
LEK. SIROV.	God. XXXV	Broj 35	Str. 163 – 180	Beograd 2015.
LEK. SIROV.	Vol. XXXV	No. 35	Pp. 163 – 180	Belgrade 2015.

Originalni naučni rad – Original scientific paper *Rukopis primljen: 29.11.2015.*
UDC: 632.4:632.937; 579.852.11 *Prihvaćen za publikovanje: 14.12.2015.*
COBISS.SR-ID 220258316

**IN VITRO ANTIFUNGALNI POTENCIJAL *BACILLUS* SPP. IZOLATA
KAO BIOKONTROLNIH AGENASA**

**Ivica Dimkić¹, Tatjana Stević², Tanja Berić¹, Ivan Nikolić¹, Tamara Janakiev¹,
Đorđe Fira¹, Slaviša Stanković¹**

¹ Biološki Fakultet, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 16, 11000 Beograd, Srbija

² Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Tadeuša Koščuška 1, 11000 Beograd, Srbia

IZVOD

Bolesti biljaka izazvane infekcijama patogenim gljivama mogu dovesti do smanjenja kapaciteta biljnog rasta ili naneti mnogo ozbiljniju štetu dovodeći do smrti biljaka i značajnih gubitaka u proizvodnji hrane. Veliki broj istraživanja je u poslednje vreme posvećen proučavanju sekundarnih metabolita koje proizvode vrste roda *Bacillus* koji se mogu koristiti za kontrolu različitih biljnih patogena. U ovoj studiji prikazan je jak antifungalni efekat lipopeptidnih ekstrakata iz izolata roda *Bacillus* prema 11 testiranih gljiva, sa najnižim minimalnim inhibitornim koncentracijama od 0.008 mg/ml, na *Fusarium semitectum*. Proučavanje interakcija lipopeptidnih ekstrakata međusobno, kao i u kombinacijama sa etarskim uljima, ukazalo je na postojanje sinergističkog efekta za neke kombinacije u *in vitro* testiranjima. Kombinacija lipopeptidnog ekstrakta izolata SS-12.6 i ulja čubra na rast *Alternaria alternata*, kao i kombinacija ovog ekstrakta i ulja timijana u delovanju na *Fusarium nygamai* je ostvarila sinergistički efekat. U kombinaciji oba ulja sa ekstraktom SS-12.6 sinergistička aktivnost je jedino zabeležena na rast *Fusarium solani*. Do danas je pokazano da kombinacija komplementarnih bioloških pristupa sa aditivnim i/ili sinergističkim efektom može da obezbedi veću konzistenciju i efikasnost u biokontroli, pa u tom smislu postoji sve veće interesovanje za različite agense kao mogućoj zameni konvencionalnih sintetičkih fungicida u cilju zaštite kultivisanih biljaka od fitopatogenih gljiva.

Ključne reči: *Bacillus*, etarska ulja, antifungalni potencijal, sinergizam, biološka kontrola.

UVOD

Termini “biološka kontrola” i skraćeni sinonim “biokontrola” se uveliko koriste u različitim oblastima biologije, najčešće u entomologiji i biljnoj patologiji. U biljnoj patologiji ovi termini se odnose na korišćenje mikrobioloških antagonista u sprečavanju razvoja infekcije i bolesti, kao i u korišćenju specifičnih patogena u kontroli razvoja korova. Najuže posmatrano, biološka kontrola predstavlja namensko korišćenje introdukovanih ili postojećih rezidentnih organizama u suzbijanju aktivnosti i brojnosti populacija jednog ili više biljnih patogena [1]. Jedna od prednosti mikrobioloških biopesticida u poređenju sa većinom drugih prirodnih produkata je raznovrsnost njihovih načina delovanja, u načelu zasnovanih na kompeticiji za nutrijente i prostor, direktnom antagonizmu prema biljnom patogenu i imunizaciji biljke domaćina. U poređenju sa prirodnim ekstraktima, mikrobiološki pesticidi često zadržavaju prednost u pogledu dužine aktivnosti, odnosno mikrobiološki agensi mogu uspostaviti rast u fitosferi i proizvoditi kontinuirano bioaktivna jedinjenja *in situ*[2]. Antagonizam bakterija iz roda *Bacillus* protiv mnogih štetočina i patogenih populacija ispoljava mnoge forme delovanja. Većina predstavnika roda *Bacillus*, poput *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* i *B. pumilus* su poznati kao visoko efikasni proizvođači ribozomalno i neribozomalno sintetisanih bioaktivnih prirodnih produkata. Za neke, od čitavog niza biološki aktivnih molekula sintetisanih od strane predstavnika roda *Bacillus*, potvrđena je inhibitorna aktivnost na biljne patogene i ova antagonistička aktivnost ili antibioza je verovatno najpoznatiji i najvažniji mehanizam, koji se koristi za ograničavanje invazije patogena u tkiva biljaka domaćina. Veliku klasu peptidnih antibiotika vrsta roda *Bacillus* čine ciklični lipopeptidi (cLP) koji mogu varirati po tipu i sekvenci aminokiselinskih ostataka, prirodni peptidne ciklizacije, kao i po prirodni, dužini i načinu grananja lanaca masnih kiselina [3]. Kod mnogih vrsta roda *Bacillus* potvrđeno je prisustvo tri glavne familije lipopeptida: surfaktina, iturina i fengicina, koje obuhvataju strukturalne varijante u zavisnosti od genetičke pozadine određenih sojeva [3,4,5]. Svaka familija ovih cLP jedinjenja pokazuje specifične antibiotske aktivnosti i stoga svaka od njih može biti uključena u antagonizam različitih biljnih patogena. Na primer, iturin A produkovan od strane *B. subtilis* RB14 soja učestvuje u kontroli bolesti semena paradajza (bolest semena) uzrokovane patogenom *R. solani* [6]. Takođe, prekomerna ekspresija mikosubtilina kod soja *B. subtilis* ATCC 6633 je vodila do značajne redukcije infekcije klijanaca paradajza uzrokovane *Pythium aphanidermatum* [7]. Kao primer kontrole filozofernih bolesti, doprinos iturina i fengicina je pokazan u antagonizmu *B. subtilis* soja nad *Podosphaera fusca* koja inficira listove dinje [8]. Ovo je naročito pokazano ispoljavanjem jakog inhibitornog efekta cLP na klijanje konidija *P. fusca*, detekcijom cLP iz listova tretiranih bakterijama i korišćenjem cLP-

deficijentnih mutanata koji nisu pokazali antagonistički efekat. U cilju zaštite od post-žetvenih bolesti, *B. subtilis* GA1 soj koji efikasno proizvodi cLP iz tri različite familije lipopeptida, a naročito širok spektar fengicina, je upotrebljen u kontroli rana na plodovima jabuka protiv bolesti sive plesni uzrokovane *Botrytis cinerea*. Fengicini su se pokazali veoma efikasnim u kontroli bolesti plodova voća, izazvanim post-žetvenim patogenima *in situ* [9]. Za fengicin je takođe zabeležena antagonistička aktivnost protiv *Fusarium graminearum* [10], dok je za iturin uočena inhibitorna aktivnost prema izazivaču antraknoze *Colletotrichum dematium* [11], *Penicillium roqueforti* [12], *Aspergillus flavus* [13], *R.solani* [14], prema gljivama koje boje drvo (15) i prema nematofagnim gljivama [16]. U nekim slučajevima, fungitoksična aktivnost je jasno povezana sa permeabilizacijom spora/konidija koja dovodi do inhibicije klijanja ili alternativno do poremećaja ćelija hifa. Kao što je i otkriveno transmissionim elektronskim mikroskopskim tehnikama, oba fenomena najverovatnije rezultiraju oštećenjem membrane fungalne ćelije cLP [8,12,17].

Uzimajući u obzir prethodno dokazanu antimikrobnu ulogu testiranih izolata *Bacillus* spp. (18,19): ciljevi ovog rada bili su utvrđivanje tipova interakcija, minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije lipopeptidnih ekstrakata pojedinačno i u različitim kombinacijama *in vitro*, kao i ispitivanje kombinacija etarskih ulja čubra i timijana zajedno sa ekstraktom izolata SS-12.6 na rast fitopatogenih gljiva izolovanih sa semena nevena (*Calendula officinalis* L.).

MATERIJAL I METODE

Bakterijski antagonisti

U ovom radu korišćeno je 5 izolata bakterija roda *Bacillus* izolovanih iz uzoraka iz prirode iz različitih regiona Srbije. Izolati *Bacillus* spp. izolovani iz zemlje (SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1 and SS-38.4) i jedan iz stajskog đubriva (SS-27.2) su morfološki okarakterisani i potvrđeni bojenjem po Gramu i katalaza testom [20].

Patogeni i saprofitni sojevi gljiva

Indikatorski patogeni i saprofitni sojevi gljiva, koji su korišćeni za testiranje antimikrobne aktivnosti izolata *Bacillus* spp. *in vitro*, prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Indikatorski patogeni i saprofitni sojevi gljiva korišćeni za testiranje antimikrobne aktivnosti izolata *Bacillus* spp.

Table 1. Indicator pathogenic and saprophytic fungal strains used for the testing antimicrobial activity of *Bacillus* spp.

Vrsta fungalnih patogena	Medijumi za rast	Temperatura gajenja	Izvor izolata
<i>Aspergillus flavus</i>			
<i>Aspergillus niger</i>			
<i>Aspergillus ochraceus</i>			
<i>Alternaria alternata</i>			
<i>Penicillium</i> sp.			
<i>Fusarium semitectum</i>	PDA/TSB	25 °C	Seme nevena (<i>Calendula officinalis</i> L.)
<i>Fusarium oxysporum</i>			
<i>Fusarium solani</i>			
<i>Fusarium proliferatum</i>			
<i>Fusarium nygamai</i>			
<i>Fusarium polyfalidicum</i>			

Izolacija lipopeptidnih jedinjenja kombinacijom kiselinske precipitacije i ekstrakcije metanolom

Kombinovana kiselinska precipitacija i ekstrakcija rastvaračem prethodno je opisana kod [21]. Prekonoćna kultura bakterija gajena na 37 °C je oslobođena ćelija centrifugiranjem 20 min na 5000 rpm na 4 °C i 1000 ml tako pripremljenog supernatanta je raspoređeno u nekoliko manjih sudova iste zapremine i vršeno je zakišeljavanje koncentrovanom HCl do pH 2 vrednosti rastvora. Dozvoljena je precipitacija preko noći na 4 °C. Nakon ponovnog centrifugiranja pod istim uslovima, dobijeni pelet je ekstrahovan metanolom uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici u trajanju od 2 sata. Dobijeni ekstrakti su sterilisani filtriranjem kroz 0.45 µm Durapore™ filtere i uparavani do suvog korišćenjem rotacionog uparivača (Büchi Rotavapor R-215, Švajcarska).

Pripremanje spora gljiva za mikrodilucionu metodu i biokontrolne testove

Gljive su gajene na PDA podlozi u vidu kosog agara, u periodu od 10 do 21 dana, u zavisnosti od izolovane vrste gljive, na 25 °C [22]. Inokulum je pripremljen tako što su isprane spore sa površine kosih agara sterilnim rastvorom 0.85% NaCl-a i 0.1% Tween-a 80 (v/v) (3 ml za slabo sporulišuće vrste, i do 5 ml za dobro sporulišuće vrste gljiva). Sterilnim štapićem za bris pokupljene su zaostale spore sa kultura i procedene kroz duplu gazu u sterilnu epruvetu. Nanošeno je 50 µl inokuluma na hemocitometarsku pločicu sa 16 polja i vršeno je prebrojavanje spora u nekoliko polja, a zatim je računata aritmetička sredina.

Suspenzija spora je sterilnim fiziološkim rastvorom dovedena do konačne koncentracije od 1×10^5 CFU/ml. Tako pripremljen inokulum držan je na -20 °C do upotrebe. Radi provere validnosti inokuluma, kao i odsustva kontaminacije, vršena je inokulacija na PDA podlogu.

***In vitro* određivanje minimalnih inhibitornih i fungicidnih koncentracija**

Mikrodiluciona metoda je korišćena za određivanje minimalne inhibitorne (MIC) i fungicidne koncentracije (MFC) testiranih metanolnih ekstrakata SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4 *Bacillus* spp. izolata, pojedinačno i u određenim kombinacijama. Za određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija korišćene su mikrotitracione ploče sa 96 mesta. Vršeno je dvostruko serijsko razblaživanje uzoraka TSB medijumom. Pored bunara sa ispitivanim ekstraktima, postavljena je i negativna kontrola (kontrola rasta gljiva) i kontrola sterilnosti (blank). Za svaki od testiranih ekstrakata rađeno je po dve kolone, u tri ponavljanja. Na kraju je dodavan određen volumen suspenzije sa inokulumom, za svaku gljivu drugačiji, tako da je finalna koncentracija bila 1×10^5 CFU/ml medijuma. Mikrotitracione ploče inkubirane su na 28 °C u trajanju od 72 sata. Najmanja koncentracija na kojoj nije bilo rasta uzimana je za MIC. Minimalne fungicidne koncentracije (MFC) određivane su reinokulisanjem po $2 \mu\text{l}$ iz bunarića u kome je određen MIC u $100 \mu\text{l}$ tečnog medijuma i inkubiranjem sledećih 72 h na 28 °C. Ukoliko nije bilo rasta, te koncentracije uzimane su za MFC. Kao pozitivna kontrola je korišćen komercijalni mikotik flukonazol, finalne koncentracije 2 mg/ml .

Određivanje tipa interakcija različitih ekstrakata

Za ispitivanje međusobnih interakcija metanolnih lipopeptidnih ekstrakata *Bacillus* spp. izolata prema određenim fungalnim patogenima izolovanim sa semena nevena, korišćena je prethodno opisana mikrodiluciona metoda u TSB medijumu i isti inokulumom sa svaku ispitivanu gljivu. Testirana koncentracija uniformisanih stokova ekstrakata iznosila je 14.25 mg/ml , dok je u slučaju pravljenja odgovarajućih smeša dva ili tri ekstrakta korišćena $1/2$, odnosno $1/3$ koncentracija uniformisanih stokova lipopeptidnih ekstrakata, respektivno. Ploče su inkubirane 72 h na 28 °C, nakon čega je izvršena provera rasta fungalnih kultura.

Kako bi se definisao tip međusobne interakcije određivani su frakcioni inhibitorni koeficijenti (eng. Fractional Inhibitory Concentration, FIC) i frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks (FIC_i).

Frakciona inhibitorna koncentracija je određivana je na sledeći način:

$\text{FIC(A)} = \text{MIC (A u prisustvu B)}/\text{MIC (A)}$; FIC jedinjenja A

$\text{FIC(B)} = \text{MIC (B u prisustvu A)}/\text{MIC (B)}$; FIC jedinjenja B

Frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks je računat prema formuli:

$$\text{FIC}_i = \text{FIC}_{(A)} + \text{FIC}_{(B)}$$

FIC_i za veći broj uzoraka se računata na isti način. Sabiraju se pojedinačne FIC vrednosti za sva jedinjenja čija se kombinacija testira.

Na osnovu vrednosti FIC indeksa definiše se tip interakcije između supstanci. Prema [23], kada je $FIC_i \leq 0.5$ onda se interakcija definiše kao sinergizam; kada je FIC_i između 0.5 i 1 u pitanju je aditivni efekat; efekat se smatra indeferentnim ako je FIC_i između 1 i 2 a ako su vrednosti veće od 2 na delu je antagonizam.

***In vitro* određivanje antifungalne aktivnosti lipopeptidnog ekstrakata i potencijalnog sinergizma sa etarskim uljima**

Za određivanje potencijalnog sinergizma na izolate gljiva korišćeni su lipopeptidni ekstrakt izolata *Bacillus* sp. SS-12.6, kao i etarska ulja čubra (*Satureja hortensis* L.) P0118884 i timijana (*Thymus vulgaris* L.) P0123774. Testirana etarska ulja su komercijalno nabavljena (Frey + Lau GmbH, Henstedt-Ulzburg, Nemačka). U radu je korišćena modifikovana metoda opisana kod [24]. U testiranju inhibitornog efekta ekstrakta izolata SS-12.6 i etarskih ulja, u PDA medijum su dodavane testirane supstance pojedinačno, kao i u različitim kombinacijama. Korišćene su određene koncentracije etarskih ulja u vidu prosečnih minimalnih inhibitornih koncentracija za sve vrste gljiva, prethodno određene u radu [25]. Korišćene koncentracije u eksperimentu bile su 0.21 mg/ml za ulje čubra i 0.40 mg/ml za ulje timijana. U slučaju testiranja pojedinačnih ulja i ekstrakta korišćeno je: (i) 1/4 prosečnih datih MIC vrednosti za ulja i 100 µl ekstrakta, dok je u slučaju kombinacija između ekstrakta i pojedinačnih ulja korišćeno (ii) 1/8 prosečnih MIC vrednosti za ulja i 50 µl ekstrakta, za razliku od kombinacije ekstrakta sa mešavinom ulja gde je korišćeno (iii) 1/16 prosečnih MIC vrednosti za ulja i 25 µl ekstrakta. Nakon sterilizacije, u rashlađeni PDA medijum, dodavane su odgovarajuće koncentracije etarskih ulja rastvorenih u Tween-u 80, kao i odgovarajuće zapremine ekstrakta. Testiranje je sprovedeno u pet ponavljanja za svaku kombinaciju. Rast gljiva na podlozi bez testiranih supstanci je korišćen kao kontrola. Pokazatelj stepena antagonističkog delovanja bila je razlika u porastu kolonija gljiva u odnosu na kontrolu. Procenat inhibicije rasta (percent growth inhibition, PGI) određivan je pomoću sledeće formule [26]:

$$PGI (\%) = KR - RI / KR \times 100,$$

gde je KR predstavljao rast gljiva u kontroli, dok je RI predstavljao rast gljiva u prisustvu inhibitornog agensa. Limpelova formula, kao što je opisano kod [27], je primenjena u cilju određivanja sinergističke interakcije između ekstrakta izolata *Bacillus* sp. SS-12.6 i etarskih ulja. Limpelova formula glasi:

$$Ee = X + Y - (XY/100);$$

u kojoj Ee predstavlja očekivani efekat iz aditivnih odgovora dva tretmana, dok X i Y predstavljaju procenat inhibicije rasta micelija u slučaju testiranja pojedinačnih supstanci. Prema datoj formuli, sinergizam postoji ukoliko kombinacija dve supstance daje vrednosti veće od Ee .

REZULTATI I DISKUSIJA

***In vitro* određivanje tipa interakcija i minimalnih inhibitornih i fungicidnih koncentracija lipopeptida**

U nekim slučajevima lipopeptidi izolovani iz vrsta iz roda *Bacillus* pokazuju direktan efekat na biljne patogene kao rezultat aktivnosti jedne dominantne familije lipopeptida, omogućavajući na taj način inhibiciju rasta, uprkos postojanju i drugih familija u manjoj meri [28]. Istraživanja ovog rada su se odnosila na ispitivanje aktivnosti pojedinih ekstrakata *Bacillus* spp. izolata, sa ciljem utvrđivanja postojanja različitih tipova interakcija lipopeptidnih ekstrakata, pojedinačno i u određenim kombinacijama. Ovom prilikom su korišćeni metanolni lipopeptidni ekstrakti finalne koncentracije 14.25 mg/ml. Testirane su gljive izolovane sa semena nevena i identifikovane korišćenjem suspenzije njihovih spora finalne koncentracije 1×10^5 CFU/ml medijuma. Vršeno je dvostruko serijsko razblaživanje ispitivanog ekstrakta, a najmanja koncentracija pri kojoj nije dolazilo do vizuelnog rasta gljiva nakon tri dana inkubacije, proglašavana je za MIC vrednost. Kod testiranja dva ekstrakta istovremeno korišćena je 1/2 koncentracije svakog (7.13 mg/ml): a u slučaju pravljenja smeše tri ekstrakta, korišćena je 1/3 svakog ekstrakta odnosno 4.75 mg/ml. Rezultati MIC i MFC vrednosti pojedinačnih i međusobno kombinovanih lipopeptidnih ekstrakata su prikazani u Tabeli 2, zajedno za mikotikom flukonazolom, kao pozitivnom kontrolom inhibicije rasta micelija.

Potvrđena je veoma dobra antifungalna aktivnost testiranih ekstrakata i uočene su značajno niske koncentracije potrebne za inhibiciju rasta testiranih gljiva. Najniže MIC vrednosti su dobijene za gljive roda *Fusarium* i vrstu *A. ochraceus*, dok su preostale dve vrste roda *Aspergillus* kao i *Penicillium* bile daleko rezistentnije na delovanje pojedinačnih ekstrakata, sa MIC vrednostima većim od 4 mg/ml (Tabela 2). Sa druge strane, niske koncentracije u opsegu od 0.008 do 0.019 mg/ml, su zabeležene za gotovo sve testirane ekstrakte u zavisnosti od ispitivane gljive, sa najizraženijim delovanjem ekstrakta SS-12.6 na *F. semitectum*, koja je ujedno i najosetljivija indikatorska gljiva ovog istraživanja. Imajući u vidu dobijene rezultate i vođeni idejom postojanja potencijalnog sinergizma između pojedinačnih ekstrakata, odabrane su tri vrste gljiva (*A. flavus*, *F. oxysporum* i *F. semitectum*) za testiranje njihovih kombinacija. Među pomenutim gljivama poznato je da je *A. flavus* kao jedna od najrezistentnijih, a ujedno i najpatogenija gljiva u smislu produkcije mikotoksina. Iako su dobijene vrednosti za *A. flavus* bile više u poređenju sa vrednostima dobijenim za vrste roda *Fusarium*, ipak su veoma značajne jer su odgovarajuće kombinacije ekstraktata postigle značajnu inhibiciju rasta, što nije bio slučaj kod testiranja pojedinačnih.

Tabela 2. Minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije testiranih lipopeptidnih ekstrakata pojedinačno i u odgovarajućim kombinacijama (mg/ml).

Table 2. Minimal inhibitory and fungicidal concentrations of lipopeptide extracts tested individually and in appropriate combinations (mg/ml).

Ekstrakti [mg/ml]	<i>A. flavus</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. ochraceus</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
SS-10.7	4.90	>4.90	>4.90	-	0.019	0.019	>4.90	-
SS-12.6	2.25	>2.25	>2.25	-	0.017	0.071	>2.25	-
SS-13.1	2.14	>2.14	>2.14	-	0.017	0.034	>2.14	-
SS-27.2	4.50	>4.50	0.563	>4.5	0.141	0.141	>4.50	-
SS-38.4	4.20	>4.20	>4.20	-	0.033	0.066	>4.20	-
Flukonazol	1.80	-	1.80	-	1.80	-	1.80	-
	<i>F. proliferatum</i>		<i>F. semitectum</i>		<i>F. solani</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
SS-10.7	0.153	0.153	0.019	0.019	0.076	0.153	0.019	0.019
SS-12.6	0.071	0.071	0.008	0.035	0.282	0.282	0.035	0.071
SS-13.1	0.017	0.034	0.017	0.034	0.067	0.067	0.034	0.067
SS-27.2	0.141	0.563	0.071	0.141	0.563	1.125	0.141	0.563
SS-38.4	0.132	0.263	0.016	0.016	0.132	0.263	0.132	0.263
Flukonazol	1.40	-	1.60	-	1.80	-	0.80	-
Kombinacije ekstrakata [mg/ml]	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. semitectum</i>		<i>A. flavus</i>			
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
SS-10.7 + SS-12.6	0.008	0.067		0.067	0.134		0.267	-
SS-10.7 + SS-13.1	0.067	0.067		0.067	0.067		0.267	-
SS-10.7 + SS-27.2	0.008	0.017		0.017	0.034		0.134	-
SS-10.7 + SS-38.4	0.067	0.134		0.017	0.034		0.535	-
SS-12.6 + SS-13.1	0.067	0.134		0.067	0.134		0.134	0.267
SS-12.6 + SS-27.2	0.008	0.067		0.034	0.067		0.134	-
SS-12.6 + SS-38.4	0.004	0.008		0.008	0.017		0.267	-
SS-13.1 + SS-27.2	0.067	0.134		0.067	0.067		0.134	0.134
SS-13.1 + SS-38.4	0.134	0.267		0.067	0.267		0.267	1.07
SS-10.7 + SS-12.6 + SS-38.4	0.004	0.004		0.008	0.017		0.134	-

Kombinacija ekstrakata iz SS-10.7 i SS-38.4 se u ovom slučaju pokazala neefikasnom, jer je za inhibiciju rasta bila potrebna najviša koncentracija ekstrakata, viša od 0.5 mg/ml. Za *F. oxysporum* su zabeležene najniže ostvarene MIC vrednosti od samo 0.004 mg/ml za kombinaciju ekstrakata iz izolata SS-12.6 i SS-38.4 i kombinaciju ekstrakata iz izolata SS-12.6, SS-38.4 i SS-10.7. Prilikom testiranja na *F. semitectum* dobijene vrednosti su bile više u odnosu na efekat pojedinačnih ekstrakata što navodi na pretpostavku da je u pitanju indiferentan ili

antagonistički efekat pojedinačnih ekstrakata u smeši. Rezultati određenih FIC i FICi vrednosti su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. FIC i FICi vrednosti ekstrakata u različitim kombinacijama i tip interakcije
Table 3. FIC and FICi values of extracts in different combinations and type of interaction.

Kombinacije ekstrakata	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>A. flavus</i>	Kombinacije ekstrakata	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>A. flavus</i>
FIC _{10.7}	0.42	3.53	0.05	FIC _{12.6}	0.23	4.25	0.06
FIC _{12.6}	0.23	8.38	0.12	FIC _{27.2}	0.06	0.48	0.03
FICi	0.65	11.90	0.17	FICi	0.29	4.73	0.09
Interakcija	Ad	A	S	Interakcija	S	A	S
FIC _{10.7}	3.53	3.53	0.05	FIC _{12.6}	0.11	1.00	0.12
FIC _{13.1}	1.97	3.94	0.12	FIC _{38.4}	0.03	0.50	0.06
FICi	5.50	7.47	0.18	FICi	0.14	1.50	0.18
Interakcija	A	A	S	Interakcija	S	I	S
FIC _{10.7}	0.42	0.89	0.03	FIC _{13.1}	1.97	3.94	0.06
FIC _{27.2}	0.06	0.24	0.03	FIC _{27.2}	0.48	0.94	0.03
FICi	0.48	1.13	0.06	FICi	2.45	4.88	0.09
Interakcija	S	I	S	Interakcija	A	A	S
FIC _{10.7}	3.53	0.89	0.11	FIC _{13.1}	3.94	3.94	0.12
FIC _{38.4}	0.51	1.06	0.13	FIC _{38.4}	1.02	4.19	0.06
FICi	4.03	1.96	0.24	FICi	4.96	8.13	0.19
Interakcija	A	I	S	Interakcija	A	A	S
FIC _{12.6}	1.91	8.38	0.06	FIC _{10.7}	0.21	0.42	0.03
FIC _{13.1}	1.97	3.94	0.06	FIC _{12.6}	0.11	1.00	0.06
FICi	3.88	12.32	0.12	FIC _{38.4}	0.03	0.50	0.03
Interakcija	A	A	S	FICi	0.36	1.92	0.12
				Interakcija	S	I	S

S-sinergistički efekat ≤ 0.5 ; *Ad*-aditivni efekat 0.5-1; *I*-indiferentan efekat 1-2; *A*-antagonistički efekat ≥ 2

Rezultati mnogih studija ukazuju da sojevi roda *Bacillus* proizvode više od jedne familije lipopeptida, pa se može pretpostaviti da postoje njegove ekološke prednosti usled sinergističke interakcije između različitih jedinjenja. Iturini i fengicini ostvaruju izrazito snažnu biokontrolu biljnih bolesti inhibirajući rast fitopatogena širokog opsega (*F. graminearum*, *R. solani* i *A. flavus*) ili post-žetvenih patogena poput *B. cinerea* i *P. expansum* [6, 9]. Takođe, u studiji [29] je pokazana značajna inhibicija *F. oxysporum* od strane *B. subtilis* *SQR1* soja kao producenta fengicina ili *B. subtilis* soja kao dominantnog producenta iturina *A*, pored ostalih lipopeptida u kontroli pomenutog patogena [30]. Slična aktivnost je primećena i za bacilomicin koji je odgovoran za inhibiciju rasta *Podospaera fusca*, uzročnika pepelnice [8]. Takođe, u skorašnjim radovima je potvrđena jaka

inhibitorna aktivnost *B. amyloliquifaciens* izolata, producenata surfaktina, na *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Penicillium italicum*, *A. niger* i *B. cinerea* [31,32].

Nasuprot ovim istraživanjima u radu [33] je pokazano da surfaktin negativno utiče na antifungalni potencijal fengicina, najverovatnije sprečavanjem pravljenja pora u membrani. Interakcije lipopeptidnih molekula su i dalje slabo razjašnjene, a svakako je potrebno dalje ih ispitivati. Buduća i tekuća istraživanja mehanizma dejstava lipopeptida, njihove diferencijalne aktivnosti i potencijalnih sinergističkih efekata pružiće nesumljivo bolje razumevanje efikasnog korišćenja ovih bakterijskih antagonista u kontroli biljnih patogena.

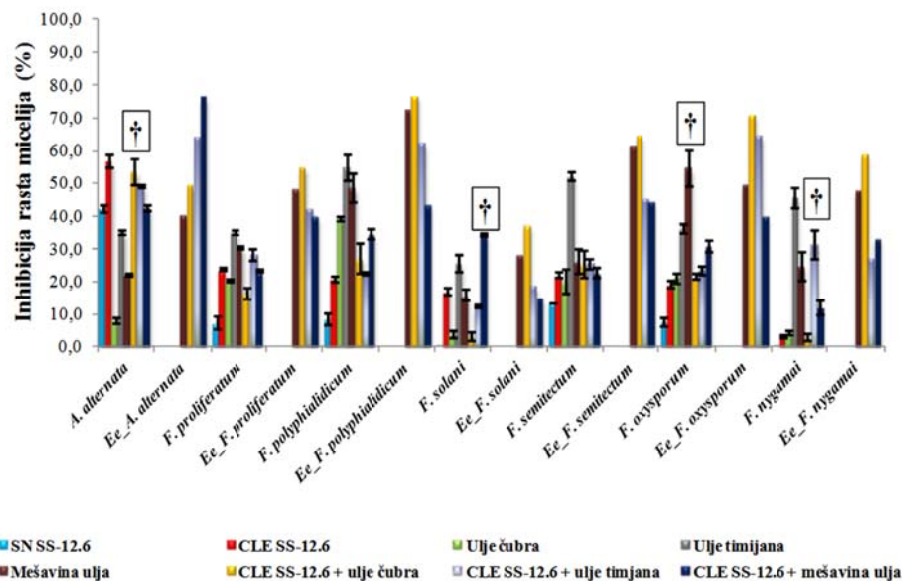
Utvrđivanje potencijalnog sinergističkog efekta SS-12.6 i etarskih ulja na rast fitopatogenih gljiva *in vitro*

Pokazano je da kombinacija komplementarnih bioloških pristupa sa aditivnim i/ili sinergističkim efektom može da obezbedi veću konzistenciju i efikasnost u biokontroli. Danas postoji sve veće interesovanje za etarskim uljima kao mogućoj zameni za konvencionalne sintetičke fungicide u cilju zaštite kultivisanih biljaka od fitopatogenih gljiva, zbog njihove opšte prihvaćenosti od potrošača, relativne bezbednosti za upotrebu i ekološke prihvatljivosti [34]. Literaturni podaci ukazuju na efikasnost i primenu kako etarskih ulja, tako i izolata roda *Bacillus* u zaštiti povrtarskih biljaka od strane fitopatogenih gljiva, tretmanom zemljišta u kome će biljka rasti, tretiranjem korena biljaka i/ili prskanjem listova [34,35] ili tretmanom etarskim uljima u prevenciji suzbijanja fungalnih infekcija semena [36].

Jedan od ciljeva ovog rada bio je i ispitivanje kombinacija etarskih ulja čubra i timijana, kao i ekstrakta izolata SS-12.6 na rast fitopatogenih gljiva sa semena nevena. Naime, prethodno istraživanje [19] je pokazalo određeni sinergistički antifungalni efekat ulja i ekstrakta SS-12.6 *in vitro* na odabrane fitopatogene gljive izolovane sa biljnih droga. Rezultati testiranja efekata pojedinačnih agenasa i određenih kombinacija na vrste gljiva izolovane sa semena nevena *in vitro*, kao i očekivane vrednosti sinergizma prikazani su na Slici 1.

Iz prikazanih rezultata može se uočiti da je ekstrakt izolata SS-12.6 uglavnom jače inhibirao rast većine ispitivanih gljiva u odnosu na ulje čubra, dok je testirani besćelijski supernatant imao najniži inhibicioni potencijal, sem u slučaju *A. alternata*. Sa druge strane, ulje timijana je pokazalo viši inhibicioni potencijal na svim gljivama u odnosu na ekstrakt SS-12.6. Međutim, *A. alternata* je bila procentualno najviše inhibirana kako delovanjem samog ekstrakta SS-12.6, tako i njegovom kombinacijom sa uljima, sa značajnom statističkom značajnošću prema Dankanovom testu višestrukog opsega (podaci nisu prikazani). Takođe, statistički značajna inhibicija rasta u slučaju testiranja pojedinačnih ulja ostvarena je prema *F. polyphialidicum*, dok je njihova kombinacija ispoljila statistički značajnu antifungalnu aktivnost prema *F. polyphialidicum* i *F. oxysporum*. Poređenjem

vrednosti procenata inhibicije rasta, korišćenjem Limpelove formule, u određenim kombinacijama je zabeležena prava sinergistička aktivnost, jer su ostvarene vrednosti inhibicije rasta gljiva bile veće od očekivanih vrednosti (*Ee*).



Slika 1. Sinergistička antifungalna aktivnost sirovog lipopeptidnog ekstrakta SS-12.6 (CLE) i etarskih ulja čubra i timijana *in vitro*.

Prikazane su srednje vrednosti procenta inhibicije rasta vrsta izolovanih sa semena nevena sa pojedinačnim etarskim uljima i ekstraktom SS-12.6, kao i njihove međusobne kombinacije, delovanje besćelijskog supernatanta (SN): ostvareni sinergistički efekat [†] i standardna greška. *Ee* vrednosti predstavljaju očekivane vrednosti sinergizma.

Figure 1. The synergistic antifungal activity of crude lipopeptide extract SS-12.6 (CLE) with savory and thyme essential oils *in vitro*.

Mean values of percent inhibition of fungal species growth isolated from marigold seeds with individual essential oils and extract of SS-12.6, as well as their mutual combination, activity of cell-free supernatant (SN): achieved synergistic effect [†] and standard error were shown. *Ee* values represent the expected values of synergism.

Sinergistička aktivnost je utvrđena za kombinaciju ekstrakta SS-12.6 i ulja čubra na rast *A. alternata*, a takođe i za kombinaciju ovog ekstrakta i ulja timijana u delovanju protiv *F. nygamai*, za razliku od ranijeg istraživanja [19] gde je veći efekat ove kombinacije bio usmeren ka *F. semitectum* i *F. solani*. U kombinaciji oba ulja sa ekstraktom SS-12.6 sinergistička aktivnost je zabeležena jedino na rast

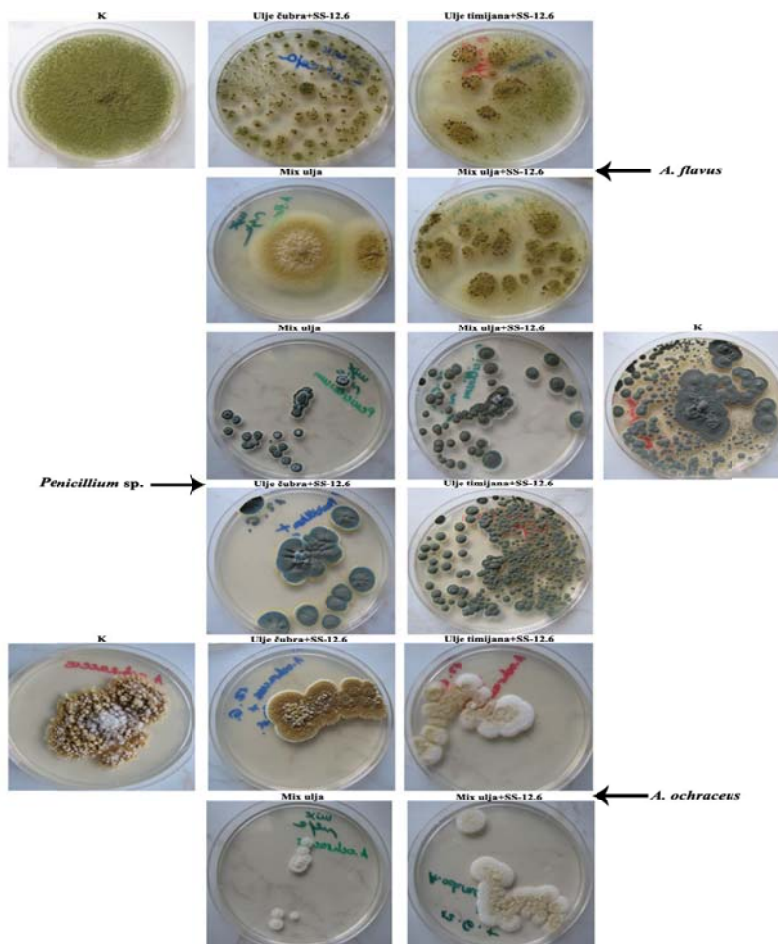
F. solani, što je veoma značajno s'obzirom na rezistentnost ovog patogena na delovanje pojedinačnih agenasa, što se poklapa sa rezultatima iz [19], gde je pokazan sinergistički efekat na *F. solani* u slučaju kombinacije ekstrakta SS-12.6 sa pojedinačnim uljima timijana i čubra. Pored veoma efikasnog delovanja kombinacije oba ulja aditivnim efektom, detektovan je i sinergistički efekat na rast *F. oxysporum*. U okviru ovog dela istraživanja testirane su različite kombinacije agenasa i na *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* i *Penicillium* sp., ali za ove gljive je bilo teško predstaviti procentualnu inhibiciju rasta micelija zbog difuznog i nekompaktnog rasta (Slika 2). *A. ochraceus* je uglavnom bio neosetljiv na supernatant i lipopeptidni ekstrakt SS-12.6, dok je značajnija inhibicija rasta zabeležena tretmanom sa uljem timijana, koje je dovelo do primetnog gubitka pigmentacije micelije, kao i u prethodnom slučaju kod *F. semitectum* i *F. oxysporum*. Gotovo potpuna inhibicija rasta *A. ochraceus* i *Penicillium* sp., ostvarena je korišćenjem mešavine oba ulja što verovatno ukazuje na sinergistički efekat. Takođe, utvrđena je i nešto manja inhibicija rasta u kombinaciji ekstrakta i oba ulja za ove patogene. Naneta zapremina besćelijskog supernatanta i ekstrakta izolata SS-12.6 nije bila dovoljna za inhibiciju rasta micelija ovih gljiva, dok je primetna inhibicija zabeležena u tretmanu sa uljem čubra pojedinačno i kombinaciji sa ekstraktom. Ulje timijana nije ispoljilo značajnu inhibitornu aktivnost na rast *A. flavus*, *A. niger* i *Penicillium* sp. pojedinačno, ali je nešto bolja aktivnost zabeležena u kombinaciji sa ekstraktom SS-12.6. Ipak najveća inhibitorna aktivnost ostvarena je mešavinom oba ulja, slično kao i kombinacijom oba ulja i ekstrakta izolata SS-12.6.

Eksperimentalno je pokazano da kombinacija etarskih ulja i izolata *Bacillus* spp. može biti vrlo efikasna u kontroli patogenih gljiva na voću. Tako je kombinacijom *B. amyloliquefacijens* i etarskog ulja limunske trave (*Cymbopogon citrates*) postignut izostanak fitopatogenih oboljenja na skladištenim breskvama sinergističkim dejstvom ovih bioloških agenasa [35]. Takođe, visoka efikasnost u prevenciji kontaminacije patogenim gljivama povrtarskih biljaka postignuta je integrisanim tretmanom zemlje kombinacijom gljive antagoniste i odabranih etarskih ulja, poput kima, timijana, nane i geranijuma [34]. Sinergizam u antifungalnoj aktivnosti lipopeptidnog ekstrakta i etarskih ulja može se tražiti u hemijskoj strukturi ovih agenasa i aktivnosti usmerenoj ka citoplazmatičnoj membrani. Smanjenje površinskog napona, modifikacije površinskih osobina i perturbacija lipidnog dvosloja su neka od različitih svojstava karakterističnih za surfaktantska jedinjenja, čime se objašnjava deo njihove biološke aktivnosti [4].

Zbog velikog broja konstituenata, čini se da etarska ulja nemaju specifične ćelijske targete [37] ali, kao tipični lipofilni molekuli prolaze kroz ćelijski zid i citoplazmatičnu membranu, remeteći strukturu permeabilizacijom njihovih različitih slojeva sastavljenih od polisaharida, masnih kiselina i fosfolipida.

Slika 2. Sinergistička aktivnost ekstrakta SS-12.6 i etarskih ulja čubra i timijana *in vitro* prema *A. flavus*, *Penicillium* sp. i *A. ochraceus*.

Figure 2. The synergistic activity of the extract SS-12.6 with savory and thyme essential oils *in vitro* against *A. flavus*, *Penicillium* sp. and *A. ochraceus*.



ZAKLJUČAK

Utvrđivanjem tipa interakcija i minimalne inhibitorne koncentracije lipopeptidnih ekstrakata pojedinačno i u različitim kombinacijama *in vitro*, uočeni su svi tipovi interakcija, sa naglašenim aditivnim i sinergističkim efektima u pojedinim kombinacijama protiv gljiva izolovanih sa semena nevena, sa izraženim

antimikrobnim efektima naročito prema izolatima roda *Fusarium*. Ispitivanjem tipa interakcija ekstrakta SS-12.6 i etarskih ulja in vitro, detektovan je sinergistički efekat kombinacije ekstrakta sa uljem čubra na rast *A. alternata*, sa uljem timijana protiv *F. nygamai*, kao i u kombinaciji sa oba ulja ka *F. solani*. Mikrobiološki biopesticidi, a naročito proizvodi na bazi sojeva roda *Bacillus*, unapređuju i štite zdravlje biljaka kroz mnoge mehanizme i time skreću pažnju na sebe u smislu komercijalne aplikacije. Činjenica je da mnogi sojevi roda *Bacillus* proizvode više od jedne familije lipopeptida i može se pretpostaviti da postoje ekološke prednosti za same biljke, usled sinergističke interakcije između različitih jedinjenja. Međutim, interakcije lipopeptidnih molekula su i dalje slabo razjašnjene, a dodatna istraživanja aditivnog, sinergističkog ili antagonističkog delovanja u smislu uzajamne inhibicije ili delotvornog dejstva različitih lipopeptidnih molekula je svakako potrebno dalje ispitivati.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je podržan od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Br. projekta: OI 173026).

LITERATURA

1. K. Pal, M. Gardener, B. M. (2006): Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor, **2**: 1117-1142.
2. H. Cawoy, W. Bettiol, P. Fickers, M. Ongena (2011): *Bacillus*-based biological control of plant diseases. Pesticides in the modern world—pesticides use and management. In Tech, Rijeka, 273-302.
3. A. Hamdache, R. Azarken, A. Lamarti, J. Aleu, G. Collado (2013): Comparative genome analysis of *Bacillus* spp. and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production. Phytochemistry Reviews, **12**(4): 685-716.
4. M. Ongena, P. Jacques (2008): *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, **16**(3): 115-125.
5. N. Roongsawang, K. Washio, M. Morikawa (2010): Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. International Journal of Molecular Sciences, **12**(1): 141-172.
6. O. Asaka, M. Shoda (1996): Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology, **62**(11): 4081-4085.
7. V. Leclère, M. Béchet A. Adam, S. Guez, B. Wathelet, M. Ongena, P. Jacques (2005): Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the

- organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(8): 4577-4584.
8. D. Romero, A. de Vicente, H. Rakotoaly, E. Dufour, W. Veening, E. Arrebola, A. Pérez-García (2007): The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**(4): 430-440.
 9. Y. Toure, M. Ongena, P. Jacques, A. Guiro, P. Thonart (2004): Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, **96**(5): 1151-1160.
 10. J. Wang, J. Liu, H. Chen, J. Yao, (2007): Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **76**(4): 889-894.
 11. S. Hiradate, S. Yoshida, H. Sugie, H. Yada, Y. Fujii (2002): Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, **61**(6): 693-698.
 12. S. Chitarra, P. Breeuwer, R. Nout, C. Van Aelst, M. Rombouts, T. Abee (2003): An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10–20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, **94**(2):159-166.
 13. L. Moyne, R. Shelby, E. Cleveland, S. Tuzun (2001): Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, **90**(4): 622-629.
 14. Y. Yu, B. Sinclair, L. Hartman, L. Bertagnolli (2002) Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**(7): 955-963.
 15. N. Velmurugan, S. Choi, S. Han, S. Lee (2009): Evaluation of antagonistic activities of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* against wood-staining fungi: *in vitro* and *in vivo* experiments. *The Journal of Microbiology*, **47**(4): 385-392.
 16. L. Li, M. Mo, Q. Qu, H. Luo, K. Zhang (2007): Compounds inhibitory to nematophagous fungi produced by *Bacillus* sp. strain H6 isolated from fungistatic soil. *European Journal of Plant Pathology*, **117**(4): 329-340.
 17. A. Etchegaray, C. de Castro Bueno, S. de Melo, M. Tsai, M. de Fátima Fiore, E. Silva-Stenico, O. Teschke (2008): Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of Microbiology*, **190**(6): 611-622.
 18. I. Dimkić, S. Živković, T. Berić, Ž. Ivanović, V. Gavrilović, S. Stanković, D. Fira (2013): Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, **65**(3): 312-321.

19. I. Dimkić, T. Berić, T. Stević, S. Pavlović, S., K. Šavikin, D. Fira, S. Stanković (2015): Additive and synergistic effects of *Bacillus* spp. isolates and essential oils on the control of phytopathogenic and saprophytic fungi from medicinal plants and marigold seeds. *Biological Control*, **87**: 6-13.
20. S. Stankovic, B. Soldo, T. Beric-Bjedov, J. Knezevic-Vukcevic, D. Simic, V. Lazarevic (2007): Subspecies-specific distribution of intervening sequences in the *Bacillus subtilis* prophage ribonucleotide reductase genes. *Systematic and Applied Microbiology*, **30**(1): 8-15.
21. J. Vater, B. Kablitz, C. Wilde, P. Franke, N. Mehta, S. Cameotra (2002): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(12): 6210-6219.
22. Booth, C. (1971). Fungal culture media. In: Norris, J. R., Ribbons, D. W., eds. *Methods in Microbiology* (pp. 49-94). Academic Press, London and New York.
23. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2000): Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection*, **6**: 503-508.
24. A. Zambonelli, Z. d'Aulerio, A. Bianchi, A. Albasini (1996): Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *Journal of Phytopathology*, **144**(9-10): 491-494.
25. T. Stević, T., Berić, K. Šavikin, M. Soković, D. Godevac, I. Dimkić, S. Stanković (2014): Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, **55**, 116-122.
26. L. Korsten, S. De Jager (1995): Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, **18**: 124-130.
27. L. Richer (1987): Synergism: a patent view. *Pest Management Science*, **19**: 309-315.
28. J. Falardeau, C. Wise, L. Novitsky, J. Avis (2013): Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, **39**(7): 869-878.
29. Y. Cao, Z. Xu, N. Ling, Y. Yuan, X. Yang, L. Chen, Q. Shen (2012): Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae*, **135**: 32-39.
30. M. Cazorla, D. Romero, A. Pérez-García, J. Lugtenberg, D. Vicente, G. Bloemberg (2007): Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, **103**(5): 1950-1959.

31. A. Romano, D. Vitullo, A. Di Pietro, G. Lima, V. Lanzotti (2011): Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO7. *Journal of Natural Products*, **74**(2): 145-151.
32. A. Romano, D. Vitullo, M. Senatore, G. Lima, V. Lanzotti (2013): Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A. *Journal of Natural Products*, **76**(11): 2019-2025.
33. Y. Tao, M. Bie, X. Lv, Z. Zhao, X. Lu (2011): Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. *The Journal of Microbiology*, **49**(1): 146-150.
34. M. Abdel-Kader, N. El-Mougy, S. Lashin (2011): Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root rot pathogens. *Journal of Plant Protection Research*, **51**(3): 306-313.
35. 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*, **29**(4): 369-377.
36. Q. Kritzinger, S. Aveling, O. Marasas (2002): Effect of essential plant oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds. *Seed Science and Technology*, **30**: 609-619.
37. F. Carson, J. Mee, V. Riley (2002): Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**(6): 1914-1920.

IN VITRO ANTIFUNGAL POTENTIAL OF *BACILLUS* SPP. ISOLATES AS BIOCONTROL AGENTS

**Ivica Dimkić¹, Tatjana Stević^{2*}, Tanja Berić¹, Ivan Nikolić¹,
Tamara Janakiev¹, Đorđe Fira¹, Slaviša Stanković¹**

¹ Faculty of Biology, University of Belgrade, Studentski trg 16, 11000 Belgrade, Serbia

² Institute for Medicinal Plants Research “Dr Josif Pančić”, Tadeuša Košćuška 1, 11000 Belgrade, Serbia

SUMMARY

Plant diseases caused by infection with pathogenic fungi can lead to the reduction in the capacity of plant growth or can cause far more serious damage, leading to the death of plants and significant losses in food production. Numerous recent studies are devoted to the investigation of bacteria from genus *Bacillus* as producers of secondary metabolites that can be used in the control of different plant pathogens. In this study, strong antifungal effect of lipopeptide extracts towards 11 fungi tested was observed, with lowest recorded minimal inhibitory concentrations of 0.008 mg/ml against *Fusarium semitectum*. In the analysis of the interaction of lipopeptide extracts mutually, as well as in combination with essential oils, the existence of a synergistic effect *in vitro* was shown. In combination of isolate SS-12.6 extract and savory oil on the growth of *Alternaria alternata*, as well as in combination of the same extract and thyme oil in acting against *Fusarium nygamai*, synergistic effect was achieved. The combination of both oils and extract of SS-12.6 showed synergistic activity only against *Fusarium solani*. To date, it has been shown that the combination of complementary biological approaches with additive and/or synergistic effect may provide greater consistency and efficiency in biocontrol, so in that sense there is a growing interest for agents that could possible act as replacement of conventional synthetic fungicides in protection of cultivated plants from phytopathogenic fungi.

Keywords: *Bacillus*, essential oils, antifungal potential, synergism, biological control.