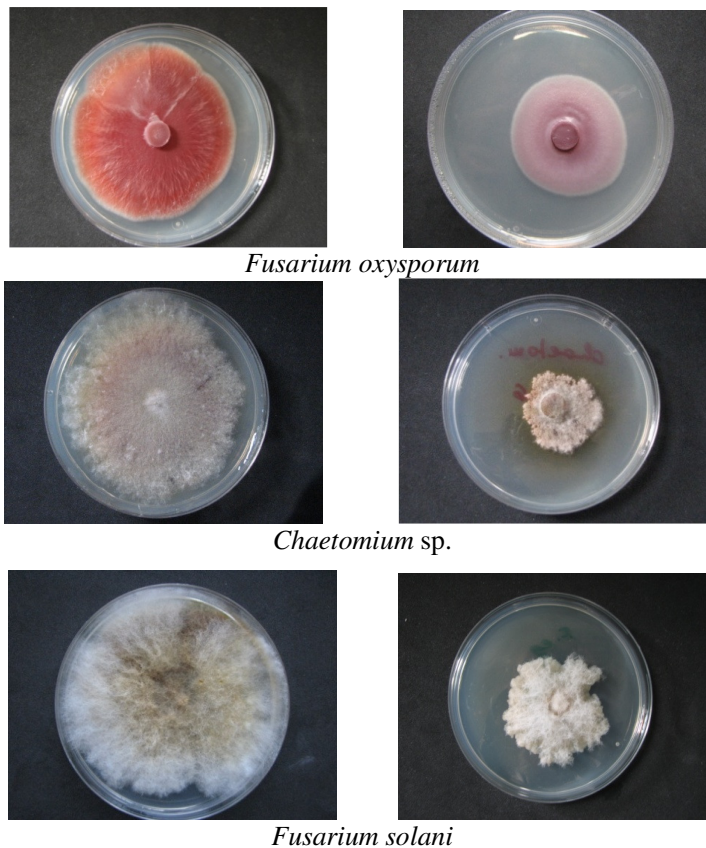
Kako su izolati SS-12.6 i SS-13.1 ispoljili najbolji antagonistički efekat u odnosu na sve testirane gljive u dalja istraživanja uključili smo njihove lipopeptidne ekstrakte.

Ispitivanjem antifungalne aktivnosti lipopeptidnih ekstrakta izolovanih iz *Bacillus* sp. SS-12.6 i SS-13.1, može se uočiti da je ekstrakt izolata SS-12.6 veoma efikasan u inhibiciji rasta većine testiranih gljiva, dok ekstrakt izolovan iz izolata

SS-13.1 nije ispoljio značajniji antagonizam na većinu testiranih gljiva, izuzev *Penicillium* sp. Antifungalni efekat lipopeptidnog ekstrakta izolata SS-12.6 prema različitim gljivama prikazan je na Grafikonu 6.

Grafikon 6. Antifungalni efekat lipopeptidnog ekstrakta izolata SS-12.6 prema različitim gljivama

Chart 6. The antifungal effect of the lipopeptide extract of SS 12.6 isolates against some fungi



Ispitivanjem potencijalnog sinergizma između *Bacillus* sp. izolata SS-12.6 i SS-13.1 i etarskih ulja timijana, čubra i ruže, na vrste roda *Fusarium* utvrđeno je da su izolati uglavnom jače inhibirali rast većine ispitivanih gljiva u prisustvu ovih etarskih ulja, nego kada su ispitivani sami kao antagonisti, uz pojedine izuzetke. Kombinacijom ovog izolata i etarskih ulja procentualno više je inhibaran rast testiranih gljiva u odnosu na slučaj kada su ispitivani pojedinačno.

Ovakva, paralelna, ispitivanja aktivnosti različitih agenasa biokontrole, etarskih ulja i izolata bakterije *Bacillus* sp., omogućavaju nam otkrivanje adekvatnog agensa, ili njihove kombinacije, za efikasno suzbijanje određene fitopatogene gljive u cilju dobijanja što aktivnijih i efikasnijih agenasa biokontrole sa širokom paletom delovanja. Kombinovani tretman različitim biološkim agensima otežao bi razvoj rezistentnih patogenih sojeva.

Kako su biljne droge osjetljiv materijal, a do sada ne postoji prihvatljiva metoda za njihovu dekontaminaciju, nameće se potreba za iznalaženjem adekvatne formulacije, bazirane na biološkim agensima, koja ne bi uticala na njihove organoleptičke karakteristike, a posebno na aktivne principe tj. na lekovitost. U tom smislu, a na osnovu literaturnih podataka i rezultata dobijenih u ovom radu, može se razmišljati o mogućnosti primene etarskih ulja i izolata *Bacillus* sp., kao bioloških agenasa, u dva pravca: prevencije kontaminacije lekovitih biljaka u polju i dekontaminacije biljne droge u zatvorenom prostoru.

ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu može se reći da etarska ulja čubra, origana, timijana i ruže, kao i *Bacillus* sp. izolat SS-12.6 i njegov lipopeptidni ekstrakt, predstavljaju dobru osnovu za potencijalnu formulaciju preparata sa efikasnošću u kontroli fitopatogenih gljiva, bilo prevencijom kontaminacije u polju, ili dekontaminacijom u zatvorenom prostoru.

LITERATURA

1. N. Dubey, A. Kumar, P. Singh, R. Shukla (2008): Microbial contamination of raw materials: A major reason for the decline of India's share in the global herbal market. *Current Science*, vol. 95(6): 717-8.
2. K. Reddy, C. Reddy, H. Abbas, C. Abel, K. Muralidharan (2008): Mycotoxygenic fungus, mycotoxins, and management of rice grains. *Toxin Reviews*, vol. 27, 287-317.
3. M. Trucksess, P. Scott (2008): Mycotoxins in botanicals and dried fruits: A review. *Food Additives & Contaminants, Part A*, vol. 25(2): 181-192.
4. IARC (1993): Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 56 International Agency for Research on Cancer, 489-521.
5. S. Droby (2006): Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables afterharvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *Acta Horticulturae*, vol. 709, 45-51.

6. Rasooli, R. Abyaneh (2004): Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Cont.*, vol. 15, 479-483.
7. E. Carmo, E. de Oliveira Lima, E. de Souza (2008a): The potential of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 39, 362-367.
8. D. Kalemba, A. Kunicka (2003): Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, vol. 10, 813-829.
9. R. Sharma, D. Singh, R. Singh (2009): Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, vol. 50, 205-221.
10. E. Arrebola, D. Sivakumar, R. Bacigalupo, L. Korsten (2010): Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop protection*, vol. 29(4): 369-377.
11. M. Grahovac, D. Indić, S. Lazić, S. Vuković (2009): Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi. *Pestic. Phytomed.*, vol. 24(4): 245-258.
12. T. Stević, S. Pavlović, S. Stanković, K. Šavikin (2012): Pathogenic microorganisms of medicinal herbal drugs. *Arch. Biol. Sci.*, vol. 64(1): 49-58.
13. M. Rota, A. Herreraa, R. Martínez, J. Sotomayor, M. Jordánb (2008): Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, vol. 19(7): 681-687.
14. E. Nychas (1995): Natural antimicrobial from plants. *New methods of food preservation*, 58-69.
15. M. Zuzarte, M. Gonçalves, C. Cavaleiro, J. Canhoto, L. Vale-Silva, M. Silva, E. Pinto, L. Salgueiro (2011): Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *J Med Microbiol.*, vol. 60(5):612-618.
16. R. Maget-Dana, F. Peypoux (1994): Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, vol. 87(1-3): 151-174.
17. D. Vollembroich, G. Pauli, M. Özel, J. Vater (1997): Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, 44-49.
18. Klich, S. Arthur, R. Lax, M. Blang (1994): Iturin A: a potential new fungicide for soared grains. *Mycopathologia*, vol. 127, 123-127.
19. R. Maget-Dana, L. Thimon, F. Peypoux, M. Ptack (1992): Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, vol. 74, 1047-1051.

Naučna oblast: Mikrobiologija

Uža naučna oblast: Biološka kontrola fitopatogenih gljiva

COMPARATIVE ANALYSIS OF AGENTS FOR BIOLOGICAL CONTROL OF PATHOGENIC FUNGI ISOLATED FROM MEDICINAL PLANTS

Tatjana Stević

Institute for Medicinal Plant Research “Dr Josif pančić”, Tadeuša Koščuška 1, 11000 Belgrade, Republic of Serbia

SUMMARY

Biological control involves the use of beneficial microorganisms (bacteria, yeasts, fungi) or the products of their metabolism, as well as the application of plant extracts and essential oils as alternative measures in plant protection. Examining over 40 stored dried medicinal plant species the lowest microbial quality were determined for corn silk, mint herb and leaf, nettle leaf, horsetail herb and marigold flower. Although mixed infections was recorded with different types of fungus the *Fusarium* was noted as the most dominant genera for most tested drugs, followed by *Aspergillus* and *Alternaria*. In order to find an effective biological control agent, we investigated the possibility of applying the 22 essential oils and 14 isolates of *Bacillus* sp. in the control of selected identified fungi. All tested essential oils showed antifungal activity on pathogenic fungi isolated from herbal drugs, but with varying degrees of inhibitory activity. Savory, oregano and thyme oil, with phenols as the dominant component, were the most effective, while vetiver oil, and those from *Citrus* species, with dominant monoterpen hydrocarbons, were the least effective against pathogenic fungi. According to the results of tested synergistic activity of selected essential oils, combination of essential oils exhibited better antifungal activity than when they were tested individually. Using *in vitro*, dual cultivation assay, *Bacillus* sp. isolates showed various degree of antagonistic activity against different types of plant pathogenic fungi. The best antagonism showed isolates SS-12.6, SS-13-1, SS-27.7, SS-38.3, SS-38.4 and SS-40.2, as well as lipopeptide extract isolated from *Bacillus* sp. SS-12.6. Isolates were more effective in the presence of selected essential oils, than when tested individually, with particular exceptions. Based on the results obtained in this work we conclude that the essential oils of savory, oregano, thyme and roses, as well as *Bacillus* sp. isolate SS-12.6 and its lipopeptide extract, represent a good basis for the formulation of products with potential efficacy in the control of plant pathogenic fungi, either in preventing the contamination in the field, or via indoors decontamination.

Key words: pathogenic fungi, biological control, essential oils, antifungal activity, *Bacillus* sp. isolates, lipopeptide extracts of isolates, antagonism.

Scientific field: Microbiology

Scientific discipline: Biological control of phytopathogenic fungi