

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Tatjana R. Stević

**Komparativna analiza agenasa za biološku
kontrolu patogenih gljiva izolovanih sa
lekovitih biljaka**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Tatjana R. Stević

**Comparative analysis of agents for
biological control of pathogenic fungi
isolated from medicinal plants**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Najveći deo eksperimentalnog istraživanja urađen je u laboratoriji za mikrobiološku kontrolu Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, a manji na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu i Institutu za biološka istraživanja „Dr Siniša Stanković“ u Beogradu.

Mentori:

Dr Tanja Berić, docent,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Katarina Šavikin, naučni savetnik,
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd

Članovi komisije:

Dr Slaviša Stanković, vanredni profesor,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Marina Soković, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja „Dr Siniša Stanković“, Beograd

Dr Dejan Gođevac, viši naučni saradnik,
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd

Datum odbrane:

Za ostvarenje ove doktorske disertacije zahvaljujem se svojim mentorima dr Tanji Berić i Dr Katarini Šavikin.

Dr Tanji Berić, docentu Biološkog Fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na izboru problematike, za vođenje rada, sugestijama pri sumiranju rezultata, kritičkoj oceni rada, velikoj moralnoj podršci i strpljenju.

Dr Katarini Šavikin, naučnom savetniku Instituta za lekovito bilje "Dr Josif Pančić" u Beogradu, na ukazanom poverenju i inicijalnoj ideji za rad, ogromnoj podršci tokom izrade kao i konstruktivnim primedbama koje su uticale da krajnji oblik ovog rada dobije na kvalitetu.

Dr Slaviši Stanković, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na ukazanom poverenju, izboru problematike, angažovanju oko pregledanja i korigovanja rukopisa i savetima koji su doprineli uobličavanju zaključaka i konačnog teksta ovog rada.

Dr Marini Soković, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja "Dr Siniša Stanković" iz Beograda, na stručnim sugestijama i savetima pri utvrđivanju aktivnosti etarskih ulja, detaljnom upoznavanju njihovih aktivnih principa, kao i prijateljskoj podršci tokom izrade ovog rada.

Dr Dejanu Gođevcu, višem naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, iz Beograda, na stručnoj pomoći u hemijskoj analizi etarskih ulja i kritičkom razmatranju rezultata.

Najtoplije se zahvaljujem dr Snežani Pavlović, za uvođenje u čudesni svet gljiva i nesebičnu pomoć koju mi je pružila prilikom njihove determinacije.

Iskrenu zahvalnost dugujem Milošu Nikolić na nesebičnoj pomoći pri eksperimentalnom radu pri izolaciji spora gljiva i Dr Goradani Zdunić u okviru hemijske analize etarskih ulja.

Posebnu zahvalnost dugujem Ivici Dimkić na uloženom trudu, vremenu i strpljenju pri statističkoj obradi rezultata.

Svojim kolegicama iz laboratorije najtoplije se zahvaljujem na nesebičnoj i prijateljskoj podršci koju su mi pružale tokom izrade disertacije, kao i svim kolegama iz Instituta koji su bili uz mene.

Svom saputniku bezgranično sam zahvalna na razumevanju, strpljenju, odricanju i podršci, kao i tehničkoj pripremi rada. Veliko hvala mojoj porodici i prijateljima na toplini i podršci koja mi je pomogla da istrajem do kraja.

Komparativna analiza agenasa za biološku kontrolu patogenih gljiva izolovanih sa lekovitih biljaka

Rezime

Primena lekovitog bilja i njihovih preparata u prevenciji i lečenju različitih poremećaja u ljudskom organizmu može biti ograničena njihovom mogućom kontaminacijom fitopatogenim gljivama i mikotoksinima. Saznanja o 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.

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 nane. 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*, *Phomopsis*, *Verticillium*, *Dreschlera* (= *Bipolaris*), *Rhizoctonia*, *Septoria*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Stahybotrys*, *Trichotecium*, *Puccinia*, *Botrytis*, *Mucor* i *Rhizopus* sp., u zavisnosti od biljne droge.

U cilju pronalaženja efikasnog biokontrolnog agensa ispitivali smo mogućnost primene etarskih ulja i 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*.

Ispitivan je kvalitativni i kvantitativni sastav, kao i antifungalna aktivnost 22 etarska ulja (čubra, origana, timijana, ruže, anisa, čajnog drveta, zdravca, lavande, korijandera, bergamota, ljubičice, ruzmarina, bibera, cimeta, bosiljka, dalmatinske i španske žalfije, eukaliptusa, limuna, narandže, kamilice i vetivera).

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). Sva testirana etarska ulja su pokazala antifungalnu aktivnost na sve fitopatogene gljive izolovane sa biljnih droga, ali sa različitim stepenom inhibitorne aktivnosti. Etarska ulja čubra, origana i timijana, sa fenolima kao dominantnim komponentama, pokazala su najveći antifungalni potencijal na sve testirane gljive, pri najnižim koncentracijama. Etarska ulja vetivera i kamilice, sa seskviterpenima kao dominantnim komponentama, su pokazala najslabiju antifungalnu aktivnost, kao i etarska ulja eukaliptusa, limuna i narandže u kojima preovladavaju monoterpenski ugljovodonici. Ostala ulja ispoljila su od veoma dobre do umerene antifungalne aktivnosti.

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*.

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.

Primenom *in vitro* testa dvojne kultivacije ispitivana je antagonistička aktivnost 14 izolata *Bacillus* sp. prema odabranim gljivama. Testirani izolati ispoljili su 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 ispoljili najslabiju inhibitornu aktivnost na gotovo sve testirane gljive. 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.

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

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.

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.

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.

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

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija mikroorganizama

UDK broj: [[633.7+579.852.1]:[581.135.5:581.573]]:582.282.123 (043.3)

Comparative analysis of agents for biological control of pathogenic fungi isolated from medicinal plants

Abstract

The application of medicinal plants and their preparations for the prevention and treatment of various disorders in humans may be limited by the possible contamination with phytopathogenic fungi and mycotoxins. Risk of using chemical fungicides for the operator, the consumer and the environment, have led to increasing interest in the introduction of alternative measures in plant protection. Lately, preparations of natural origin, so-called biological control agents are in the focus of investigation. 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 in plant protection.

Examining over 40 stored dried medicinal plant species the lowest microbial quality were determined for next herbal drugs: *Maydis stigmata* (corn silk), *Mentha* leaf and herb (mint herb and leaf), *Urtica* leaf (nettle leaf), *Equisetum* herb (horsetail herb) and *Calendula* flower (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*. Twelve species of the genus *Fusarium* was identified. In addition, species from the following genera were identified: *Phoma*, *Cephalosporium*, *Nigrospora*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Cercospora*, *Phomopsis*, *Verticillum*, *Dreschlera* (= *Bipolaris*), *Rhizoctonia*, *Septoria*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Stahybotrys*, *Trichotecium*, *Puccinia*, *Botrytis*, *Mucor* and *Rhizopus* sp. depending on plant species.

In order to find an effective biological control agent, we investigated the possibility of applying the essential oils and isolates of *Bacillus* sp. in the control of selected identified fungi. In this regard, we chose the following fungal species: *Fusarium solani*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* (isolated from corn silk and marigold flower), *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*, *Myrotechium verrucaria*, *Phoma* sp., *Phomopsis* sp. and *Verticillium dahliae*.

The antifungal activity and the qualitative and quantitative content of 22 essential oils were investigated (savory, oregano, thyme, rose, anise, tea tree, geranium, lavender, coriander, bergamot, violet, rosemary, pepper, cinnamon, basil, dalmatian and spanish sage, eucalyptus, lemon, orange, chamomile and vetiver).

Microdilution method on microtitration plates was used for monitoring the antifungal activity of essential oils and for determination of their minimum inhibitory and fungicide concentration (MIC and MFC) *in vitro*. All tested essential oils showed antifungal activity on pathogenic fungi isolated from herbal drugs, but with varying degrees of inhibitory activity. Essential oils of savory, oregano and thyme, with phenols as the dominant component, were the most effective, at the lowest concentration, while chamomile and vetiver oils, and those from *Citrus* species, with dominant monoterpen hydrocarbons, were the least effective against pathogenic fungi. Other oils had expressed from very good to moderate antifungal activity. Among all *Fusarium* species, *F. subglutinans*, *F. semitectum* and *F. sporotrichioides*, and *T. viride*, *A. alternata*, *A. flavus* i *Chaetomium* sp. among other genera, showed very good resistance to all oils investigated. *F. oxysporum* (from corn silk), *M. verrucaria* and *T. roseum* were the most susceptible 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 situ* tests, we showed that the highest efficacy in reducing the total number of fungi in samples of herbal drugs exhibited essential oils of thyme, oregano and rose.

Using *in vitro*, dual cultivation assay, we have investigated antagonistic activity of 14 *Bacillus* sp. isolates, against selected fungal species. Tested isolates showed various degree of inhibition against different types of plant pathogenic fungi. The best antagonism against selected phytopathogenic fungi showed isolates SS-12.6, SS-13-1, as well as SS-27.7, SS-38.3, SS-38.4 and SS-40.2. *Bacillus* sp. isolates SS-39.1 and SS-39.3 manifested the weakest antagonistic effect against almost all fungi tested. Minor antagonism against most fungi exhibited *Bacillus* sp. isolates SS-10.7 and SS-21.7. The

rest of isolates (SS-6.2, SS-35.4, SS-38.2 and SS-40.6) exhibited different antifungal potential depending on the test fungi. According to the comparative analysis of the obtained results it can be said that *Fusarium* species were more resistant to *Bacillus* sp. isolates from other genera of fungi.

Evaluation of lipopeptide extracts isolated from *Bacillus* sp. SS-12.6 and SS-13.1 isolates showed that the lipopeptide extract from SS-12.6 was very effective in inhibition of the growth of most fungi tested, while the lipopeptide extract from isolate SS-13.1 did not exhibit a significant antagonism against the majority of tested fungi, except *Penicillium* sp.

Examining the potential synergism between *Bacillus* sp. isolates SS-12.6 and SS-13.1 and the essential oils of thyme, savory and roses, against the *Fusarium* species, showed that the isolates were more effective in the presence of 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 area: Biology

Specific scientific research area: Biology of microorganisms

UDK number: [[633.7+579.852.1]:[581.135.5:581.573]]:582.282.123 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kontaminacija lekovitog bilja odnosno biljne droge	2
1.1.1. Kontaminacija fitopatogenim gljivama	4
1.1.2. Kontaminacija biljne droge mikotoksinima	5
1.2. Biološka kontrola patogenih gljiva	9
1.2.1. Etarska ulja u biološkoj kontroli fitopatogenih gljiva	9
1.2.1.1. Antifungalna aktivnost etarskih ulja i njihovih komponenata	10
1.2.1.2. Različiti oblici primene etarskih ulja	12
1.2.2. Mikroorganizmi kao antagonisti.....	14
1.2.2.1. Mehanizmi antagonističke aktivnosti biokontrolnih agenasa.....	15
1) Kompeticija za prostor i hranljive sastojke	16
2) Proizvodnja antibiotika i litičkih enzima.....	17
3) Indukcija imunog odgovora biljke.....	19
4) Inhibicija enzima uključenih u patogenezu gljiva	20
1.2.2.2. Unapređenje efikasnosti antagonista	20
2. CILJ	22
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. MATERIJAL	23
3.1.1. Biljne droge	23
3.1.2. Etarska ulja	23
3.1.3. Sintetički fungicid	24
3.1.4. Kolekcija prirodnih izolata <i>Bacillus</i> sp.	24
3.1.5. Podloge.....	24
3.2. METODE.....	25
3.2.1. Identifikacija gljiva	25

3.2.2. Određivanje hemijskog sastava etarskih ulja	26
3.2.3. Pripremanje koncentracije spora za mikrodilucionu metodu.....	26
3.2.4. <i>In vitro</i> test za određivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja.....	27
3.2.5. Test za utvrđivanje sinergističke aktivnosti etarskih ulja.....	28
3.2.6. ISO 21527-2 metoda za brojanje kvasaca i plesni korišćena u <i>in vitro</i> ispitivanjima uticaja etarskih ulja na ukupan broj gljiva u biljnim drogama.....	29
3.2.7. <i>In vitro</i> i <i>in situ</i> test za određivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja.....	29
3.2.7.1. <i>In vitro</i> test.....	29
3.2.7.2. <i>In situ</i> test	29
3.2.8. <i>In vitro</i> ispitivanje antagonističke aktivnosti izolata <i>Bacillus</i> sp. na fitopatogene gljive.....	30
3.2.9. Ispitivanje sinergističke aktivnosti etarskog ulja i izolata <i>Bacillus</i> sp.	31
3.2.10. Statistička analiza	31
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	32
4.1. Identifikacija gljiva sa biljnih droga	32
4.1.1. Rod <i>Fusarium</i>	34
4.1.1.1. <i>Fusarium verticillioides</i> /Sacc./ Nirenberg (sin: <i>F. moniliforme</i> Sheldon)	35
4.1.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl emend. Snyder & Hasen	36
4.1.1.3. <i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherbakoff.....	37
4.1.1.4. <i>Fusarium tricinctum</i> (Corda) Saccardo	37
4.1.1.5. <i>Fusarium subglutinans</i> (Wollenw. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas comb. Nov.	38
4.1.1.6. <i>Fusarium semitectum</i> Berkeley & Ravenel.....	39
4.1.1.7. <i>Fusarium solani</i> Martius	39
4.1.1.8. <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Saccardo	40
4.1.2. Rod <i>Alternaria</i>	41
4.1.2.1. <i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler.....	41

4.1.2.2. <i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire	42
4.1.3. Rod <i>Phoma</i>	42
4.1.4. Rod <i>Phomopsis</i>	43
4.1.5. <i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	44
4.1.6. <i>Trichoderma viride</i> Persoon C.H.	45
4.1.7. Rod <i>Aspergillus</i>	46
4.1.7.1. <i>Aspergillus flavus</i> Link H.F.	46
4.1.7.2. <i>Aspergillus niger</i> Arthur de Cock	47
4.1.8. <i>Trichothecium roseum</i> Link H.F.	47
4.1.9. <i>Verticillium dahliae</i> Klebahn	48
4.1.10. <i>Gliocladium roseum</i> Bainier	49
4.1.11. <i>Myrothecium verrucaria</i> (Alb. & SCHwein.) Ditmar	49
4.1.12. <i>Chaetomium</i> sp. Lodha	50
4.1.13. Rod <i>Penicillium</i>	50
4.2. Hemijski sastav i antifungalna aktivnost etarskih ulja	52
4.2.1. Etarska ulja čubra (<i>Satureja hortensis</i>), origana (<i>Origanum heracleoticum</i>) i timijana (<i>Thymus vulgaris</i>)	54
4.2.2. Etarska ulja ruže (<i>Rosa damascena</i>) i zdravca (<i>Pelargonium graveolens</i>) ...	60
4.2.3. Etarska ulja lavande (<i>Lavandula angustifolia</i>), korijandera (<i>Coriandrum sativum</i>) i bergamota (<i>Citrus aurantium</i>)	64
4.2.4. Etarsko ulje ploda/semena anisa (<i>Illicium verum</i>)	70
4.2.5. Etarsko ulje lista čajnog drveta (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	72
4.2.6. Etarsko ulje ljubičice (<i>Viola odorata</i>)	75
4.2.7. Etarsko ulje crnog bibera (<i>Piper nigrum</i>)	78
4.2.8. Etarsko ulja kore cimeta (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	81
4.2.9. Etarsko ulje bosiljka (<i>Ocimum basilicum</i>)	84
4.2.10. Etarska ulja dalmatinske žalfije (<i>Salvia officinalis</i>), španske žalfije	87

(<i>Salvia lavandulifolia</i>) i ruzmarina (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	87
4.2.11. Etarska ulja limuna (<i>Citrus limon</i>), narandže (<i>Citrus aurantium</i>) i eukaliptusa (<i>Eucalyptus globulus</i>)	94
4.2.12. Etarsko ulje cveta kamilice (<i>Matricaria recutita</i>).....	98
4.2.13. Etarsko ulje vetivera (<i>Vetiveria zizanoides</i>).....	101
4.3. Sinergistička aktivnost etarskih ulja	104
4.3.1. Antifungalna aktivnost mešavine etarskih ulja ruže i lavande.....	105
4.3.2. Antifungalna aktivnost mešavina etarskih ulja timijana i origana.....	106
4.3.3. Antifungalna aktivnost mešavina etarskih ulja origana i lavande.....	106
4.4. <i>In vitro</i> i <i>in situ</i> ispitivanja uticaja odabranih etarskih ulja na ukupan broj gljiva na biljnim drogama	108
4.5. Usporedna analiza antifungalne aktivnosti etarskih ulja u <i>in vitro</i> testovima.....	110
4.6. Antifungalna aktivnost izolata <i>Bacillus</i> sp.	117
4.6.1. Ispitivanja antagonističkog potencijala različitih izolata <i>Bacillus</i> sp.....	117
4.6.2. Sinergistički efekat <i>Bacillus</i> sp. izolata SS-12.6 i SS-13.1 i odabranih etarskih ulja na rast fitopatogenih ulja	128
4.6.3. Potencijalna primena ispitivanih etarskih ulja i izolata <i>Bacillus</i> sp. u kontroli fitopatogenih gljiva sa lekovitog bilja.....	131
5. ZAKLJUČCI.....	135
6. LITERATURA	138
PRILOG 1	162
PILOG 2	165
PRILOG 3.	180

1. UVOD

Lekovite biljke su se od davnina koristile u narodnoj medicini u prevenciji, tretmanu i lečenju različitih poremećaja i oboljenja. Koriste se i za izradu savremenih farmaceutskih preparata i dijetetskih suplemenata. Biljne lekovite sirovine (biljne droge), su osušeni delovi lekovitog bilja (cvet, list, herba, koren, seme, plod) u užem smislu reči, a u širem predstavljaju i proizvode koji se kao takvi javljaju u biljkama (masna ulja, etarska ulja, smole itd.). Mnoge biljne droge koriste se i dalje kao takve, neke kao sirovine za izradu standardizovanih ekstrakata, od kojih se kasnije izrađuju fitopreparati definisanog sastava (kapsule, tablete, masti, sirupi i dr.), dok se značajan broj droga koristi za izolaciju određenih hemijskih jedinjenja, koje dalje služe kao polazna sirovina u sintezi nekih lekova (Tasić *et al.*, 2001).

Uprkos svom prirodnom poreklu, biljne droge se moraju posmatrati kao polazne sirovine za izradu farmaceutskih proizvoda koji moraju biti efikasni i bezbedni za upotrebu, što je određeno zakonskom regulativom (Calixto *et al.*, 2000). Premisa da upotreba ovih proizvoda garantuje i njihovu bezbednost nije tačna jer prirodno poreklo ne garantuje bezbednost i efikasnost. Utvrđen je moguć negativan efekat duže upotrebe biljaka i njihovih proizvoda usled nepravilne upotrebe i prekoračene doze, prisustva toksičnih jedinjenja u pojedinim biljnim vrstama kao i kontaminacije patogenim mikroorganizmima i toksinima (Tassaneeyakul, 2004; Mandeel, 2005). Kontaminiranost mikroorganizmima značajno utiče na ukupan kvalitet biljnih preparata te je procena rizika mikrobiološke kontaminacije lekovitog bilja postala važan subjekt uspostavljanja HACCP sistema u proizvodnji fitopreparata (Hazard Analysis and Critical Control Point – Analiza opasnosti i kritične kontrolne tačke) (Kneifel *et al.*, 2002).

Povećana potražnja za preparatima na bazi lekovitog bilja u poslednje vreme uzrokovala je i zainteresovanost javnosti za ispravnost, odnosno neškodljivost, efikasnost i pravilnu upotrebu.

Kako je dostupnost lekovitog bilja iz prirodnih resursa nedovoljna za potrebe farmaceutske industrije, sve veća pažnja poklanja se gajenju lekovitog bilja. Komercijalno gajenje dramatično je povećalo problem oboljenja lekovitog bilja zbog

uslova gajenja u monokulturama. Zbog toga je neophodno sveobuhvatno izučiti svako oboljenje i pronaći način njenog kontrolisanja (Janardhanan, 2002).

Iako je Svetska zdravstvena organizacija (WHO-World Health Organization) razvila direktive za kontrolu kvaliteta biljnih droga, koje bi trebalo da obezbede detaljne opise tehnika i mera neophodnih za odgovarajuće tj. adekvatno gajenje i sakupljanje lekovitog bilja, i dalje postoji jaz između ovih direktiva i njihove implementacije na plantažama (WHO, 2005). Često se radi bez primene mera kontrole kvaliteta, što sve rezultuje u lošem kvalitetu bilja u smislu prisutva različitih kontaminanata, mikroorganizama, pesticida, hemijskih toksina i teških metala.

1.1. Kontaminacija lekovitog bilja odnosno biljne droge

Kontaminacija sirove biljne droge mikroorganizmima je target problem u distribuciji biljnih preparata. Problem predstavlja kontaminacija biljne droge bilo patogenim bakterijama, bilo gljivama (kvascima i plesnima) i njihovim mikotoksinima. Konzumiranje ovakvih fitopreparata može štetno uticati na ljudsko zdravlje, što zavisi od obima kontaminacije tj. tipa i brojnosti mikroorganizma, vrste fitopreparata, načina primene i otpornosti pacijenta na infekcije. Pokazano je da je više kontaminiran sirov biljni materijal od ekstrakata i tinktura zbog prisustva alkohola u njima (Stević, 2009).

Fitopatogene gljive, gljive prouzorkovači bolesti biljaka, veoma su raznovrsne i uzrokuju oboljenja na različitim delovima biljaka kao što su koren, stablo, listovi, cvetovi i plodovi. Pokazano je da su više zaraženi list i nadzemni delovi biljaka (posebno mladih biljaka, jer su tada puni vode), koren i cvet, a manje plod, semena i kora. Stepenn kontaminacije takođe zavisi i od aktivnosti vode u biljnoj sirovini, dužine stajanja pre prerade, oblika prerade, načina čuvanja i dr. (Stević *et al.*, 2004; Bugno *et al.*, 2006).

Zemlja i vazduh su glavni izvori kontaminacije biljaka. Gljive su svuda prisutne u prirodi i njihove se spore mogu naći u atmosferi čak i na velikim visinama nošene i raznošene putem vetra, insekata i drugih životinja (Kungulovski *et al.*, 2011). Pod određenim, pogodnim uslovima temperature i vlažnosti, mogu rasti na žitaricama, voću, začinskom i lekovitom bilju (Škrinjar *et al.*, 2011).

Pored kontaminacije na samom izvoru tj. u polju, nestručna žetva, prikupljanje, transport, rukovanje, skladištenje, proizvodnja i distribucija, kao i prodaja pod nehigijenskim uslovima su procesi tokom kojih biljna droga može biti sekundarno kontaminirana različitim mikroorganizmima, posebno gljivama (Moorthy *et al.*, 2010). Kako se gajenjem lekovitog bilja često bavi i stručno neupućeni ljudi, malo se vodi računa o rukovanju tokom branja i transporta tako da su moguća razna oštećenja. Transportuje se često u neadekvatnim transporterima, u polietilenskim ili jutenim džakovima, baca se na zemlju, a skladišti u otvorenim i prljavim kontejnerima, što sve doprinosi kontaminaciji biljne droge (Khan *et al.*, 2006). Biljke se sakupljaju jednostavnim metodama i najčešće su izložene kontaminaciji pre sušenja koje bi sprečilo rast mikroorganizama. Tokom sušenja biljaka znatan deo populacije mikroorganizama biva uništen, mada izvestan deo ostaje, kao i produkti njihovog metabolizma.

Kvalitet droge takođe zavisi i od načina čuvanja tj. skladištenja, pošto kontaminaciji doprinosi i prašina u vlažnim skladištima bogata sporama patogenih gljiva. Mnogi uzgajivači kao i proizvođači biljnih preparata su svesni važnosti higijenskog skladištenja lekovitog bilja, ali zbog slabe kontrole sprovođenja zakonske regulative ne sprovode ih u praksi. Postžetvena kontaminacija gljivama je veoma česta na uskladištenoj biljnoj drogi, a kao posledica dolazi do promene boje, pogoršanja kvaliteta i terapijskog potencijala (Essono *et al.*, 2007). Prisustvo širokog spektra gljiva na uskladištenoj drogi pokazatelj je da do kontaminacije dolazi još za vreme žetve kao i post-žetvenog procesovanja, sušenja, skladištenja i transporta. Spore *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Alternaria alternata* i *Rhizopus* sp. su uobičajeni zagađivači vazduha prisutni u sušarama i prostorijama za pakovanje (Gautam and Bhadauria, 2009). Prisustvo u vazduhu u manjem broju ne mora da znači da će obavezno kontaminirati biljni materijal. Ali, sa porastom vlage u prostorijama pa i u biljnom materijalu, može doći do kontaminacije i proliferacije gljiva, pa i do sinteze mikotoksina.

Zabeleženi su slučajevi da je procenat kontaminacije gljivama veći kod droge upakovane u ambalažu nego kod neupakovane. To može biti posledica povećane vlažnosti u samom pakovanju kao i neodgovarajuće metode tj. načina pakovanja, čuvanja i skladištenja pakovanja (Abou-Arab *et al.*, 1999).

1.1.1. Kontaminacija fitopatogenim gljivama

Prema Aziz *et al.*, (1998) i Jay *et al.*, (2005), gljive se prema mestu gde inficiraju biljke dele na dve ekološke kategorije: gljive polja i skladišne gljive. Vrste roda *Fusarium* su dominantni predstavnici gljiva polja kojima pogoduje veća vlažnost i hladnije vreme. Tu pripadaju i vrste roda *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Cladosporium* i dr. Razvoj skladišnih gljiva najviše podstiču visoka temperatura i vlažnost u skladišnim prostorijama kao i produženo vreme čuvanja droga. Vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* su tipični predstavnici skladišnih gljiva, mada u ovu kategoriju, prema pomenutim autorima, spadaju i vrste rodova *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Mucor* i *Absidia*. Treba naglasiti da ova podela nije striktna. Tako, manja količina spora tzv. skladišnih gljiva može biti doneta sa polja ili mogu biti prisutne na priboru za žetvu, rukovanje i obradu.

Ispitivanja Hitokoto *et al.*, (1978) ukazala su da na biljnoj drogi dominiraju gljive rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, među kojima su i vrste potencijalni producenti mikotoksina, ali su prisutne i vrste rodova *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus* i *Cladosporium*. Kasnija, brojna istraživanja su potvrdila prisustvo različitih populacija gljiva na biljnim drogama i začинима sa dominacijom vrsta rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* (Rizzo *et al.*, 2004; Bugno *et al.*, 2006, Gautam and Bhadauria 2009).

Ispitivanja lekovitog i začinskog bilja su pokazala da je najveći nivo kontaminacije u uzorcima kamilice i nane i to pretežno vrstama roda *Aspergillus* i *Fusarium* (Canafoglia *et al.*, 2007; Tournas and Katsoudas, 2008; Stević *et al.*, 2012). Od začinskih biljaka najveći afinitet za kontaminaciju gljivama utvrđen je za đumbir, piskavicu, morač, biber, kim i anis (Abou Donia, 2008; Moorthy *et al.*, 2010; Kungulovski *et al.*, 2011). Interesantan je podatak da su i timijan i žalfija, biljke bogate etarskim uljima sa izraženim antimikrobnim potencijalom, u istraživanjima Grigoryan *et al.*, (2011), takođe bile kontaminirane vrstama istih rodova. Ono što zabrinjava je podatak ovih istraživanja da su, potencijalni producenti mikotoksina, vrste roda *Aspergillus*, najčešće u uzorcima gotovo svih ispitivanih biljnih droga.

Mikrobiološka kontrola čajeva u prodavnicama, kako u rimfuzu, tako i upakovanih, ukazala je da je većina bila kontaminirana gljivama, ali da je veći broj vrsta bio izolovan iz upakovanih čajeva nego iz neupakovanih (Rezačova and Kubatova,

2005; Škrinjar *et al.*, 2011). To je ove autore navelo na zaključak da gljive kolonizuju biljne droge tokom procesa obrade. Ova hipoteza potvrđena je ne samo vrstama gljiva koje su identifikovane (mahom saprobne vrste koje preferiraju osušene biljke), već i postojanjem razlike u sastavu izolovanih gljiva iz zemlje ispod samih lekovitih biljaka i žive neobrane lekovite biljke sa jedne strane i osušene biljne droge sa druge.

Prisustvo većeg stepena kontaminacije različitih biljnih droga potencijalno toksigenim, skladišnim, gljivama ukazuje da je neophodno preduzeti mere za unapređenja uslova tokom postžetvenog skladištenja, kao i da je potrebno učiniti sve na prevenciji kontaminacije biljaka tokom žetve i obrade.

1.1.2. Kontaminacija biljne droge mikotoksinima

Prisustvo gljiva na lekovitom bilju osim što umanjuje njihovu mogućnost upotrebe i kvalitet, pod određenim uslovima, može takođe dovesti i do produkcije toksičnih metabolita, mikotoksina. Mikotoksini su prirodni sekundarni metaboliti gljiva koji mogu prouzrokovati toksikološke reakcije, tzv. mikotoksikoze, kada su i u niskim koncentracijama prisutni u prirodnom lancu ishrane životinja i ljudi. Veliki broj gljiva izolovanih sa lekovitog bilja imaju sposobnost produkcije mikotoksina. Iako prisustvo gljiva ne mora da bude uvek praćeno produkcijom mikotoksina, mnogi literaturni podaci ukazuju na njihovo prisustvo u biljnim drogama, čajevima i drugim biljnim preparatima (Reddy *et al.*, 2008; Trucksess and Scott, 2008). Smatra se da najpoznatije i najvažnije mikotoksine sintetišu gljive iz rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* (Rizzo *et al.*, 2004; Bugno *et al.*, 2006; Grigoryan *et al.*, 2011).

Pojava i koncentracija mikotoksina uslovljeni su osnovnim činiocima spoljašnje sredine kao što su velika vlažnost u polju i skladištima, visoka temperatura, kao i mehanička oštećenja biljaka tokom berbe i insektima. Brojni fizički, agrotehnički, kao i klimatski činioci utiču na geografsko i sezonsko variranje pojave gljiva producenata mikotoksina, a otuda i na vrstu i nivo biosinteze mikotoksina (Lević and Stojkov, 2002). Sinteza mikotoksina zavisi i od svojstva supstrata na kojima gljiva producent raste (sastav, aktivnost vode, stepen kontaminacije).

Mikotoksini se u prirodi pojavljuju pojedinačno ili u kombinacijama dva, tri ili više njih zajedno s aditivnim ili sinergističkim dejstvom (Alli *et al.*, 1998). Jedna vrsta

gljive može da sintetiše različite toksine, a različite vrste mogu da stvaraju iste mikotoksine. Termostabilni su i ne mogu se uništiti kuvanjem; imaju kumulativni efekat i teško se eliminišu iz organizma (Hashem and Alamri, 2010).

Prema hemijskoj strukturi mikotoksini se dele na: aflatoksine, ohratoksine, fumonozine, trihotecene i zearalenone (Rischard, 2007).

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 (Dubey *et al.*, 2008). U novijim istraživanjima dovode se u direktnu vezu sa primarnim karcinomom jetre i jednjaka (Reddy *et al.*, 2008). Primarna mesta za apsorpciju mikotoksina su probavni trakt, pluća (udisanje spora) i koža (direktan kontakt s kontaminiranim materijalom ili čistim mikotoksinima), dok su jetra i bubrezi glavni organi za metabolizam i izlučivanje mikotoksina (Reddy *et al.*, 2008).

Utvrđeno je da pojedine vrste roda *Aspergillus* produkuju aflatoksine, ohratoksin proizvode vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, dok *Fusarium* vrste produkuju fumonozine, toksin zearalenon i strukturno blisku grupu trihotecene.

Aflatoksine primarno proizvodi *A. flavus* (aflatoksin B1, B2, G1 i G2) i neki sojevi *A. parasiticus*, *A. nomius* i *A. niger*. Prema literaturnim podacima *A. flavus* je najzastupljenija gljiva na biljnim drogama što predstavlja opasnost od moguće kontaminacije aflatoksinima. Analizom čajeva iz prodavnica u Velikoj Britaniji, aflatoksin B1 je detektovan u uzorcima nane, kamilice, kima, lipe, pelena, timijana i morača, najviše u moraču i kamilici (Gautam and Bhadauria, 2009; Grigoryan *et al.*, 2011). Međunarodna agencija za istraživanje kancera (IARC, 1993) je *aflatoksin B1* klasifikovala u Grupu 1 humanih karcinogena i proglasila ga najjačim poznatim karcinogenom prirodnog porekla. Duže konzumiranje kod dece može uzrokovati zakržljalost u rastu, a kod odraslih ljudi povećati rizik nastajanja kancera jetre (Abbas, 2005). Metaboliti ovog mikotoksina mogu se umetnuti u DNK i alkilirati baze preko svog epoksidnog dela (Oyero and Oyefolu, 2009). Smatra se da to izaziva mutacije na p53 genu, važnom u prevenciji progresije ćelijskog ciklusa kada postoje mutacije na DNK, ili u signalizaciji apoptoze. Prema Aguilar *et al.*, (1993) pojedina mesta tj. bazni parovi u p53 genu su osetljiviji na mutacije indukovane aflatoksinima (npr. 249 kodon). Eksperimentalno je dokazano, na različitim model sistemima, da AF-B1 mikotoksin

inhibira sintezu DNK, aktivnost RNK polimeraze, sintezu mRNK i sintezu proteina (Wang and Groopman, 1999).

Vrste roda *Aspergillus* mogu sintetisati i druge mikotoksine kao što su patulin, sterigmatocistin, citrinin, citreoviridina i dr. u zavisnosti od vrste (Kamei and Watanabe, 2005; Bugno *et al.*, 2006).

Ochratoxin A produkt je metabolizma pojedinih vrsta rodova *Aspergillus* u toplijim krajevima sveta i *Penicillium* u hladnijim krajevima. Njegova hemijska stabilnost na visokim temperaturama i tokom prerade droge čini ga jednim od najprostranjenijih mikotoksina. Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje kancera (IARC, 1993) ohratoksin A spada u Grupu 2 kancerogena. Smatra se da je potencijalni nefrotoksin kod ljudi, a embriotoksičnost i teratogenost je dokazana kod mnogih eksperimentalnih životinja (Wyatt, 2005).

Predstavnici roda *Penicillium* su uobičajeni kontaminanti različitih supstrata i potencijalni su producenti i drugih mikotoksina: patulin, citrinin, citreoviridin, gliotoksin, rubratoksin, sterigmatocistin i dr. (Moss, 2002).

Treću grupu najčešće izolovanih mikotoksina sa biljnih droga čine *fumonozini* (A, B i C) koji su najpotentniji mikotoksini vrsta roda *Fusarium*. Stabilni su na temperaturama koje se primenjuju u termičkoj obradi biljne droge i hrane (Marasas, 2001). Proučavanja uzroka visokog stepena pojavljivanja karcinoma jednjaka u centralnoj Kini i južnoj Africi, ukazala su na prisustvo neuobičajeno visokih koncentracija fumonizina u kukuruzu, ali i pšenici, koji se koriste u ishrani ljudi u tim regionima. Fuzarin C je najznačajniji u grupi fumonozina jer se smatra da ovaj mikotoksin u većoj koncentraciji ispoljava mutagena svojstva i da prouzrokuje karcinom jednjaka ljudi (Bryden *et al.*, 2001). Fumonozini potencijalni karcinogeni efekat ostvaruju kroz nekoliko mehanizama: prekidom biosinteze sfingolipida, poremećajima u ćelijskim lipidima, kao i indukcijom proliferacije ćelija, oksidativnog stresa, peroksidacijom lipida i proliferacijom peroksizoma (Yin *et al.*, 1998).

Zearalenoni su metaboliti nekih vrsta roda *Fusarium* sa estrogenim dejstvom. Potencijalno su i kancerogeni (karcinom prostate muškaraca i cervikalni kancer kod žena) jer imaju mogućnost vezivanja za lanac DNK i RNK menjajući sintezu proteina (Abid-Esefi *et al.*, 2004).

Predstavnici rodova *Trichoderma*, *Trichotecium*, *Myrotechium*, kao i neke vrste roda *Fusarium* mogu proizvoditi trihotecene koji na ćelijskom nivou inhibiraju sintezu proteina u eukariotskim ćelijskim linijama, rezultujući u inhibiciji DNK sinteze (Konishi *et al.*, 2003).

Pored pomenutih, predstavnici nekih rodova gljiva mogu sintetisati i druge vrste mikotoksina. Tako na primer vrste roda *Alternaria* mogu proizvoditi alternariol (AOH) i alternariol monometil etar (AME) za koje postoje podaci o mutagenom potencijalu (Ostry, 2008), kao i da mogu uzrokovati karcinom debelog creva ljudi. Takođe, imaju udela u etiologiji kancera jednjaka u jednoj oblasti u Kini što je povezano sa ishranom bogatom zrnastim usevima koji su u visokom procentu bili kontaminirani sa *A. alternata* kao i njenim toksinima (Zhang *et al.*, 2007).

Kako je potpuna eliminacija mikotoksina nemoguća, potrebno je obezbediti njihovo minimalno prisustvo u proizvodima, koje neće ugroziti zdravlje ljudi. Postoji nekoliko procedura za postžetvenu kontrolu i dekontaminaciju voća, povrća, hrane uopšte, ali gotovo nijedna adekvatna za biljne droge. Jedan od važnih uzroka je osetljiva priroda biljne droge. Kako su aflatoksini otporni čak i na temperaturu od 260°C, ni priprema čajeva na temperaturi ključanja vode ne utiče značajno na njihovu redukciju (Hashem and Alamri, 2010).

Prevenција kontaminacije i rasta patogenih gljiva na lekovitom bilju je važan korak u prevenciji kontaminacije mikotoksinima. Inhibicija rasta gljiva može se postići fizičkim, hemijskim i biološkim tretmanom. Od fizičkih tretmana značajno je, brzo i dovoljno sušenje biljaka, održavanje niske temperature i vlažnosti u kontejnerima i skladišnim prostorima. Tretman biljnih droga hemijskim sredstvima (npr. sirćetna kiselina, amonijum gas i soli, vodonik peroksid, natrijum bikarbonat koji se koriste u dekontaminaciji voća i povrća) nije dozvoljen zbog osetljive prirode droge, nemogućnosti njihove eliminacije sa biljnog materijala i štetnog uticaja na ljudsko zdravlje. Usled toga, sve veća pažnja poklanja se preparatima (fungicidima) prirodnog porekla za prevenciju kontaminacije ili dekontaminaciju (Dubey *et al.*, 2008).

1.2. Biološka kontrola patogenih gljiva

U zaštiti lekovitog bilja, useva uopšte, dominiraju hemijske mere borbe, odnosno korišćenje hemijskih sredstava u samom polju. Upotreba sintetičkih pesticida je dovedena u pitanje zbog potencijalne visoke i akutne toksičnosti, potencijalnog karcinogenog i teratogenog efekta na ciljne organizme uz postojanje mogućnosti da štetno utiču i na korisne mikroorganizme (Grahovac *et al.*, 2009). Pored toga, zagađivači su životne sredine, zemljišta i vode, imaju dug period raspadanja i može doći do njihove akumulacije u lancu ishrane, a međuprodukti degradacije često su perzistentniji od polaznog jedinjenja (Satish *et al.*, 2009).

Saznanja o riziku pri primeni nekih insekticida i fungicida po rukovaoca, potrošača i životnu sredinu, kao i brza pojava rezistentnih jedinki u populaciji nekih štetnih vrsta, doprinela su uvođenju regulativa za zabranu ili kontrolisano korišćenje. Takođe, usled učestalog neuspeha pri rešavanju nekih oboljenja podzemnih i nadzemnih organa biljaka hemijskim fungicidima dovela su do povećanja interesa za uvođenje alternativnih mera u zaštitu lekovitog bilja, gde zasluženno mesto nalaze biološki preparati koji se smatraju bezbednim, tzv. biopesticidi (Šovljanski *et al.*, 2004; Brar *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2012). Upotreba komponenti prirodnog porekla kao biopesticida, tzv. *biološka kontrola* podrazumeva primenu biljnih ekstrakata i etarskih ulja, kao i korisnih mikroorganizama ili produkata njihovog metabolizma u zaštiti bilja (Pal and Gardener, 2006).

Biofungicidi, posebna grupa biopesticida, koja se koristi za suzbijanje gljiva, mogu biti na bazi korisnih gljiva i bakterija, koji kontrolišu razvoj biljnih patogena, kao i na bazi etarskih ulja ili biljnih ekstrakata. Sposobnost biofungicida da zaštiti domaćina od patogena i održi se na različitim biljkama u različitim uslovima, osnov je njihovog komercijalnog uspeha.

1.2.1. Etarska ulja u biološkoj kontroli fitopatogenih gljiva

Biljke su bogat izvor metabolita za koje je dokazano da poseduju fungitoksičan efekat na rast micelija raznih fitopatogenih gljiva kao i na germinaciju spora. Posebno raste interesovanje za etarskim uljima kao mogućoj zameni konvencionalnih sintetičkih

fungicida u cilju zaštite kultivisanih biljaka od fitopatogenih gljiva, zbog njihove opšte prihvaćenosti od potrošača, relativne bezbednosti za upotrebu i ekološke prihvatljivosti (Abdel-Kader, 2011). Takođe, komponente etarskih ulja su zbog svog prirodnog porekla razgradive i većina od njih nema rezidua u prirodi (Klokočar-Šmit *et al.*, 2006).

Etarska ulja, sekundarni metaboliti biljaka, definišu se kao kompleksne smeše aromatičnih isparljivih komponenti. Lipofilna su i generalno se ne rastvaraju u vodi. Terpeni, ugljovodonici sa različitim brojem izoprenskih jedinica (izo-C₅), su osnovni sastojci etarskih ulja koje čine monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni i triterpeni (Chamorro *et al.*, 2012).

U monoterpeni se ubrajaju monoterpenski ugljovodonici (npr. limonen, α -pinen, β -pinen, p-cimen, γ -terpinen), alkoholi (npr. linalol, geraniol, citronelol, terpinen-4-ol, borneol), epoksidi (1,8-cineol), fenoli (npr. karvakrol, timol), aldehidi (geranial, neral, citronelal), ketoni (kamfor, tujon, fenhon, menton, karvon) i estri (linalil i bornil acetat). Seskviterpeni mogu biti: ugljovodonici (hamazulen, β -farnesen, β -kariofilen), alkoholi (bisabolol), aldehidi (npr. valerenal), ketoni (npr. valeranon, akoron). Diterpeni mogu biti biciklični, triciklični i tetraciklični, dok su triterpeni tetraciklični i pentaciklični.

Od ostalih, neterpenskih, komponenata važni su još različiti fenilpropanski derivati (npr. eugenol, trans-anetol, metilhavikol, cimetaldehid, miristicin), kao i isparljive supstance koje sadrže azot ili sumporna jedinjenja (Jančić, 1995; Chamorro *et al.*, 2012).

1.2.1.1. Antifungalna aktivnost etarskih ulja i njihovih komponenata

Mehanizam antifungalnog delovanja etarskih ulja je različit i zavisi od vrste ulja i njegove koncentracije. Smatra se da inhibitorna aktivnost etarskih ulja i njihovih komponenata na mikroorganizme umnogome zavisi od njihovog hidrofilog ili lipofilnog karaktera, ali i od vrste mikroorganizma, posebno od strukture ćelijskog zida i plazma membrane (Kalemba and Kunicka, 2003).

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 (Rasooli and Abyaneh, 2004; Carmo *et al.*, 2008a).

Na nivou ćelije gljiva etarska ulja najčešće deluju ili inhibicijom sinteze ćelijskog zida ili na nivou citoplazmatične membrane jer im lipofilni karakter omogućava nesmetani prolaz kroz membranu ili inkorporaciju u nju (Sikkema *et al.*, 1995). Takođe, mogu reagovati sa proteinima ćelijske membrane (Stanković *et al.*, 2011). Etarska ulja mogu da remete aktivnost membrane mitohondrija, odnosno aktivnost enzima u respiratornom lancu tako što ometaju transport protona i elektrona kroz membranu i potom prekidaju fosforilaciju ADP-a (Carmo *et al.*, 2008b). Granulacija citoplazme, ruptura citoplazmatične membrane, hiperaciditet citoplazme su još neki od mehanizma vezanih za antifungalnu aktivnost etarskih ulja (Carmo *et al.*, 2008b). 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 (Kalemba and Kunicka, 2003). Jedan od mehanizama antifungalne aktivnosti etarskih ulja (npr. bosiljka) je i povećanje aktivnosti kataboličkih enzima diamin oksidaze (DAO) i poliamin oksidaze (PAO). Povećanjem aktivnosti ovih enzima dolazi do generisanja vodonik peroksida i naknadno do aktiviranja programirane ćelijske smrti (Griffin *et al.*, 1999; Oxenham and Svoboda, 2005).

Inhibitorna aktivnost etarskih ulja zavisi od složenih interakcija između komponenti koje ulaze u njihov sastav. Krajnji rezultat može biti aditivan, sinergistički ili antagonistički (Bakkali *et al.*, 2008). Utvrđeno je da pojedinačno fenolne komponente etarskih ulja poseduju najjači antifungalni potencijal, a za njima po aktivnosti slede alkoholi, aldehidi, ketoni, dok najmanju aktivnost pokazuju monoterpenski ugljovodonići (Carmo *et al.*, 2008).

Fenolne komponente ostvaruju antifungalnu aktivnost pravljjenjem oštećenja na ćelijskim zidovima i membranama, povećavaju osetljivost citoplazmatične membrane što dalje vodi ka povećanju njene propustljivosti, a i izazivaju precipitaciju ćelijskih proteina (Isman and Machial, 2006; Carmo *et al.*, 2008). Utvrđeno je da inhibiraju i produkciju mikotoksina (Koul *et al.*, 2008). Pošto su fenolne komponente i potencijalni antioksidansi, pretpostavka je da inhibiraju produkciju mikotoksina delujući na odbrambeni sistem oksidativnog stresa u mitohondrijama ćelija gljiva. Kako su

mitohondrije glavne za obezbeđivanje acetil-CoA, glavnog prekursora u sintezi aflatoksina, prekid respiratornog lanca u mitohondrijama se može smatrati mogućim mehanizmom inhibicije sinteze aflatoksina fenolnim komponentama (Carmo *et al.*, 2008; Lodama, 2010).

Od ostalih terpenkih komponenata, smatra se da monoterpeni alkoholi antifungalnu aktivnost ostvaruju interakcijom sa ćelijskom membranom tj. indukcijom promena u propustljivosti membrane, kao i inhibicijom respiracije (Uribe *et al.*, 1985; Imelouane *et al.*, 2009). Sa druge strane, oksidovani monoterpeni, kao tipične lipofilne komponente, prolaze kroz citoplazmatičnu membranu gljivičnih ćelija, remete njenu strukturu kao i transport jona, a ometaju i procese disanja na membranama mitohondrija (Deba *et al.*, 2008).

1.2.1.2. Različiti oblici primene etarskih ulja

Osim brojnih radova o antifungalnoj aktivnosti u *in vitro* uslovima, u novije vreme sve više je potvrda o efikasnosti etarskih ulja u prevenciji postžetvenih patogena (*in situ*) i efikasnosti u praktičnoj primeni (Isman and Machial, 2006). Međutim, veoma malo je studija o efikasnosti etarskih ulja u zaštiti lekovitog bilja u *in vivo* uslovima. 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. U tom smislu veliku efikasnost su ispoljila etarska ulja timijana, čajnog drveta, koprive, nane, cimeta, žalfije i eukaliptusa (Tripathi and Dubey, 2004; Abbo *et al.*, 2009; Surviliené *et al.*, 2009; Nabigol and Morshedi, 2011; Hadizadeh *et al.*, 2009; Abdel-Kader, 2011).

Dosadašnja istraživanja su ukazala i na druge, potencijalne oblike primene etarskih ulja u biološkoj kontroli gljiva sa voća i povrća: u procesu fumigacije voća, inkorporaciji u pakovanja sa modifikovanom atmosferom, u tretmanu zemlje u kojoj će biljka rasti, prskanjem listova biljaka u polju i dr.

Fumigacija, proces dezinfekcije gasom (fumigant), je jedan oblik moguće primene etarskih ulja. Fumigacija voća etarskim uljima i njihovim komponentama, ispoljila je veliki potencijal u kontroli fitopatogenih gljiva. U tom smislu veliku

efikasnost pokazalo je etarsko ulje timijana, kao i timol, njegova dominantna komponenta (Liu *et al.*, 2002). Malobrojnim istraživanjima pokazano je da se etarska ulja mogu koristiti i u fumigaciji biljaka tj. biljne sirovine u cilju biološke kontrole skladištenih gljiva (Lee *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2008).

Primena etarskih ulja je atraktivan metod u kontroli postžetvenih oboljenja u zatvorenim sistemima. Naime, zbog ograničene mogućnosti sanacije kontaminacije biljne droge tečnim agensima s jedne strane, i zadržavanja bioaktivnosti etarskih ulja u isparljivoj fazi s druge, fumigacija se nameće kao dobar metod (Tzortzakis, 2007). Potencijalna primena etarskih ulja u vidu isparljivih fungicida u suzbijanju skladišnih patogena zahteva detaljna ispitivanja njihove biološke aktivnosti i disperzije u biljnim tkivima, kao i razvoja formulacije koja će inhibirati rast patogena bez fitotoksičnih efekata (Shukla *et al.*, 2000). Kao fumiganti, etarska ulja se mogu upotrebiti u vidu granularnih formulacija ili u vidu spreja. U Izraelu je patentirana tehnologija za postepeno, odnosno odloženo oslobađanje etarskih ulja i njihovih komponenata iz kapsula što produžava vreme njihove moguće primene (Koul *et al.*, 2008).

Inkorporacija etarskih ulja, kao i individualnih komponenata, *u pakovanja* sa *modifikovanom atmosferom* je još jedan od načina njihove moguće primene kao agensa biokontrole (Nakatsu *et al.*, 2000). U tom smislu pokazano je da je za dugoročno čuvanje, u cilju prevencije i redukcije gljivične infekcije, najbolja polietilenska ambalaža, dok u pamučnoj i jutenoj dolazi do razvoja skladišnih gljiva (Shukla *et al.*, 2000).

In vivo istraživanja ukazuju i na efikasnost primene etarskih ulja u samom polju i *to tretiranjem zemlje* u kojoj će biljka rasti rastvorom etarskog ulja (Nguefack *et al.*, 2008), ili *prskanjem listova biljaka*. Prskanjem listova ukrasnog bilja, ili krompira, tokom sezone, etarskim uljima karanfilića, cimeta, majorana i morača u polju primećeno je znatno smanjenje infekcije fitopatogenim gljivama (El-Mougy, 2009).

U poslednje vreme, utvrđena je efikasnost kombinacije agenasa biološke kontrole sa drugim hemijskim komponentama i fizičkim tretmanima u cilju povećanja njihove aktivnosti u prevenciji i redukciji oboljenja uzrokovanih fitopatogenim gljivama. Tako je potvrđeno povećanje efikasnosti etarskih ulja u *kombinaciji sa hemijskim sredstvima*, kao na primer solima, kalijum sorbatom i natrijum benzoatom, ili *fizičkim merama* (npr. blagim povećanjem temperature) (Karatzas *et al.*, 2000; El-

Mougy *et al.*, 2009). Takođe su se pokazala kao efikasni agensi biokontrole u kombinaciji sa mikroorganizmima antagonistima, bilo da su u pitanju bakterije, kvasci ili gljive (Abdel-Kader *et al.*, 2011).

Za komercijalnu primenu etarskih ulja neophodno je obezbediti dovoljnu količinu standardizovanog etarskog ulja, kao i odobren patent. Potrebne su veće količine standardizovanog etarskog ulja; sastav ulja može varirati zavisno od geografskih, genetičkih, klimatskih, godišnjih ili sezonskih faktora, tako da je teže obezbediti konzistentnost. U formulaciji ovih proizvoda problem može predstavljati i održivost aktivnosti jer je pokazano da kombinacija nekih ulja sa emulgatorima može da umani njihov antifungalni potencijal. Neophodni su takođe odgovarajući organoleptički testovi pre formulacije preparata, jer tretman ne sme da utiče na parametre kvaliteta tretirane sirovine.

U pojedinim zemljama već se koriste neka etarska ulja, kao na primer ruzmarina, karanfilića i timijana kao insekticidi, fungicidi i herbicidi u poljoprivredne i industrijske svrhe i za široku potrošnju na tržištu. Tako se komercijalni proizvod SporanTM (EcoSMART Technologies), baziran na etarskom ulju ruzmarina prodaje kao fungicid, a MatranTM (EcoSMART Technologies) sa etarskim uljem karanfilića i eugenolom kao dominantnim komponentama, za kontrolu korova i patogenih gljiva (Koul *et al.*, 2008).

1.2.2. Mikroorganizmi kao antagonisti

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 (Droby, 2006; Sharma *et al.*, 2009). Eksperimentalno je dokazano da filogenetski različiti mikroorganizmi deluju kao prirodni antagonisti raznih biljnih patogena. Među bakterijama to su predstavnici rodova *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Streptomyces*, a od gljiva rodovi *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium* i *Trichoderma* (Gravel *et al.*, 2005; Grahovac *et al.*, 2009; Alwathnani and Perveen, 2012; Stanković *et al.*, 2012).

Od bakterija agenasa biokontrole najviše su proučavane vrste rodova *Pseudomonas* i *Bacillus*. Vrste roda *Bacillus* su vrlo atraktivni mikroorganizmi za praktičnu primenu jer produkuju stabilne endospore koje im obezbeđuju otpornost na

visoku temperaturu, isušivanje, UV zračenje i organske rastvarače (Arrebola *et al.*, 2010).

Uspeh mikrobioloških antagonista u laboratorijskim uslovima i pilot testovi sprovedeni u *in vivo* uslovima povećali su interes raznih agrohemijskih kompanija za razvoj i komercijalizaciju bioproizvoda koji sadrže mikroorganizme antagoniste u kontroli postžetvenih oboljenja voća i povrća. 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 (Marone, 2002; Tomlin, 2006; Grahovac *et al.*, 2009).

Produkti metabolizma nekih mikroorganizama su kristali i antibiotici, koji štite biljke delujući antagonistički na prouzrokovaoče bolesti, fitopatogene mikroorganizme, štetne insekte, nematode i korove, pri čemu su bezopasni za ljude i ekološki su bezbedni. Takođe, korisni mikroorganizmi produkuju i vitamine, enzime i biljne hormone koji mogu delovati na imunski sistem biljaka, povećavajući njihovu otpornost (Pal and Gardener, 2006).

Do sada formulisani biofungicidi, uglavnom se primenjuju u suzbijanju fitopatogenih gljiva sa povrtarskih biljaka u polju, ili sa uskladištenog voća i povrća. Međutim, kada je u pitanju zaštita lekovitog bilja tj. biljnih droga, gotovo da nema radova na ovu temu. Ispitivanja ovog tipa na lekovitom bilju su jako limitirana osetljivom prirodom biljnog tkiva kao i ograničenim setom metoda koje se mogu primeniti: visoka temperatura može uništiti aktivne principe u biljnom materijalu, a potapanje u vodenom rastvoru različitih agenasa je nemoguće. Kao i u slučaju etarskih ulja, prskanje biljnog materijala mikroorganizmima kao agensima biokontrole mora biti strogo kontrolisano i obavezno je organoleptičko ispitivanje nakon tretmana.

1.2.2.1. Mehanizmi antagonističke aktivnosti biokontrolnih agenasa

U formulaciji bioproizvoda veoma je važno da se što bolje upozna mehanizam antagonističke aktivnosti u cilju selekcije što boljeg soja antagoniste sa što efikasnijim delovanjem. Mikroorganizmi, biokontrolni agensi, ostvaruju svoju antagonističku aktivnost na sprečavanju razvoja ili smanjenju populacije fitopatogenih gljiva kroz

nekoliko mehanizama: 1) kompeticija za prostor i hranljive sastojke, 2) produkcija antibiotika i litičkih enzima, 3) indukcija rezistentnosti kod biljaka i 4) inhibicija enzima patogenoze (Gardener and Fravel, 2002). Jedan agens biokotrole može ispoljiti svoju aktivnost kroz različite mehanizme. Smatra se da se najbolji rezultati u praktičnoj primeni biokotrole postižu upotrebom dva ili više mehanizma mikrobnog antagoniste (Chiou and Wu, 2001).

1) Kompeticija za prostor i hranljive sastojke

Mikroorganizmi koji nastanjuju korenov sistem biljaka su u kompeticiji za odgovarajuće mesto ali i za resurse kao što su kiseonik ili izvor azota. Biokontrola može uključiti i supresiju patogena kompeticijom za hranljive sastojke sa antagonistom, posebno za ugljenik, ali i za elemente u tragovima kao što su gvožđe, cink, bakar, magnezijum i dr. (Handelsman and Stabb, 1996). Dobar primer je kompeticija za gvožđe. Gvožđe je esencijalni elemenat za rast svih organizama i oskudnost njegove biorasplošive forme u zemljištu rezultuje u žestokoj konkurenciji među mikroorganizmima. Zastupljeno je svuda u zemlji ali u nerastvornom obliku u vidu feri hidroksida u kojoj je nedostupan za većinu organizama. Specifični mikroorganizmi, kolonizatori korenovog sistema biljaka, su u mogućnosti da poboljšaju rast biljke i kontrolišu određene zemljišne patogene produkcijom sistema za usvajanje gvožđa tzv. siderofora. Siderofore predstavljaju jedinjenja male molekulske mase koja transportuju trovalentno gvožđe sa velikim afinitetom (Cawoy *et al.*, 2011). Tretmanom zemljišta sojevima koje proizvode siderofore redukuje se nivo patogena tako što siderofore usvajaju gvožđe i čine ga nedostupnim za fitopatogene gljive. Siderofore mogu inhibirati klijanje hlamidospora što dalje vodi u redukciju kolonizacije i infekcije korena biljaka fitopatogenim gljivama (Buchenauer, 2005).

Vezivanje antagonista za hife patogena predstavlja takođe važan faktor neophodan za kompeticiju za hranu. *In vitro* ispitivanja takvih interakcija su otkrila da su zahvaljujući direktnim vezivanjem za hife patogena, bakterije i kvasci antagonisti mnogo brže apsorbirali hranljive sastojke nego target patogeni i na taj način sprečili klijanje spora i rast patogena (Buchenauer, 2005).

2) Proizvodnja antibiotika i litičkih enzima

Rizosferne bakterije mogu proizvoditi antibiotike, enzime i isparljiva jedinjenja koja mogu imati važnu ulogu u kontroli zemljišnih patogena biljaka. Antimikrobna jedinjenja, kao bakterijski agensi biokontrole, su heterogena grupa organskih jedinjenja male molekulske težine (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Za bakterije antagoniste iz roda *Bacillus* je pokazano su u stanju da proizvode širok spektar sekundarnih metabolita sa antimikrobnom aktivnošću što se smatra najpoznatijim mehanizmom njihove antagonističke aktivnosti u redukciji patogena u biljnom tkivu (Ruckert *et al.*, 2011). Ti metaboliti mogu biti: 1) toksini sa antibakterijskom aktivnošću, 2) bakteriolitički enzimi kao što su lizostafin, fosfolipaza A i hemolizini, 3) bakteriofagi i defektni bakteriofagi, 4) nusprodukti primarnog metabolizma kao što su amonijak, organske kiseline i vodonik peroksid, i različiti drugi sekundarni metaboliti koje proizvode bakterije koje imaju dokazanu antibakterijsku aktivnost, 5) antibiotske supstance kao što su gramicidin, valinomicin i bacitracin koji se sintetišu uz učešće multienzimskih kompleksa gde spadaju i lipopeptidi mikosubtilizin, iturin, surfaktin i plipastatin, i 6) bakteriocini ili molekuli koji liče na bakteriocine koji se direktno proizvode kao ribozomalno sintetisani polipeptidi (Kleinkauf and von Dohren, 1990; Venema *et al.*, 1993; Jack *et al.*, 1995; Walsh, 2004).

Antimikrobna jedinjenja lipopeptidne strukture koje proizvode bakterije roda *Bacillus* su pokazala značajnu antibakterijsku i posebno antifungalnu aktivnost (Yu *et al.*, 2002; Siciua *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Lipopeptidi se sintetišu neribozomalno pomoću multienzimskih sistema, tzv., neribozomalnih peptidnih sintetaza (Finking and Marahiel, 2004). Mogu varirati u tipu i sekvencama aminokiselina kao i dužini i granjanju lanca masnih kiselina. Tri su glavne familije ovih antibiotika: surfaktini, iturini i fengicini, pri čemu su surfaktini i iturin A najčešće sintetisani među vrstama roda *Bacillus* (Ongena and Jacques, 2008). Pored ove tri glavne familije, identifikovani su i kurstakini kao bioaktivni lipopeptidi (Ritter and Washington, 2003; Stein, 2005).

Lipopeptidi iz familije *surfaktina* imaju cikličnu strukturu građenu od sedam amino kiselina vezanu za β -hidroksi masnu kiselinu različite dužine ugljovodoničnog lanca. Ovu familiju čine surfaktin i njegovi analozi lihenizin i pumilacidin. Surfaktini

ispoljavaju niz bioloških aktivnosti kao što je antibiotska, antitumorska, hemolitička i anti-HIV, a i inhibiraju stvaranje fibrinskog ugruška (Maget-Dana and Ptak, 1995; Kracht *et al.*, 1999). Smatra se da je biološka aktivnost surfaktina rezultat njihove amfifilne prirode usled koje prodiru u lipidni sloj membrane i remete njen integritet, odnosno indukuju katjonske kanale u lipidnom sloju membrane što dovodi do njene destabilizacije (Maget-Dana *et al.*, 1992). Specifična površinska i membranska aktivnost surfaktina olakšava bakterijama stvaranje biofilma. Smatraju se najsnažnijim poznatim biosurfaktantima koji ispoljavaju aktivnost nalik deterdžentima na biološkoj membrani (Carillo *et al.*, 2003). Biosurfaktanti su prirodna, površinski aktivna jedinjenja u čijoj se strukturi razlikuju dva dela, hidrofilni i hidrofobni. Ovakva struktura im omogućava da emulguju (sjedinjaju) supstance koje se inače ne bi mešale.

Prema ranijim istraživanjima, surfaktini ne poseduju antifungalnu aktivnost. Međutim, otkriće da se surfaktini koprodukuju sa iturinom A u istom soju *B. subtilis* i da ispoljavaju važan sinergistički efekat na biološku aktivnost iturina A (Maget-Dana *et al.*, 1992) izazvalo je ogromno interesovanje za oba lipopetida. Najnovija istraživanja su pokazala da pojedini lipopeptidi iz familije surfaktina, izolovani iz *B. amyloliquefaciens*, ispoljavaju značajnu antifungalnu aktivnost na *F. oxysporum* izolovanu sa korena paradajza (Vitulo *et al.*, 2012).

Fengicini A i B, takođe poznati kao plipastatini, su lipodekapeptidi sa unutrašnjim laktonskim prstenom u peptidnoj polovini i sa lancem β -hidroksi masne kiseline (C14 do C18) koji može biti zasićen ili ne. Zbog svoje amfifilne prirode, deluju kao biosurfaktanti. Fengicini antifungalnu aktivnost ostvaruju kroz inhibiciju klijanja konidija i izduživanja germinativnih tuba, kao i remećenjem strukture zida hifa (Toure *et al.*, 2004). Na ćelijskom nivou, smatra se da fengicini reaguju sa lipidnim slojevima ćelijske membrane i da imaju mogućnost da menjaju njenu strukturu i propustljivost (Ongena and Jacques, 2007).

Familiju lipopeptida tipa *iturina* čine iturini A-E, mikosubtilin i bacilomicin D, F i L. To su ciklični lipopeptidi koji se sastoje od sedam aminokoselinskih ostataka vezanih za β -amino masnu kiselinu u lancu dužine od C14 do C17. Za bacilomicin D je utvrđena antitumoralna, hemolitička i antifungalna aktivnost (Moyne *et al.*, 2001), a za iturin A jaka antifungalna i hemolitička aktivnost (Ongena *et al.*, 2007; Athukorala *et al.*, 2009). Fungitoksična aktivnost iturina povezana je sa inhibicijom germinacije spora.

Na ćelijskom nivou može se reći da je osnovni mehanizam fungitoksičnosti iturina osmotski poremećaj u ćelijama putem formiranja pora za provođenje jona (Etchegaray *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2007). Za razliku od surfaktina ne prave prekide na citoplazmatičnoj membrani (Ongena and Jacques, 2008).

Za lipopeptidne antibiotike je poznato da deluju sinergistički što je utvrđeno za kombinaciju surfaktina i iturina, surfaktina i fengicina, kao i iturina i fengicina (Ongena *et al.*, 2007).

Najnovija istraživanja su pokazala da antifungalna aktivnost *Bacillus* sp., posebno *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* i *B. amyloliquefaciens*, prema fitopatogenim gljivama vrsta roda *Fusarium*, *Aspergillus* i *Bipolaris*, na različitom voću i povrću, može biti povezana sa koprodukcijom tri ili više lipopeptidnih antibiotika (surfaktin, iturin, fengicin, bacilomicin)(Ongena and Jacques, 2008; Velho *et al.*, 2011). Prisustvo operona za iturin i surfaktin potvrđeno je u mnogim prirodnim izolatima *Bacillus* sp. izolovanim iz zemljišta sa različitih lokaliteta Srbije, koji su ispoljili antimikrobnu aktivnost na fitopatogene bakterije (Berić *et al.*, 2012, Stanković *et al.*, 2012). Međutim, determinacija određenih antimikrobnih biosintetskih operona u određenom soju bakterije ne mora uvek da znači da će do sinteze tog antibiotika i doći (Athukorala *et al.*, 2009).

Osim antibiotika, pokazano je da mikroorganizmi antagonisti proizvode litičke enzime kao što su glukonaza, hitinaza i proteinaza što olakšava degradaciju ćelijskog zida patogenih gljiva (Huang *et al.*, 2005).

3) Indukcija imunog odgovora biljke

Neki biokontrolni agensi indukuju promene u biljci povećavajući njenu toleratnost prema patogenu, fenomen poznat kao indukovana otpornost. Bakterije antagonisti mogu da aktiviraju više mehanizama rezistencije na fitopatogene gljive, uključujući akumulaciju antimikrobnih komponenata manje molekulske mase (fitoaleksini) i stimulišu sintezu protektivnih bipolimera (kaloze). Takođe dolazi do ubrzane sinteze odbrambenih litičkih enzima, kao što su hitinaze i β -1,3-glukanaze, peroksidaze i fenilalanin amonijum liaze (Fernando *et al.*, 2007). Pokazano je da fengicini i surfaktini mogu da ostvare interakciju sa biljnim ćelijama kao determinante

za uključivanje imunog odgovora kroz stimulaciju fenomena indukovane sistemske rezistencije. Smatra se da ovi lipopeptidni antibiotici uzrokuju poremećaje u plazma membrani što zauzvrat aktivira kaskadu biohemijskih procesa koji vode ka odbrambenom odgovoru (Ongena and Jacques, 2007). Indukovana otpornost ne obezbeđuje potpunu zaštitu, ali je dugotrajan fenomen i ne pogoduje razvoju rezistencije kod patogena što predstavlja dobru strategiju u biokontroli (Ongena *et al.*, 2008).

4) Inhibicija enzima uključenih u patogenezu gljiva

Sinteza hidrolitičkih enzima fitopatogenih gljiva tokom prve faze interakcije sa biljkom domaćinom je ključna u procesu infekcije. To su enzimi razgradnje ćelijskog zida kao što su pektolitički enzimi (egzo i endo poligalakturonaze, pektin liaze, pektin metil esteraze) i kutinaze koji su važni faktori patogenezе. Inhibicija sinteze ovih enzima je jedan od mehanizama agenasa biokontrole (Cawoy *et al.*, 2011).

1.2.2.2. Unapređenje efikasnosti antagonista

Primena proizvoda na bazi mikroorganizama antagonista ponekad nudi samo parcijalnu zaštitu biljaka od patogena usled povremene nedoslednosti u efikasnosti. Kako su aktivne komponente ovih proizvoda živi organizmi njihova efikasnost zavisi od uslova aplikacije, mnogo više nego za konvencionalne pesticide. Potencijalni mikrobijalni antagonist trebalo bi da ima određene željene karakteristike da bi bio efikasan u biokontroli: da bude genetički stabilan, efikasan pri niskim koncentracijama, da nema posebne nutritivne zahteve, da je efikasan u odnosu na širok spektar patogena pod različitim uslovima, rezistentan na pesticide, da ne sintetiše metabolite štetne po ljudsko zdravlje, da nije patogen za domaćina, da se može pripremiti u formi koja se efikasno može čuvati i nanositi i da je kompatibilan sa ostalim hemijskim i fizičkim tretmanima (Cawoy *et al.*, 2011). Takođe, bakterija antagonist bi trebalo da ima adaptivnu prednost u odnosu na specifičnog patogena. Tako na primer, većina voća se skladišti na niskim temperaturama te je za kontrolu njihovih postžetvenih patogena na zadovoljavajućem nivou nepohodno da mikrobijalni antagonist može da preživi i funkcioniše pri tim temperaturama.

Veoma je teško selektovati jedan soj mikroorganizma antagoniste sa širokim spektrom dejstva na razne biljne patogene. Dakle, neophodni su kompatibilni sojevi da bi se obezbedio neophodni spektar aktivnosti za efikasnu kontrolu patogena. Istovremena implementacija nekoliko aktivnih sastojaka u jednom komercijalnom proizvodu garantuje njegovu efikasnost pod različitim uslovima. U novijim istraživanjima, mešana kultura dva ili više antagonista biokontrole je pokazala veću efikasnost u biološkoj kontroli postžetvenih oboljenja u odnosu na pojedinačne (Mishra *et al.*, 2011).

U skorije vreme, osim tretmana živim bakterijama roda *Bacillus* ili suspenzijom njihovih spora kojima se prska bilo zemljište bilo koren biljke, započeti su *in vivo* tretmani biljaka sa ekstraktima peptidne strukture (Mateescu *et al.*, 2005). Touré *et al.* (2004) su takođe ukazali na visoku efikasnost *B. subtilis* GA1 soja u inhibiciji rasta micelija gljiva uzrokovaca truljenja jabuka, bilo da se u tretmanu koriste vegetativne ćelije, bilo endospore, ali i lipopeptidni ekstrakt ovog soja. Podjednako dobra efikasnost lipopeptidnog ekstrakta kao i vegetativnih ćelija ukazuje na njegovu ulogu u aktivnosti kompletnog soja kao agensa biokontrole.

Osim navedenog, integracija mikrobioloških antagonista sa fizičkim metodama kao što su sušenje, tretman toplotom i nejonizujuće UV-C zračenje (od 190-280 nm), može da poboljša efikasnost antagonista u kontroli kontaminacije. Takođe, efikasnost mikroorganizama antagonista može se poboljšati ukoliko se koriste sa manjom dozom fungicida i derivatima soli (Sharma *et al.*, 2009).

Efikasnost u biološkoj kontroli postžetvenih patogena na uskladištenom voću postignuta je i kombinovanim tretmanom voća sa dva biološka agensa, bakterijom antagonistom i etarskim uljem sa antifungalnim potencijalom (Akila *et al.*, 2011). Primena mešavine agenasa biokontrole ima određenih prednosti: a) širenje spektra aktivnosti različitih agenasa rezultuje u kontroli dva i više patogena, b) unapređenje efikasnosti i pouzdanosti biokontrole kao posledica toga da komponente u smeši deluju preko različitih mehanizama kao što je antagonizam, parazitizam i indukcija odbrambenog odgovora kod domaćina i c) teže stvaranje rezistentnih patogenih sojeva (Singh and Sharma, 2007).

2. CILJ

Kontaminacija fitopatogenim gljivama je target problem u distribuciji biljnih preparata, kako zbog uticaja na kvalitet, tako zbog mogućnosti sinteze mikotoksina koji mogu imati teratogeni, mutageni i kancerogeni potencijal.

Saznanja o riziku pri primeni nekih fungicida po rukovaoca, potrošača i životnu sredinu, dovela su do povećanja interesa za uvođenje alternativnih mera u zaštitu bilja, gde posebno mesto pripada preparatima prirodnog porekla tzv. agensima biološke kontrole koji podrazumevaju primenu korisnih mikroorganizama (korisnih bakterija, kvasaca, gljiva) ili produkata njihovog metabolizma, kao i primenu biljnih ekstrakata i etarskih ulja u zaštiti biljaka.

Prepoznajući probleme i uvažavajući iznete činjenice definisani su i ciljevi ovog rada:

- izolacija i identifikacija gljiva sa odabranih biljnih droga
- hemijska analiza odabranih etarskih ulja
- standardizacija testova za analizu antifungalne aktivnosti etarskih ulja *in vitro*, kao i određivanje minimalnih inhibitornih (MIC) i minimalnih fungicidnih koncentracija (MFC)
- ispitivanje antagonističkog potencijala različitih izolata *Bacillus* sp. prema odabranim fitopatogenim gljivama
- ispitivanje potencijalnog sinergističkog efekta različitih bioloških agenasa
- poređenje efekata biokontrolnih agenasa.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biljne droge

Uzorci biljnih droga iz kojih su izolovane i identifikovane gljive obezbeđeni su iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“. Korišćeni su uzorci usitnjenih biljnih droga pre ulaska u proizvodni proces, kao i gotovi proizvodi tj. monokomponentni čajevi. Biljne droge u kojima je determinisana mikopopulacija su:

- herba i listovi nane (*Mentha piperita* L.)
- listovi koprive (*Urtica dioica* L.)
- cvetovi nevena (*Calendula officinalis* L.)
- herba rastavića (*Equisetum arvense* L.)
- kukuruzna svila (*Maydis stigmata*).

3.1.2. Etarska ulja

Ispitivana etarska ulja, nabavljena od kompanije Frey + Lau GmbH, Henstedt-Ulzburg, Germany, prikazana su u Tabeli 1.

Tabela 1. Ispitivana etarska ulja

Srpski naziv ulja	Latinski naziv biljke od koje je dobijeno etarsko ulje	specifikacija
Ulje kore cimeta	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	P0125285
Ulje narandže	<i>Citrus aurantium amara</i>	P0104578
Ulje bergamota	<i>Citrus aurantium bergamia</i>	P0112136
Ulje kore limuna	<i>Citrus limon</i>	P0110499
Ulje korijandera	<i>Coriandrum sativum</i>	P0112145
Ulje lista eukaliptusa	<i>Eucalyptus globulus</i>	S0100180
Ulje ploda/semena anisa	<i>Illicium verum</i>	S0100154
Ulje herbe lavande	<i>Lavandula angustifolia</i>	P0123527
Ulje cveta kamilica (plavo)	<i>Matricaria recutita</i>	P0115610
Ulje lista čajnog drveta	<i>Melaleuca alternifolia</i>	P0123084
Ulje bosiljka	<i>Ocimum basilicum</i>	P0118460
Ulje origana **	<i>Origanum heracleoticum</i>	Srbija
Ulje zdravca	<i>Pelargonium graveolens</i>	P0114231
Ulje crnog bibera	<i>Piper nigrum</i>	P0123085
Ulje ruže (parfimisano)	<i>Rosa damascena</i>	P0100578
Ulje lista ruzmarina	<i>Rosmarinus officinalis</i>	P0124476
Ulje lista španske žalfije	<i>Salvia lavandulifolia</i>	P0107205
Ulje dalmatinske žalfije	<i>Salvia officinalis</i>	P0114240
Ulje čubra	<i>Satureja hortensis</i>	P0118884
Ulje timijana	<i>Thymus vulgaris</i>	P0123774
Ulje korena vetivera	<i>Vetiveria zizanoides</i>	P0114231
Ulje ljubičice (parfimisano)	<i>Viola odorata</i>	P0105637

**Etarsko ulje origana dobijeno je firme Herba, Beograd.

3.1.3. Sintetički fungicid

„Diflucan“ – antimikotik sa aktivnom supstancom flukonazolom (50 mg), Pfizer, Francuska. Dodavano je od 10 µl/bunaru do 50 µl/bunaru što predstavlja od 0.2 mg/ml do 2 mg/ml aktivne supstance.

3.1.4. Kolekcija prirodnih izolata *Bacillus* sp.

Korišćeni prirodni izolati *Bacillus* sp., izolovani sa različitih lokaliteta u Srbiji deo su kolekcije Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. To su: SS-6.2, SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-21.7, SS-27.7, SS-35.4, SS-38.2, SS-38.3, SS-38.4, SS-39.1, SS-39.3, SS-40.2 i SS-40.6.

3.1.5. Podloge

Sve podloge korišćene u ovom radu sterilisane su u autoklavu na 120°C, pri pritisku od jednog bara u trajanju od 15 minuta. Sterilnost podloga je testirana prekonoćnom inkubacijom na 37°C.

Krompir-dekstrozni-agar (Potato dextrose agar - PDA)

- agar.....17g
 - krompir.....200g
 - D-glukoza.....20g
 - destilovana voda.....1l
- pH = 7 (reguliše se 1N NaOH)

Sabouraud - agar (SBA)

- glukoza.....40 g
 - pepton.....10 g
 - agar.....18 g
 - destilovana voda.....1l
- pH=5,6 (reguliše se 1N NaOH)

Tryptic bile Soy Broth (TSB)

- kazein20.g
- žučne soli1,50g
- X-B-D glukuronska
kiselina 0,075g
- Dimetil sulfoksid 3,0g
- destilovana voda.....1l

Muller-Hinton agar

- kazein hidrolizat..... 17,5g
- mesni ekstrakt.....2,0g
- skrob1,5g
- agar 17g
- destilovana voda.....1l

Za mikrodilucionu metodu, kao i za prekonoćnu kulturu *Bacillus* sp. izolata, korišćena je tečna podloga, bez dodavanja agra (Sabouraud maltose bujon i Muller Hinton bujon).

Dihloran 18% glicerol agar (DG 18)

- Kazein.....5,0g
- D-glukoza..... 10,0g
- Kalijum dihidrogen
fosfat.....1,0g
- Magnezijum sulfat.....0,5g
- Dihloran.....0,002g
- Glicerol..... 200g
- Agar 12 do 15g
- Hloramfenikol0,1g
- destilovana voda.....1l

3.2. METODE**3.2.1. Identifikacija gljiva**

Determinacija kolonija gljiva, formiranih na medijumu, vršena je na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika izolata. Makroskopske odlike podrazumevaju izgled i brzinu razvoja kolonija na PDA podlozi, pigmentaciju supstrata

i izgled kolonije na pozadini. Mikroskopske odlike podrazumevaju prisustvo ili odsustvo mikrokonidija, oblik i način formiranja mikrokonidija i konidiogenih ćelija, izgled makrokonidija, prisustvo ili odsustvo hlamidospora, sklerocija, biometrijske vrednosti osobina reproduktivnih organa gljiva u kulturi i na domaćinu (Indeks pojmova prikazan je u Prilogu 1). Korišćeni su standardni determinatori Booth (1971); Ainsworth *et al.*, (1973); Pitt (1979); Gerlach i Nirenberg (1982), Brown (1987), Burgess *et al.* (1994); Elis i Elis, (1997), Lević (2008). Pri identifikaciji najzastupljenijih *Fusarium* vrsta vođeno je računa o nekim opšte prihvaćenim principima (Nelson *et al.*, 1983).

3.2.2. Određivanje hemijskog sastava etarskih 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. Korišćen je gasni hromatograf Agilent 7890A opremljen split/splitless injektorom, koji je uz pomoć tehnologije kapilarnog protoka povezan na dva detektora (plameno jonizacioni i maseni). Kapilarna kolona je povezana direktno na dvokanalni razdelnik, na koji je takođe povezana po jedna kapilara (bez stanionarne faze) koje idu prema detektorima. Tokom analiza korišćena je HP-5MSI kapilarna kolona dimenzija (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) uz helijum kao noseći gas, u modu sa konstantnim pritiskom (16.255 psi). Korišćen je temperaturni program sa početnom temperaturom od 60°C i lineanim porastom od 3°C u minutu sve do 300°C, pri čemu je poslednjih 10 minuta analize temperatura zadržana na 300°C. Maseni detektor je takođe Agilent-ov kvadrupolni detektor, 5975C inert XL EI/CI MSD, a maseni spektri su snimani tehnikama elektronske jonizacije (70 eV). Uzorci su analizirani u splitless modu. Injekciona zapremina je bila 1 µl. Temperatura izvora za elektronsku jonizaciju bila je 230°C, a temperatura kvadrupola 150°C. Snimanje masenih spektara je bilo započeto 3 minuta nakon injektovanja.

3.2.3. Pripremanje koncentracije spora za mikrodilucionu metodu

Gljive su gajene na PDA podlozi, u periodu od 10 do 21 dana, u zavisnosti od izolovane vrste gljive, na sobnoj temperaturi i stornirane na +4°C do daljne upotrebe (Booth, 1971).

Inokulum je pripremljen tako što su isprane spore sa površine agarnih ploča sterilnim rastvorom 0.85% NaCl-a koji sadrži 0.1% Tween 80 (vol/vol). Suspenzija spora je sterilnim rastvorom NaCl dovedena do konačne koncentracije od 1.0×10^5 CFU/ml medijuma. Tako pripremljen inokulum držan je na $+4^\circ\text{C}$ do upotrebe. Radi provjere validnosti inokuluma, kao i odsustva kontaminacije, vršena je inokulacija na čvrstu podlogu (PDA).

U epruvetu sa kulturom mikromicete sipana je određena zapremina fiziološkog rastvora i Tween 80 (oko 3 ml za slabo sporulišuće vrste, i do 5 ml za dobro sporulišuće). Sterilnim štapićem za bris pokupljene su zaostale spore sa kulture i procedene kroz duplu sterilnu gazu u sterilnu epruvetu. Nanešeno je 50 μl inokuluma na pločicu za brojanje i prekriveno pokrovnim staklom. Na mikroskopu su pronalazene mrežice pločice i prebrojavane spore u 2-3 polja. Izračunavana je aritmetička sredina.

Preračunavano je koliko μl inokuluma treba dodati u "bunarčić" mikrotitracione ploče za svaku gljivu, da bi broj spora bio približno 1×10^5 . Ukoliko je broj spora po polju bio izuzetno mali (što se vidi po velikoj zapremini inokuluma koju bi trebalo dodati u bunarčić da bi dobili željenu koncentraciju spora), sa već spranim inokulumom spirana je još jedna kultura kako bi ukoncentrisali spore. Ponavljao se ceo postupak brojanja.

Ukoliko je broj spora po polju suviše veliki, da se ne može izbrojati po jednom polju, pristupalo se razblaživanju 10 ili više puta (u zavisnosti od toga koliko su spore koncentrisane), tako što se 100 μl inokuluma spora sipa u ependorf sa 900 μl fiziološkog rastvora i Tween 80 i pristupa se ponovnom računanju.

3.2.4. In vitro test za određivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja

Mikrodiluciona metoda

Za ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja korišćena je mikrodiluciona metoda na mikrotitracionim pločama, 96-sistem (Hanel i Raether, 1988; Daouk *et al.*, 1995).

Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) vršeno je dodavanjem različitih, rastućih, koncentracija etarskih ulja u tečni medijum. Za svaku koncentraciju rađeno je po dve kolone, u pet ponavljanja. Na kraju je dodavan određen volumen

suspenzije sa inokulumom, za svaku gljivu drugačiji, tako da konačna koncentracija bude $1,0 \times 10^5$ CFU/ml medijuma. Mikroploče inkubirane su na 28°C u trajanju od 72 sata. Najmanja koncentracija na kojoj nije bilo rasta mikromiceta uzimana je za MIC. Minimalne fungicidne koncentracije (MFC) određivane su reinokulisanjem po $2 \mu\text{l}$ iz bunarčića u kome je određen MIC u $100 \mu\text{l}$ tečnog medijuma i inkubirane sledećih 72 h na 28°C . Ukoliko nije bilo rasta, te koncentracije uzimane su za MFC. Step en aktivnosti etarskih ulja, jak, umeren i slab, utvrđivan je u odnosu na inhibitornu aktivnost komercijalnog antibiotika, kao i literaturnih podataka.

Kao kontrola je korišćen komercijalni mikotik - flukonazol.

3.2.5. Test za utvrđivanje sinergističke aktivnosti etarskih ulja

Za ispitivanje potencijalne sinergističke aktivnosti između dva ulja korišćene su mikrotitracione ploče, 96-sistem. „Bunari“ mikrotitracionih ploča prvo se ispune Tryptic Soy Broth (TSB) medijumom (zapremina hranljive podloge zavisi od količine ulja koja se dodaje u bunar i od zapremine inokuluma koji drugačiji za svaku gljivu ponaosob), a zatim i etarskim uljima u koncentracijama od $1/16 \times \text{MIC}$ do $8 \times \text{MIC}$ i kombinuju međusobno u šahovskom stilu. Ispitivane koncentracije ulja su $1/16 \times$, $1/8 \times$, $1/4 \times$, $1/2 \times$, $1 \times$, $2 \times$, $4 \times$ i $8 \times \text{MIC}$ za oba ulja, u kombinaciji svako sa svakim.

Inokulum za svaku ispitivanu gljivu bio je 1.0×10^5 CFU/bunaru. Mikrotitracione ploče su inkubirane 72 h na 26°C (Jacqueline *et al.*, 2005).

Frakciona inhibitorna koncentracija (FIC - fractional inhibitory concentration) je izračunavana na sledeći način:

FIC ulja A (MIC ulja A kada je u kombinaciji sa uljem B / MIC ulja A)

FIC ulja B (MIC ulja B kada je u kombinaciji sa uljem A / MIC ulja B)

Interakcija dva ulja, $\text{FiC}_{\text{indeks}}$ (FiCi), ili frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks, se dobija po formuli:

$\text{FiCi} = \text{FIC ulja A} + \text{FIC ulja B}$

Interakcija dva ulja se definiše kao sinergizam kada je frakcioni indeks inhibitorne koncentracije $\text{FiC}_{\text{indeks}} \leq 0,5$; indiferentni efekat kada je $\text{FiC}_{\text{indeks}} 0.5-2$ i antagonistički kada je $\text{FiC}_{\text{indeks}} \geq 2$ (da Silva *et al.*, 2011).

3.2.6. ISO 21527-2 metoda za brojanje kvasaca i plesni korišćena u *in vitro* ispitivanjima uticaja etarskih ulja na ukupan broj gljiva u biljnim drogama

Pripremi se osnovno razblaženje uzorka (10^{-1}), upotrebom 90 ml 0.1% peptonske vode kao rastvarača i 10g suve droge i homogenizuje. Odatle se pripreme ostala decimalna razblaženja. Iz poslednjeg se otpipetira 0.1ml u Petrijeve šolje sa prethodno pripremljenim DG 18 agarom i utrlja u podlogu. Podloga se okrene naopako, na poklopac, i inkubira 5 do 7 dana na temperaturi $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Posle inkubiranja, izbroje se izrasle kolonije i iskazuju kao broj kvasaca i plesni u jednom gramu ili po mililitru.

3.2.7. *In vitro* i *in situ* test za određivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja

3.2.7.1. *In vitro* test

Potencijalna redukcija ukupnog broja gljiva u uzorku biljne droge, delovanjem odabranih etarskih ulja, određivana je dodavanjem određene koncentracije etarskog ulja (MIC vrednost preračunata za zapreminu podloge i PŠ) u ohlađenu PDA podlogu i određeno decimalno razblaženje uzorka droge u kome se prati redukcija patogena. Petrijeve šolje sa etarskim uljima i uzorcima droge gajene su na 25°C 3 do 5 dana. Nakon perioda inkubacije utvrđivan je broj gljiva na PŠ.

3.2.7.2. *In situ* test

U *in situ* ispitivanjima korišćena je modifikovana metoda isparavanja etarskog ulja sa filter papira u zatvorenoj kesici sa ispitivanom drogom, tzv. „pad delivery system“ tj. „soaking pad system“ (Plaza *et al.*, 2004; Arrebola *et al.*, 2010).

Sterilni Whatman filter diskovi, isečeni u prečniku 1 cm, nakapani su određenom koncentracijom ispitivanih etarskih ulja. Korišćene su koncentracije etarskih ulja od 10 μl /filter disku do 100 μl /filter disku. Filter papiri sa aplikovanim etarskim uljem stavljani su u sterilne kesice za filter čajevе sa koncem, a one u papirne ambalaže sa drogom koje se koriste pri pakovanju čajeva, da vise bez dodirivanja droge. Ambalaža je zatvarana i postavljena u sterilnu plastičnu kesu sa uzorkom droge.

Posle 5 i 7 dana, utvrđivan je ukupan broj gljiva u uzorcima prema navedenoj, ISO metodi.

3.2.8. In vitro ispitivanje antagonističke aktivnosti izolata *Bacillus* sp. na fitopatogene gljive

Prekonoćna kultura *Bacillus* sp. izolata pravljena je zasejavanjem kolonije u Mueller-Hinton bujon i inkubacijom 24h na 30°C.

Skrining test: Na početku je urađen skrining test u kome je ispitivana osetljivost gljiva, na sve *Bacillus* sp. izolate (korišćena prekonoćna kultura).

Antagonistički efekat izolata *Bacillus* sp. testiran je *in vitro*, primenom metode dvojne kultivacije u Petrijevim šoljama sa PDA agarom (Fokkema,1978). PDA podloga je korišćena za kultivaciju gljiva izolovanih sa biljnih droga, dok je za kultivaciju potencijalnih antagonista, izolata *Bacillus* sp. korišćen Muller-Hinton agar.

Disk micelijuma (6 mm u prečniku) određene gljive uziman je sa periferije kulture stare 7 dana i aseptično prenesen i postavljen naopačke na PDA podlogu, oko 25 mm od centra Petrijeve šolje. Ovako zasejana podloga inkubirana je na 25°C tokom 24h. Nakon 24h u iste Petrijeve kutije, bakteriološkom ezom su naneti ispitivani antagonisti tj. izolati *Bacillus* sp. na udaljenosti od 3 cm od isečka (diska) test gljive. Kontrolu su predstavljale kulture ispitivanih patogena, bez prisustva *Bacillus* sp. izolata. Sve kombinacije zasejanih gljiva i izolata *Bacillus* sp. kao antagonista, inkubirane su u termostatu 7 dana, na temperaturi od 25°C. Eksperiment je ponovljen 2 puta sa 5 uzoraka za jednu gljivu i jedan izolat *Bacillus* sp. Pokazatelj stepena antagonističkog delovanja bila je razlika u porastu kolonija gljiva u odnosu na kontrolu. Procenat inhibicije porasta (percent growth inhibition, PIG) je izračunat pomoću formule (Korsten *et al.*, 1995):

$$\text{PIG (\%)} = \text{KR} - \text{R1/KR} \times 100,$$

gde je KR dužina micelije gljive (merena u mm) od mesta inokulacije do ivice (margine) kolonije u kontrolnoj Petri šolji, a R1 je dužina micelije od mesta inokulacije do margine kolonije u pravcu antagoniste tj. *Bacillus* izolata u test Petrijevim šoljama.

Vrednosti PIG su svrstane u odgovarajuće kategorije tzv. kategorije inhibicije rasta (growth inhibition category, GIC), od 0 do 4 i to: 0 - bez inhibicije rasta; 1 -

inhibicija rasta 1-25%; 2 - inhibicija rasta 26-50%; 3 - inhibicija rasta 51-75; 4 - inhibicija rasta 76-100% (Korsten *et al.*, 1995).

3.2.9. Ispitivanje sinergističke aktivnosti etarskog ulja i izolata *Bacillus* sp.

U ispitivanjima potencijalnog sinergizma izolata *Bacillus* sp. i etarskog ulja u inhibiciji rasta patogene gljive primenjena je izmenjena metoda za ispitivanje antagonističke aktivnosti izolata *Bacillus* sp. Cela procedura je ista izuzev što su ovde u ohlađenu PDA podlogu dodavana etarska ulja određene koncentracije. Rast gljiva, kao i *Bacillus* sp. izolata, na podlozi sa određenom koncentracijom etarskog ulja korišćen je kao kontrola.

3.2.10. Statistička analiza

Osnovni statistički parametri, standardna devijacija i standardna greška, su izračunati i predstavljeni histogramima. Podaci su analizirani standardnom analizom varijanse (ANOVA test). Srednje vrednosti MICa testiranih supstanci su dobijeni korišćenjem Dankanovog testa višestrukog opsega. Statistička značajnost primenjena u svim testovima je $p < 0.05$. Statistička analiza je izvršena primenom softverskih programa STATISTICA v.7 (StatSoft, Inc.) i IBM SPSS Statistics v.19 (SPSS, Inc.).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Identifikacija gljiva sa biljnih droga

Biljne sirovine koje se koriste za proizvodnju različitih lekovitih biljnih preparata, obezbeđuju se ili iz spontane flore ili iz plantažne proizvodnje. U oba slučaja mogu biti mikrobiološki kontaminirane na samom izvoru tj., mestu gajenja ili prilikom daljeg preuzimanja, distribucije, skladištenja, prerade i pakovanja.

Prisustvo gljiva na lekovitom bilju osim što umanjuje njihovu mogućnost upotrebe i kvalitet, pod određenim uslovima, može takođe dovesti do produkcije toksičnih metabolita, mikotoksina. Mikotoksini su termostabilni i ne mogu se uništiti kuvanjem; imaju kumulativni efekat i teško se eliminišu iz organizma. Smatra se da najpoznatije i najvažnije mikotoksine sintetišu gljive iz rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* (Rizzo *et al.*, 2004; Bugno *et al.*, 2006; Grigoryan *et al.*, 2011).

Kada je u pitanju mikrobiološki kvalitet biljnih droga najveći problem predstavlja kontaminacija gljivama. Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je da se izoluju i identifikuju gljive sa biljnih droga koje se u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ najviše koriste u proizvodnji različitih proizvoda, posebno čajeva. Uzorci, u vidu biljnih droga, su uzeti iz magacinskih prostora pre procesa proizvodnje, ili su uzimani njihovi gotovi proizvodi (čajevi). Odabrane su biljne droge za koje se u ranijim istraživanjima, pri ispitivanju mikrobiološke ispravnosti, utvrdilo da su najviše kontaminirane različitim mikroorganizmima, posebno gljivama.

Najlošiji mikrobiološki kvalitet, kada su u pitanju gljive, utvrđen je za sledeće biljne droge: kukuruzna svila (*Maydis stigmata*) - 82% uzoraka je bilo kontaminirano, listovi i herba nane (*Mentha folium et herba*) - 74% kontaminiranih uzoraka, herba rastavića (*Equiseti herba*) - 62%, cvetovi nevena (*Calendula flos*) - 56% i listovi koprive (*Urtica folium*) - 52% (Stević, 2009; Stević *et al.*, 2012). Zbog lošeg mikrobiološkog statusa i zbog činjenice da su to biljne droge koje se, uglavnom koriste u proizvodnji različitih čajnih mešavina u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ izabrane su za dalji rad tj., za izolaciju i identifikaciju fitopatogenih gljiva. Odabrane su: nana (*Mentha piperita* L.), kopriva (*Urtica dioica* L.), neven (*Calendula officinalis* L.), rastavić (*Equisetum arvense* L.) i kukuruzna svila (*Maydis stigmata*).

Sa odabranih droga, izolovano je ukupno 48 vrsta gljiva prikazanih u Tabeli 2. prema učestalosti pojavljivanja tj., izolovanja.

Tabela 2. Identifikovane gljive izolovane sa odabranih biljnih droga

Biljne droge	Identifikovane gljive
<i>Maydis stigmata</i>	<i>Mucor</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp. <i>Fusarium</i> sp., <i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticillioides</i> (= <i>F. moniliforme</i>), <i>F. taphsinum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. semitectum</i> <i>Alternaria</i> sp. <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. flavus</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Myrothecium verrucaria</i> <i>Cephalosporium</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Nigrospora</i> sp.
<i>Menthae folium i herba</i>	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>F. proliferatum</i> , <i>F. tricinctum</i> <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Aspergillus</i> sp. <i>Alternaria alternata</i> <i>Penicillium notatum</i> , <i>Penicillium</i> sp. <i>Phoma</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. <i>Verticillium dahliae</i> , <i>V. cynobarinum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Gliocladium roseum</i> <i>Mucor</i> sp. <i>Curvularia lunata</i> <i>Drechslera</i> (= <i>Bipolaris</i>) <i>tetramera</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Septoria</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp. <i>Cercospora</i> sp.
<i>Equiseti herba</i>	<i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Fusarium</i> sp. <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Chetomium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. (<i>hrebaram</i>) <i>Stahybotris</i> sp. <i>Epicoccum</i> sp. <i>Myrothecium</i> sp.
<i>Urtica folium</i>	<i>F. semitectum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> <i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> <i>Trichotecium roseum</i> <i>Phoma</i> sp. <i>Gliocladium roseum</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Septoria</i> sp. <i>Puccinia</i> sp. <i>Botrytis</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp.
<i>Calendulae flos</i>	<i>Mucor</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>Alternaria</i> sp. <i>Myrothecium verrucaria</i> <i>F. proliferatum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticillioides</i> <i>Drechslera</i> (= <i>Bipolaris</i>) <i>tetramera</i>

Iako su na svim biljnim drogama utvrđene mešovite infekcije gljivama iz različitih rodova, većina izolovanih vrsta gljiva pripada rodu *Fusarium*. Ranija israživanja su pokazala da od ukupnog broja identifikovanih gljiva na lekovitim biljkama 35,5% vrsta pripada ovom rodu (Pavlović, 2008). Sledeće po brojnosti u ovom radu su predstavnici rodova *Aspergillus* i *Alternaria*. Osim pomenutih, identifikovani su i predstavnici rodova: *Penicillium*, *Phoma*, *Cephalosporium*, *Nigrospora*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Cercospora*, *Phomopsis*, *Verticillium*, *Dreschlera* (= *Bipolaris*), *Rhizoctonia*, *Septoria*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Stahybotrys*, *Trichotecium*, *Puccinia*, *Botrytis*, *Mucor* i *Rhizopus* sp., u zavisnosti od biljne droge.

Ukupno je determinisano 12 vrsta roda *Fusarium* i to: *F. vericillioides*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. tricinctum*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides*, *F. taphsinum*, *F. subglutinans*, *F. nygamai*, *F. solani* i *F. equiseti*. One dominiraju prema učestalosti na nani, rastaviću i koprivi, dok na osušenoj drogi nevena i kukuruzne svile prema učestalosti pojavljivanja dominiraju predstavnici rodova *Rhizopus* i *Mucor*. Od rodova *Aspergillus*, *Alternaria* i *Verticillium* identifikovano je po dve vrste, a od ostalih rodova po jedna (Tabela 2.).

Na svim odabranim biljnim drogama identifikovani su i predstavnici roda *Alternaria*, dok vrste roda *Aspergillus* nisu izolovane i identifikovane samo iz uzoraka cveta nevena. Slično ovome, predstavnici roda *Penicillium* identifikovani su u svim biljnim drogama sem koprive. Pojedine gljive determinisane su samo do nivoa roda; za detaljniju determinaciju bila bi neophodna PCR analiza.

Za dalji rad, prema zastupljenosti na biljnim drogama, izabrane su vrste koje će biti opisane.

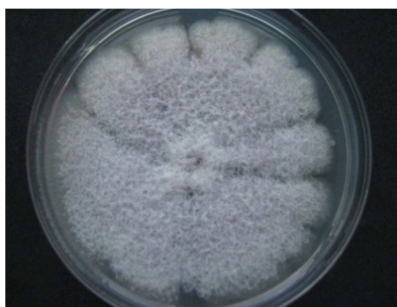
4.1.1. Rod *Fusarium*

Rod *Fusarium* kolektivno predstavlja najvažniju grupu biljnih patogena uzrokujući različita oboljenja na skoro svakoj, ekonomski važnoj, biljnoj vrsti. Ovaj rod sadrži veliki broj vrsta. Među vrstama roda *Fusarium* u našem radu najveći broj izolovan je i identifikovan sa kukuruzne svile (8 vrsta) i herbe rastavića (6 vrsta), sa nane i koprive 4, a sa nevena 3 vrste.

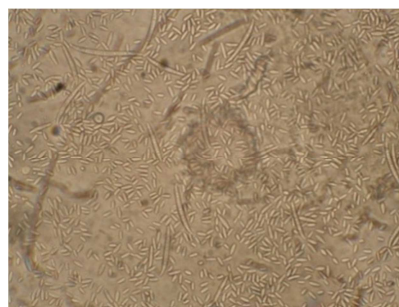
F. verticillioides je dominantni predstavnik na izabranim biljnim drogama, izolovan sa svih sem sa herbe rastavića. *F. graminearum*, *F. oxysporum* i *F. proliferatum* su izolovani sa tri biljne droge, *F. tricinctum*, *F. semitectum* i *F. sporotrichioides* sa dve, a ostale, *F. taphsinum*, *F. subglutinans*, *F. nygamai*, *F. semitectum*, *F. solani* i *F. equiseti*, sa jedne biljne droge (Tabela 2.).

4.1.1.1. *Fusarium verticillioides* /Sacc./ Nirenberg (sin: *F. moniliforme* Sheldon)

F. verticillioides (do skora *F. moniliforme*) je izolovana i identifikovana iz uzoraka svih biljnih droga sem herbe rastavića. To je kosmopolit, patogen mnogih biljnih vrsta, voća i žita. Formira obilnu, vunastu, beličastu vazдушnu miceliju koja kasnije poprima nijanse svetlo i tamno ljubičaste (Slika 1a). Boja micelije i pigmentacija podloge znatno varira u zavisnosti od izolata. Na PDA podlozi micelija raste veoma brzo, obrazuje kolonije prečnika 7,5 – 8 cm nakon 6 dana pri 25°C, u tami. Mikrokonidije su jednoćelijske, retko sa jednom septom, ovalne, hijalinske, formiraju se na vrhu monofijalida, u vidu dužih ili kraćih nizova ili lažnih glavica. Makrokonidije (Slika 1b) se formiraju retko na monofijalidama, prave su ili blago povijene, tankih zidova, vršna ćelija je sužena pri vrhu, bazalna sa petom, sa 3-5 septi, hijalinske su. Hlamidospore su odsutne kod svih izolata.



a)



b)

Slika 1. *Fusarium verticillioides* - izolat sa nevena, izgled: a) vazdušne micelije i b) mikro- i makrokonidija (uveličanje 400 ×)

4.1.1.2. *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hasen

F. oxysporum je izolovana iz uzoraka cvetova nevena, kukuruzne svile i herbe rastavića. To je kosmopolitska vrsta, ali njeni različiti oblici imaju različite stepene distribucije. Uzrokuje vaskularno uvenuće biljaka kao i truljenje korena.

Vazдушna micelija raste veoma brzo, obrazuje kolonije prečnika 7,5 – 8 cm nakon osam dana, pri optimalnoj temperaturi od 25°C, u tami. Na PDA podlozi mogu da se razviju različite forme *F. oxysporum* tj., postoji velika varijabilnost između izolata ove vrste u pogledu strukture i boje vazdušne micelije i pigmentacije supstratne micelije (Pavlović, 2008). Boja micelije izolata vrste *F. oxysporum* varira od svetle, bledoljubičaste do boje crvenog vina u zavisnosti od porekla izolovane kulture tj., vrste biljne droge sa koje je izolovana (Slika 2a i b). Zbog obrazovanja brojnih plavih sklerocija ili svetložutih, mrkih ili narandžastih sporodohija, kolonije mog imati i ove boje. Pigment u podlozi je bež, tamnoplav, tamno ljubičastocrven, i samo ponekad nije prisutan.

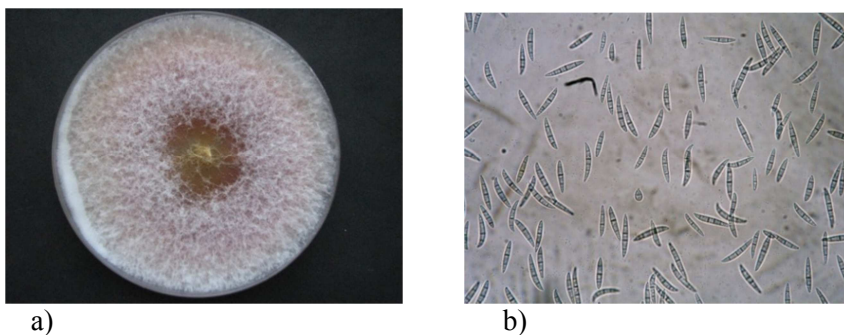
F. oxysporum produkuje tri tipa aseksualnih spora: mikrokonidije, makrokonidije i hlamidospore (Slika 2c). Mikrokonidije su jedno- ili dvoćelijske i njih ova vrsta produkuje najčešće i najobilnije, pod svim uslovima. Ovaj tip spora se najčešće produkuje unutar sudova inficirane biljke. Makrokonidije su neznatno savijene, skoro prave, kratke sa 3 do 5 septi. Ove spore se uobičajeno nalaze na površini biljaka na kojima se nastanila ova gljiva. Hlamidospore su okrugle, debelih zidova koje se sintetišu bilo terminalno ili interkalarno na starijem micelijumu ili u makrokonidiji. *F. oxysporum* može da preživi ili u vidu micelijarne forme ili u vidu spora.



Slika 2. *Fusarium oxysporum* – izgled vazdušne micelije izolata sa: a) nevena i b) kukuruzne svile i c) izgled hlamidospora (izolat sa nevena), pri uveličanju od 400 ×

4.1.1.3. *Fusarium sporotrichioides* Sherbakoff

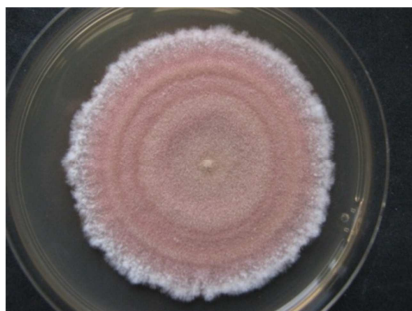
Ova vrsta izolovana je i identifikovana sa listova nane i koprive. Nalazi se uglavnom u oblastima sa hladnom i umerenom klimom. Na PDA podlozi micelija raste veoma brzo, obrazuje kolonije prečnika 7,5 – 8 cm nakon četiri dana, pri 25°C, u tami. Vazдушna micelija je rastresita do gusta, beličasta ili ružičasta do crvenkastosmeđa u starijim kolonijama (Slika 3a.). Obrazuje obilno mikrokonidije, dok su makrokonidije savijene, srednje dužine, postepeno sužene prema krajevima, sa 3 do 5 poprečnih pregrada. Hlamidospore su loptaste žutosmeđe, pojedinačne ili u nizovima (Slika 3b).



Slika 3. *Fusarium sporotrichioides* - izolat sa koprive, izgled: a) vazdušne micelije i b) makrokonidija (uveličanje 400 ×)

4.1.1.4. *Fusarium tricinctum* (Corda) Saccardo

Izolovana je iz uzoraka herbe rastavića, kao i lista i herbe nane. Široko rasprostranjena vrsta, posebno u oblastima sa umerenom klimom, izolovana sa mnogih kultivisanih biljaka. Na PDA podlozi micelija raste srednje brzo, obrazuje kolonije prečnika 4,5 – 6 cm nakon 10 dana, pri 25°C, u tami. Ivica kolonije je više-manje nepravilna. Vazдушna micelija je obilna, pamučasta, gusta, bela i ružičasto-bela, dok je u starijim kulturama intezivno karmin crvena ili narandžasto-smeđa (Slika 4.). Obrazuje mikrokonidije, dok su makrokonidije savijene ili srpaste, srednje duge, sa 3 do 5 pregrada.



Slika 4. *Fusarium tricinctum* – izgled vazdušne micelije izolata sa nane

4.1.1.5. *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas comb. Nov.

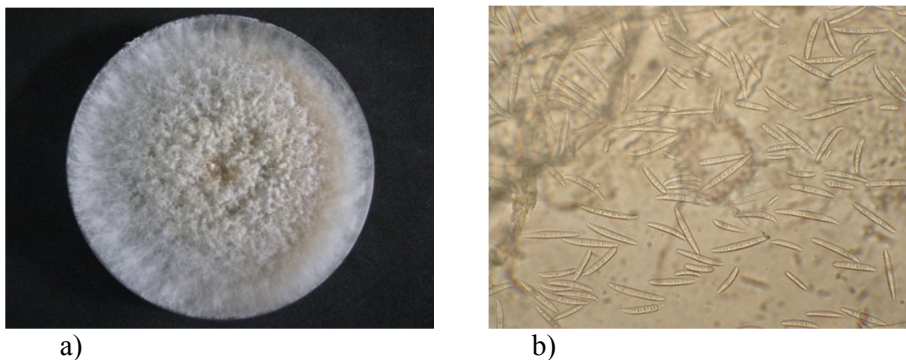
Kosmopolitska vrsta, izolovana sa kukuruzne svile, preovlađuje u oblastima sa umerenom klimom u kojima prouzrokuje bolesti različitih biljnih vrsta, posebno žitarica. Kolonije ove gljive obrazuju retku, belu vazdušnu miceliju, koja kod nekih izolata vremenom postaje ljubičasta ili sivo ružičasta (Slika 5.). Pigmentacija u podlozi varira od svetlo smeđe, svetlo ljubičaste do tamno purpurne, skoro crne. Na PDA podlozi micelija raste veoma brzo, obrazuje kolonije prečnika 7,5 – 8 cm nakon osam dana, pri 25°C u tami. Obrazuje ovalne ili cilindrične, uglavnom neseptirane, ili sa jednom septom, mikrokonidije. Makrokonidije su duge hijalinske, blago savijene ili ravne, uglavnom sa vršnom ćelijom u obliku kuke i bazalnom u obliku stopala. Makrokonidije su najčešće sa tri do pet septi. Svi izolati *F. subglutinans* formiraju mezokonidije.



Slika 5. *Fusarium subglutinans* - izgled vazdušne micelije izolata sa kukuruzne svile

4.1.1.6. *Fusarium semitectum* Berkeley & Ravenel

U ovom radu izolovana je sa kukuruzne svile i koprive. Kosmopolitska vrsta, nalazi se u zemljištu u oblastima tropske i umerene klime. Na PDA podlozi micelija raste veoma brzo, obrazuje kolonije prečnika 7,5 – 8 cm nakon osam dana, pri 25°C, u tami. Micelija je vazдушna bela, gusta, bujna i vunasta. Vremenom dobija boju breskve (Slika 6a.). Pigment u podlozi je bledosmeđ do tamnosmeđ, nikada crven, ljubičast ili plavičast. Konidiofori ove vrste su tipa mono- i polifijalida. Ne obrazuje mikrokonidije, dok su makrokonidije prave do blago savijene, relativno duge, najčešće sa 3-5 septi (Slika 6b.). Hlamidospore su loptaste, pojedinačne, ili u vidu kratkih nizova.



Slika 6. *Fusarium semitectum* - izolat sa koprive, izgled: a) vazdušne micelije i b) makrokonidija (uveličanje 400 ×)

4.1.1.7. *Fusarium solani* Martius

F. solani, izolovana je sa herbe rastavića. Kosmopolitska vrsta, najčešće prisutna u zemljištu, a prouzrokuje trulež korena i uvenulost brojnih biljnih vrsta. Na PDA podlozi micelija raste veoma brzo, obrazuje kolonije prečnika 7,5 – 8 cm nakon osam dana, pri 25°C, u tami. Vazдушna micelija je razređena, pamučasta, obično bela do svetložuta (Slika 7.). Može biti i plavozelene boje zbog sporodohija. Pigment u podlozi je odsutan ili bledo do tamnoljubičast, mrkožut s plavom nijansom ali nikada narandžast.

Makrokonidije su blago savijene, valjkaste, krupne, sa 3 do 5 poprečnih septi, ređe 7, formiraju se na monofijalidama na razgranatim konidioforama u sporodohijama, a u manjoj meri na monofijalidama na hifama. Mikrokonidije se obilno formiraju nakon

tri dana u "lažnim glavicama" na dugačkim monofijalidama. Hlamidospore su poluloptaste ili loptaste, uglavnom pojedinačne ili u parovima.

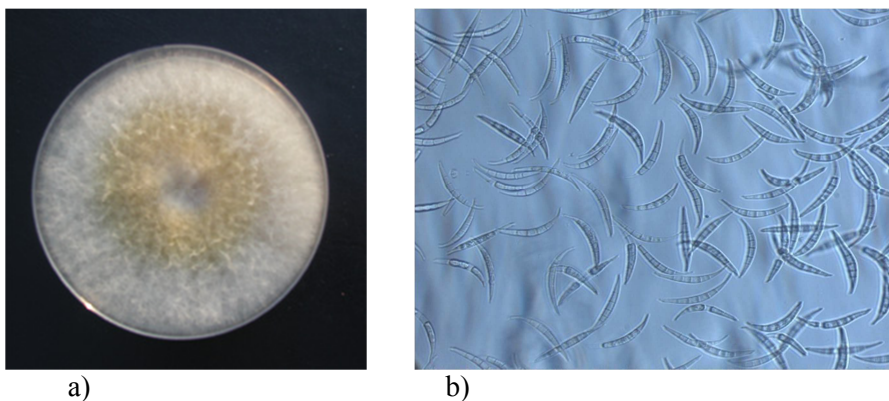


Slika 7. *Fusarium solani* - izgled vazdušne micelije izolata sa rastavića

4.1.1.8. *Fusarium equiseti* (Corda) Saccardo

F. equiseti izolovana je sa herbe rastavića. To je kosmopolit, preovlađuje u oblastima sa suvom klimom, kao saprob u zemljištu i biljni patogen; prouzrokuje trulež korena različitih vrsta biljaka. Vazдушna micelija raste brzo na PDA podlozi, obrazuje kolonije prečnika 6 – 8 cm nakon 6 dana, pri 25°C, u tami. Ujednačeno je pamučasta, bela do ružičasta i bež do žutosmeđa u starijim kulturama (Slika 8a.). Pigment u podlozi je bež, oker, svetložut, a nikada crven, ljubičast ili plavičast.

Mikrokondije ne obrazuje, dok su makrokonidije srpaste, karakteristične savijenosti, najčešće sa 3 do 5 ili 7 pregrada (Slika 8b.) Vršne ćelije su više ili manje izdužene, ponekad kao bič što ističe savijenost konidija. Brojne hlamidospore, loptaste u grupama, ređe pojedinačne, obrazuje veoma brzo te ih je lako uočiti pri mikroskopiranju kultura *in situ*.



Slika 8. *Fusarium equiseti* - izolat sa rastavića, izgled: a) vazdušne micelije i b) makrokonidija (uveličanje 400 ×)

4.1.2. Rod *Alternaria*

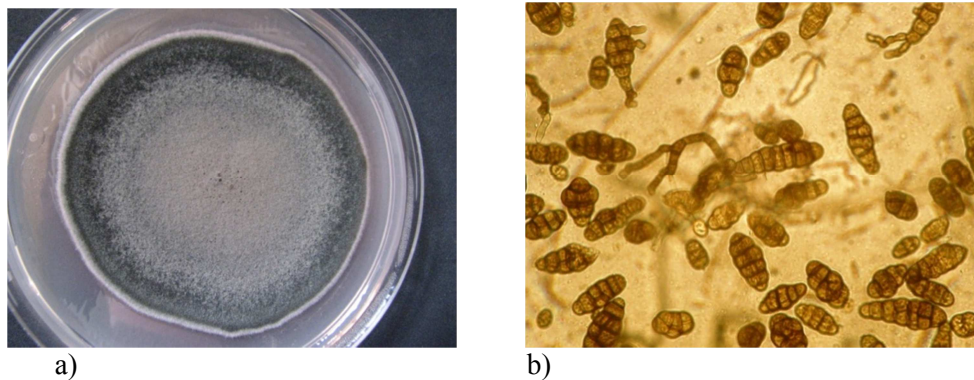
Gljive roda *Alternaria* su sveprisutni patogeni i saprofiti. Vrste ovog roda su uglavnom izolovane iz biljaka, zemljišta, uskladištene hrane i vazduha prostorija. Mnoge vrste roda *Alternaria* najčešće prouzrokuju kvarenje različitih useva na polju ili propadanje posle berbe. Zbog njihove sposobnosti rasta čak i pri niskim temperaturama (od – 2 do 5°C), odgovorne su i za kvarenje ovih useva tokom transporta i skladištenja u hladnjačama. Nekoliko vrsta ovog roda proizvode toksične sekundarne metabolite – *Alternaria* mikotoksine. Predstavnici ovog roda izolovani su i identifikovani iz svih biljnih droga ispitivanih u ovom radu.

4.1.2.1. *Alternaria alternata* (Fries) Keissler

Vrsta je ekstremno česta kao saprob na biljkama, prehrambenim proizvodima, tekstilu i zemljištu. Spore su često prisutne u vazduhu, kućnoj prašini, vlažnim zidovima itd. Ova vrsta je identifikovana iz uzoraka nane, koprive i nevena.

Gljiva brzo raste na PDA podlozi, ispunjavajući Petri kutiju u toku 7-10 dana. Kolonije su ravne, paperjaste do vunaste, postaju pokrivene sivkastim, kratkim, vazdušastim hifama tokom vremena. Površina je sivkasto bela na početku a kasnije tamni i postaje zelenkasto crna ili maslinasto braon sa svetlim granicama (Slika 9a.). Zadnja strana kolonije je tipično braon, do crna. Tamna obojenost posledica je pigmenta melanina koja im obezbeđuje rezistentnost na UV-zrake. Konidiofore su svetlo do maslinasto braon boje, individualne su, rastu direktno iz supstrata formirajući duge lance konidija, dok su sekundarne konidiofore kratke. Konidije (Slika 9b.) su svetlo braon boje.

Zbog veoma velikog broja spora, *A. alternata* spada u mikromicete koje najčešće izazivaju alergije koje mogu dovesti do astme umerenog tipa. Takođe, može uzrokovati polensku groznicu, pneumonitis, sinuzitis; veoma retko može izazvati oštećenje mozga.



Slika 9. *Alternaria alternata* – izolat sa nane, izgled: a) vazdušne micelije i b) spora (uveličanje 400 ×)

4.1.2.2. *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire

Vrsta je izolovana iz uzoraka koprive i nevena. *A. tenuissima* je biljni patogen koja na PDA podlozi nakon 4 do 5 dana inkubacije, pri 26°C, i fotoperiodom od 12h, formira ravne kolonije sa hrapavom gornjom površinom. Periferija kolonije je maslinasto zelena sa crnim centrom sa belim mrljama (Slika 10.).

Konidiofore su kratke. Broj horizontalnih septi u konidijama varira od 1 do 6, a vertikalnih od 0 do 2. Ovo su morfološke karakteristike konidiofora i konidija po kojima se identifikuje ova vrsta.



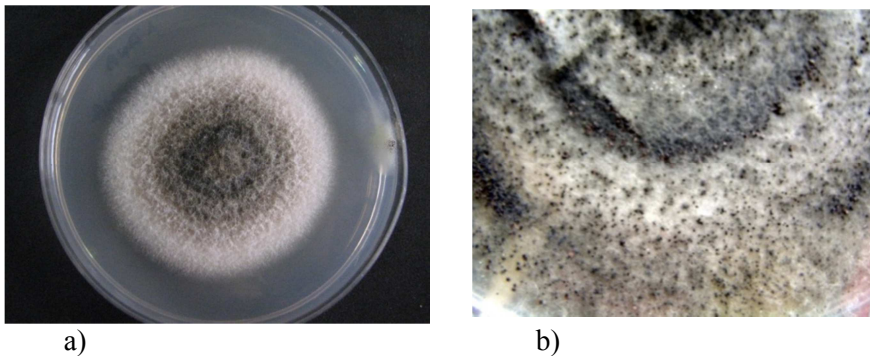
Slika 10. *Alternaria tenuissima* - izgled vazdušne micelije izolata sa koprive

4.1.3. Rod *Phoma*

Vrste ovog roda su filamentozne gljive, kosmopoliti, nastanjuju zemljište i česti su biljni patogeni. U ovim istraživanjima *Phoma* sp. determinisana je u uzorcima koprive i nane.

Kolonije roda *Phoma* rastu veoma brzo pri temperaturi 25°C, praškastog su ili baršunastog izgleda i velikim delom uronjene u medijum. Sa prednje strane boja kolonije je inicijalno bela čije središte postepeno tamni i postaje maslinasto siva do crna (Slika 11a.). Na poleđini, kolonija je tamno braon do crna. Neke vrste, posebno *Phoma cruris-hominis* i *Phoma herbarum*, proizvode crvenkasto-ružičaste do žućkasto-braon pigmente.

Mikroskopski su vidljive septirane hife, piknidije, konidije i hlamidospore koje se formiraju samo kod nekih vrsta. Hife su hijalinske do braon, a crne sferične piknidije su koncentrično raspoređene (Slika 11b.) i formiraju se nakon 10 dana. Konidije su jednoćelijske, hijalinske, dok samo pojedine vrste proizvode hlamidospore koje su jedno- ili višećelijske.



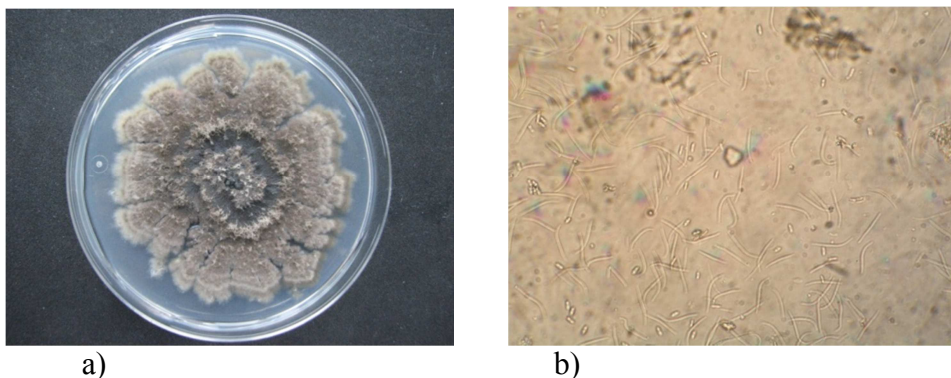
Slika 11. *Phoma* sp. – izolat sa koprive, izgled: a) vazdušne micelije i b) piknidija

4.1.4. Rod *Phomopsis*

Široko rasprostranjen rod, poznat kao patogen raznih biljaka npr. suncokreta i kruški (Živković *et al.*, 2007), u našem radu izolovan sa listova nane. Gljiva ne poseduje kutinaze, dakle ni sposobnost da prodre kroz intaktnu kutikulu, već je neophodna rana na biljci da bi u nju prodrila. Bolesti izazvane ovom gljivom su retko viđene na zelenom voću u polju, uobičajenije je na voću koje je potpuno sazrelo. Podaci ukazuju da vrste ovog roda mogu uzrokovati truljenje voća nakon berbe, posebno na oštećenom voću (Luongo *et al.*, 2011).

Brzo razvija vunastu ili pamučastu miceliju koja je inicijalno bela i postepeno se pretvara u svetlo sivu ili svetlo braon boju na PDA podlozi (Slika 12a.).

Piknidije se formiraju na PDA podlozi pod kontinualnim fluorescentnim svetlom u roku od tri nedelje i gljiva sporuliše jednu do dve nedelje kasnije. Konidije su srpaste, jednoćelijske, tzv., β -konidije a α -konidije su ovalne (Slika 12b.).



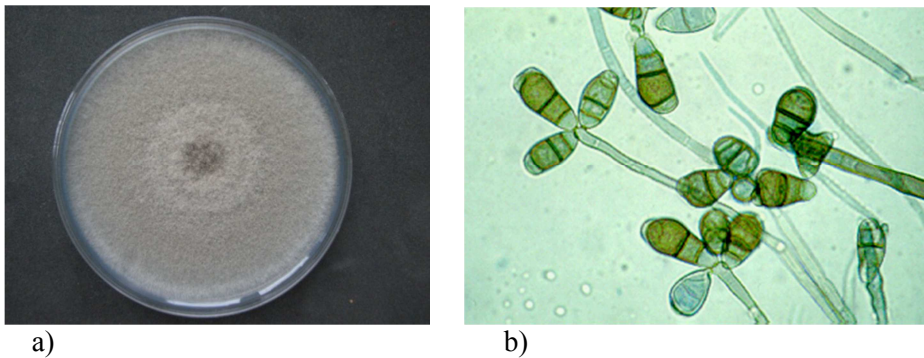
Slika 12. *Phomopsis* sp. – izolat sa koprive, izgled: a) vazdušne micelije i b) α - i β - konidija (veličanje 400 \times)

4.1.5. *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn

Vrste roda *Curvularia* su uglavnom subtropski i tropski biljni paraziti, mada ima i predstavnika koji su svuda rasprostranjeni (*Curvularia lunata*, *C. pallescens* i *C. geniculata*). *C. lunata* je najčešća vsta ovog roda, široko rasprostranjena na različitim usevima; česta je na podovima, u prašini dušeka, tapetama i obojenim zidovima.

Izolovana je sa listova nane. Produkuje veoma brzo vunaste kolonije na temperaturi od 25°C na PDA podlozi. Kolonije su bele boje do ružičasto-sive na početku a zatim prelaze u maslinasto-braon ili crnu, kako kolonije sazrevaju (Slika 13a.). Na zadnjoj strani je tamno braon do crne boje.

Konidije su svetlo braon sa tri ili više transverzalnih septi, cilindrične ili blago zakrivljene, sa jednom centralnom ćelijom koja je veća i tamnija (Slika 13b.).



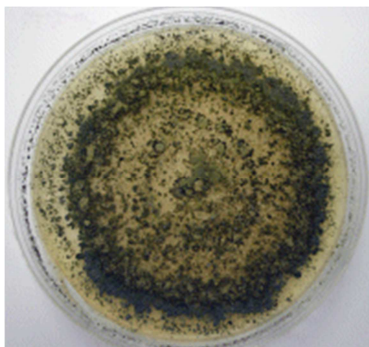
Slika 13. *Curvularia lunata* – izolati sa nane, izgled: a) vazdušne micelije i b) konidija (uveličanje 400 ×)

4.1.6. *Trichoderma viride* Persoon C.H.

Trichoderma je jedan od najrasprostranjenijih zemljišnih rodova gljiva, uglavnom je neškodljivi saprofit, mada postoji izvestan broj biljnih patogena. U vlažnim kućama izolovana je iz vazduha i prašine, mada se može naći na tapetama i na pločicama. Može da sintetiše više različitih litičkih enzima uključujući celulaze i hitinaze, te zbog toga vrste ovog roda mogu živeti direktno na drvetu, parazitirati na gljivama, a i jedan je od prvih kolonizatora stelje. Čest je uzročnik postžetvenog truljenja različitih biljnih vrsta, voća i povrća.

T. viride ima karakterističan širok rast, dostiže 7 cm za 5 dana, pri 25°C. Izolovana je sa listova nane. Kolonije su beličaste do svetlo zelene, poleđina je svetla ili žućkasta (Slika 14.). Konidiofore su obilno granate i često formiraju koncentrične krugove.

Fijalide su tipično uvećane (proširene) u sredini, mogu biti cilindrične ili približno okrugle. Konidije se formiraju za nedelju dana, zelene, žute ili ređe bele. Konidije su kod većine vrsta elipsoidne.



Slika 14. *Trichoderma viride* – izgled vazdušne micelije izolata sa nane

4.1.7. Rod *Aspergillus*

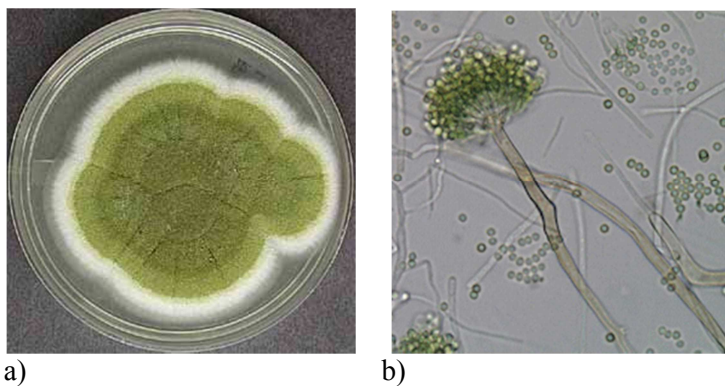
Aspergillus flavus i *Aspergillus niger* su predstavnici ovog roda koji su, uz predstavnike roda *Fusarium*, najčešće izolovani iz svih uzoraka biljnih droga, sem cvetova nevena. Prema literaturnim podacima, ove dve vrste su, uz pojedine predstavnike roda *Penicillium*, dominantni kontaminanti uzoraka lekovitog i začinskog bilja (Bugno *et al.*, 2006). Prisustvo vrsta *Aspergillus* i *Penicillium* na biljnim drogama može značiti da su biljke kontaminirane pre kompletnog sušenja.

4.1.7.1. *Aspergillus flavus* Link H.F.

A. flavus je u ovom radu izolovana i identifikovana iz uzoraka nane, kukuruzne svile i rastavića. Ima široko rasprostranjenje i normalno se pojavljuje kao saprofit u zemlji i na raznim oblicima organskih materija u raspadanju, na hrani, drvetu, pticama, pamuku, građevinskom materijalu i dr. Koristi se za proizvodnju različitih enzima, amilaze, keratinaze, lipaze i dr. Posедуje mogućnost razlaganja karboksimetil-celuloze i n-alkana.

Kolonije na PDA podlozi brzo rastu, maslinaste su do limun zelene sa krem naličjem; sa starenjem postaju tamno žuto-zelene (Slika 15a.). Vunaste ili pamučne je teksture, ponekad granularne. Sklerocija, kada je prisutna, je najpre bele, kasnije braon-crne boje.

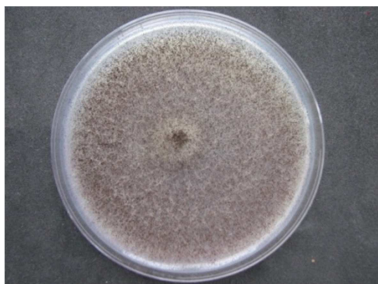
Hife su septirane i hijalinske, konidiofore su grubo hrapave, nebojene, loptaste; konidije su loptaste (Slika 15b.).



Slika 15. *Aspergillus flavus* - izolat sa rastavića, izgled: a) vazdušne micelije i b) konidija (uvećanje 400 ×)

4.1.7.2. *Aspergillus niger* Arthur de Cock

A. niger je jedna od najčešćih vrsta roda *Aspergillus* koja se veoma lako identifikuje i koja brzo raste na svim podlogama pri 25°C. Izolovana je sa svih biljnih droga osim nevena. Micelijum se sastoji od kompaktne bele ili žute osnove prekrivene gustim slojem tamno-braon do crnih glavica, konidijama (Slika 16.). Konidijalne glave su velike, loptaste, tamno braon. Konidiofore su glatkih zidova. Sklerocije su kremaste.



Slika 16. *Aspergillus niger* – izgled vazdušne micelije izolata sa koprive

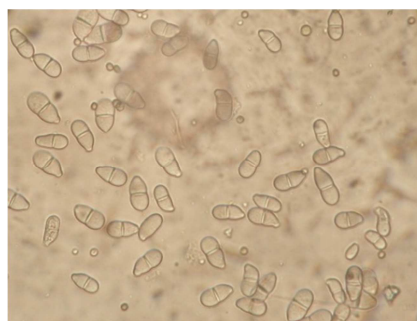
4.1.8. *Trichothecium roseum* Link H.F.

T. roseum je filamentozna gljiva rasprostranjena širom sveta i često se izoluje sa biljnog materijala koji truli, trulog voća, semenja, iz zemljišta, prehrambenih namirnica (posebno proizvoda od brašna). Gljiva je izolovana sa listova koprive.

Kolonije rastu umerenom brzinom na PDA pri 25°C, ravne su, prašnjavog izgleda (Slika 17a.). S prednje strane bele je boje u početku, sa sazrevanjem postaju bledo ružičaste do boje breskve, a pozadina je bleđa. Obrazuje hijalinske hife, konidiofore i konidije.



a)



b)

Slika 17. *Trichothecium roseum* – izolat sa koprive, izgled: a) vazdušne micelije i b) konidija (uveličanje 400 ×)

Konidiofore su duge i negranate, često septirane blizu osnove, manje ili više grubih zidova i nose cik-cak lance konidija na vrhu (apeksu). Konidije su dvoćelijske, elipsoidne, blago debelih zidova, hijalinske do svetlo obojene (Slika 17 b.).

4.1.9. *Verticillium dahliae* Klebahn

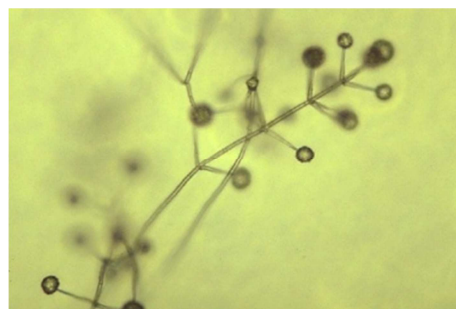
V. dahliae je široko rasprostranjena filamentozna gljiva koja nastanjuje zemlju i stelju. Izolovana je sa nane. *V. dahliae* ima širok spektar domaćina, preko 300 vrsta drvenastih i zeljastih biljnih vrsta je osetljivo na ovaj patogen. Veoma retko izazivaju bolesti kod ljudi.

V. dahliae pripada klasi gljiva koje nemaju seksualnu fazu. Na PDA podlozi, pri 25°C, vegetativni micelijum raste umereno brzo, baršunastog do vunastog je izgleda, bele do bledo žute boje, vremenom postaje ružičasto-braon, crven, zelen ili žut (Slika 18a.). Na poleđini je beo ili žut.

Konidiofore su obično dobro diferencirane, vertikalno razgranate sa vitkim, šilu nalik, fjalidama. Grananje konidiofora se javlja u nekoliko nivoa i nose fjalide koje su veoma duge. Svaka fjalida nosi masu konidija koje su svetle, jednoćelijske, pojedinačne ili u klasterima (Slika 18b.). Fjalide su specijalizovane hife formirane u spirali oko svake konidiofore. Rod *Verticillium* je dobio ime po spiralnom (pršljenastom) aranžmanu fjalida na konidioforama.



a)



b)

Slika 18. *Verticillium dahliae* – izolat sa nane, izgled: a) vazdušne micelije i b) konidiofora sa fjalidama (uveličanje 400 ×)

V. dahliae može da prezimi u vidu micelijuma u višegodišnjim biljkama, u biljnom otpadu. U zemlji može da preživi 10 godina i više u vidu tanke, crne, semenu

nalik, strukture tzv. mikrosklerocije, što predstavlja ogroman problem u kontroli ove gljive. Mikrosklerocije mogu da se razviju čak i na korenu mnogih rezistentnih biljaka a da ne izazovu simptome.

4.1.10. *Gliocladium roseum* Bainier

Vrste roda *Gliocladium* su rasprostranjene svuda po svetu i mogu se izolovati iz širokog spektra biljnog otpada i zemljišta. U našim ispitivanjima izolovana je *G. roseum* sa herbe i listova nane, kao i listova koprive.

Gliocladium roseum ima brzorastuće kolonije, paperjaste teksture, bele u početku, ponekad roze do losos tamne, postajući vremenom, sa sporulacijom, blede do tamno zelene (Slika 19.). Jedna od najvažnijih karakterističnih tvorevina roda je posebno izgrađene guste konidiofore sa fijalidama koje nose sluzave jednoćelijske konidije glatkih zidova.



Slika 19. *Gliocladium roseum* – izgled vazdušne micelije izolata sa koprive

4.1.11. *Myrothecium verrucaria* (Alb. & SCHwein.) Ditmar

M. verrucaria je najčešća vrsta roda *Myrothecium*. Prirodno stanište su pečurke, trava i zemljište. Izolovana je sa kukuruzne svile i herbe rastavića. Biljni je patogen i visoko potentni je razlagač celuloze.



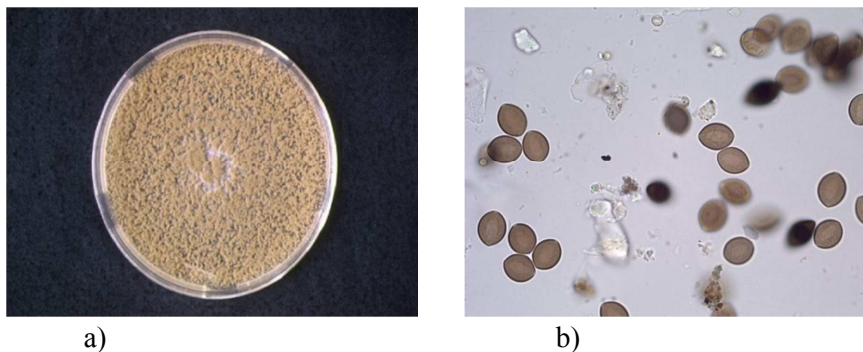
Slika 20. *Myrotechium verrucaria* - izgled vazdušne micelije izolata sa rastavića

U pitanju je spororastuća vrsta čiji je talus baršunasto beo sa zelenkasto crnim sporama (Slika 20.). Pozadina je žućkasta, kremkasta do ružičasta na periferiji. Fijalide su cilindrične, prikupljene u klustere od po 2 ili 6, konidije su maslinaste, jednoćelijske. Rast ove vrste blago modifikuje pH medijuma do 5.5.

4.1.12. Chaetomium sp. Lodha

Predstavnici roda *Chaetomium* su filamentozne gljive, kosmopolitski rasprostranjene, nastanjene na različitim supstratima koji sadrže celulozu, uključujući i papir i biljni kompost. Najčešće rastu u zemlji, semenju, celuloznim supstratima, đubrivu, drvenom i slamastom materijalu, ali i vazduhu. Izolovana je sa rastavića.

Rod *Chaetomium* ima nekoliko vrsta, najčešće su *C. atrobrunneum*, *C. funicola*, *C. globosum* i *C. strumarium*. Kolonije brzo rastu, u početku su pamučaste i bele boje, dok zrele kolonije postaju sive do maslinaste boje (Slika 21a.). Na poledini, boja je drap do crvena ili braon-crna. Hife su septirane, poseduju peritecije, askus i jednoćelijske askospore u obliku limuna (Slika 21b.) te se veoma lako identifikuju.



Slika 21. *Chaetomium* sp. – izolat sa rastavića, izgled: a) vazdušne micelije i b) askospora (uveličanje 400 ×)

4.1.13. Rod Penicillium

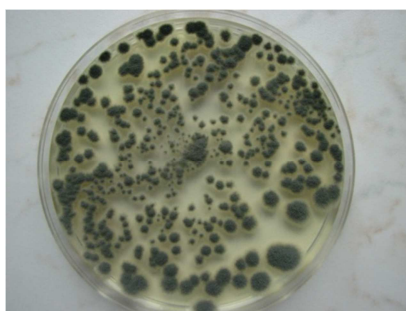
Vrste roda *Penicillium* izolovane su iz uzoraka kukuruzne svile, herbe i lista nane, kao i herbe rastavića. Vrste su rasprostranjene u zemljištu, najviše u zoni hladne i umerene klime, svuda gde je organski materijal dostupan.

Poznate kao plesni, vrste ovog roda su glavni uzročnici kvarenja hrane. Mnoge vrste mogu proizvoditi visoko toksične mikotoksine. Sposobnost *Penicillium* vrsta da rastu na semenima i uskladištenim namirnicama tj. hrani pripisuje se njihovoj mogućnosti da napreduju pri niskoj vlažnosti i da se brzo disperziju kroz vazdušni prostor dok su semena dovoljno vlažna (Pitt *et al.*, 2000).

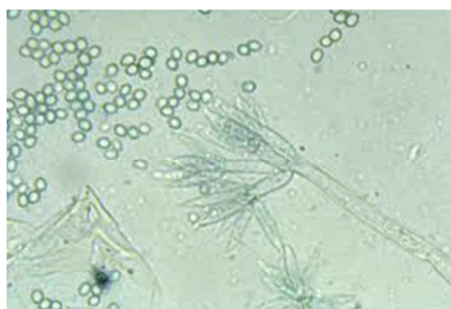
Penicillium vrste su prisutne i u vazduhu i prašini unutar stanova ili javnih zgrada. Mogu rasti čak i kad je vlažnost vadauha vrlo niska.

Micelija se tipično sastoji od vrlo razgranatih višejedarnih, septiranih, obično bezbojnih hifa. Razgranate konidiofore niču na miceliji noseći zelene konidiospore koje su glavni put rasprostranjena ove gljive (Slika 22a.). Seksulana reprodukcija podrazumeva produkciju askospora.

Mikroskopski, lanci jednoćelijskih konidija se razvijaju od specijalizovanih konidiogenih ćelija nazvanih fjalide. U ovim nizovima najmlađe konidije su na bazalnom ili proksimalnom kraju lanca. Kod vrsta roda *Penicillium* fjalide se mogu stvarati pojedinačno, u grupi ili formirati razgranate „metlice“ formirajući tvorevine nalik četki. Grananje može biti bilo jednostavno (negrante ili monovercilate); u jednom nivou (bivercilate-simetrično); grananje u dva nivoa (bivercilate-asimetrično); u tri i više nivoa. Konidiofore su hijalinske i mogu biti glatkih ili rapavih zidova. Fjalide se obično sastoje od cilindričnog bazalnog dela i posebog vrata. Konidije su loptaste ili cilindrične, hijalinske ili zelenkaste, glatkih ili rapavih ivica (Slika 22b.). Neke vrste mogu proizvoditi sklerocije.



a)



b)

Slika 22. *Penicillium* sp. – izolat sa herba rastavića, izgled: a) vazdušne micelije i b) konidiofora sa fjalidama i konidijama (uveličanje 400 ×)

4.2. Hemijski sastav i antifungalna aktivnost etarskih ulja

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju na obimnu i raznovrsnu mikopopulaciju izolovanu sa biljnih droga, nane, kukuruzne svile, rastavića, koprive i nevena, koje su se u ranijim istraživanjima pokazale kao droge sa najvišim stepenom kontaminacije fitopatogenim gljivama (Stević, 2009). Ovakvi rezultati ukazuju na potrebu pronalazjenja novih metoda dekontaminacije koje će biti uključene u sve segmente proizvodnje fitopreparata, počev od gajenja i žetve u polju, obrade, skladištenja, pakovanja i transporta. To mora biti u saglasnosti sa Kontrolom kvaliteta kritičnih tački, Dobrom poljoprivrednom i proizvođačkom praksom, kao i nacionalnim i/ili međunarodnim uputstvima za eliminaciju patogenih mikroorganizama, primenjivih u industriji.

Kao što je ranije rečeno, poslednjih godina povećano je interesovanje za zaštitom bilja preparatima prirodnog porekla tzv. agensima biološke kontrole u koje spadaju korisni mikroorganizmi ili produkti njihovog metabolizma, kao i biljni ekstrakti i etarska ulja.

Poznato je da etarska ulja mogu biti efikasna u suzbijanju gljiva na voću i povrću kao i neka hemijska sredstva (Bajpai and Kang, 2012). I pored navedenog, mali je broj radova objavljen o primeni etarskih ulja u zaštiti lekovitog bilja, a gotovo da ih i nema vezano za zaštitu suvih biljnih droga. U cilju ispitivanja mogućnosti primene etarskih ulja u biokontroli patogenih, zemljišnih ili postžetvenih, odnosno skladišnih gljiva, izolovanih i identifikovanih sa biljnih droga, ispitivan je antifungalni potencijal odabrana 22 etarska ulja. Prvo je određen kvalitativni i kvantitativni sastav svih etarskih ulja primenom GC-FID i GC-MS tehnika u cilju utvrđivanja uticaja hemijskog sastava na antifungalnu aktivnost etarskih ulja. Literaturni podaci ukazuju da pojedina jedinjenja etarskih ulja, kao na primer fenolna, utiču na ispoljavanje izuzetnog antifungalnog potencijala etarskih ulja u kojima su ista dominantna (Dikkbas *et al.*, 2008).

Za ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja korišćena je mikrodiluciona metoda kojom je određivana minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna fungicidna koncentracija (MFC) za svako od njih. Antifungalni potencijal etarskih ulja ispitivan je na 21 odabranoj gljivi. Od odabranih gljiva samo su predstavnici rodova

Aspergillus i *Penicillium* saprofitne gljive, dok su ostale tzv. *fitopatogene*, uzrokovajući različitih bolesti na biljkama.

U Tabeli 3. su date odabrane gljive izolovane i identifikovane sa biljnih droga u ovom radu. Navedene gljive odabrane su na osnovu učestalosti pojavljivanja na biljnim drogama, značajnosti oboljenja koje uzrokuju, mogućnosti sinteze mikotoksina, kao i brojnosti i veličini spora koje obrazuju, što olakšava *in vitro* ispitivanja.

Tabela 3. Odabrane gljive izolovane sa biljnih droga

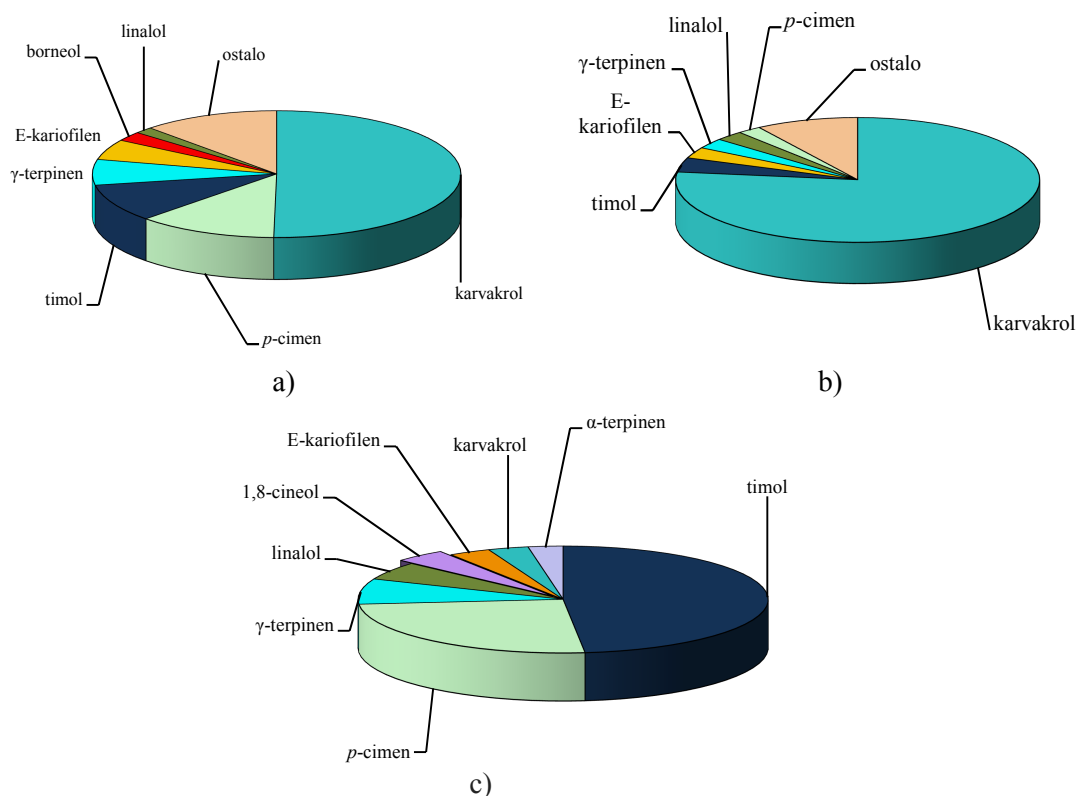
Gljive polja	<i>Fusarium solani</i> – herba rastavića <i>F. verticillioides</i> – cvetovi nevena <i>F. tricinctum</i> - herba rastavića <i>F. oxysporum</i> – cvetovi nevena <i>F. oxysporum</i> – kukuruzna svila <i>F. semitectum</i> - kukuruzna svila <i>F. subglutinans</i> - kukuruzna svila <i>F. equiseti</i> - herba rastavića <i>Alternaria alternata</i> - listovi i herba nane <i>Gliocladium roseum</i> – listovi koprive <i>Chaetomium</i> sp. - herba rastavića <i>Curvularia lunata</i> - listovi i herba nane <i>Myrothecium verrucaria</i> – kukuruzna svila <i>Trichoderma viride</i> - listovi i herba nane <i>Trichotecium roseum</i> – listovi koprive <i>Phoma</i> sp. – listovi koprive <i>Phomopsis</i> sp. – listovi nane <i>Verticillium dahliae</i> – listovi i herba nane
Skladišne gljive	<i>Aspergillus flavus</i> – herba rastavića <i>A. niger</i> – listovi koprive <i>Penicillium</i> sp. – cvetovi nevena

4.2.1. Etarska ulja čubra (*Satureja hortensis*), origana (*Origanum heracleoticum*) i timijana (*Thymus vulgaris*)

Kvalitativnom i kvantitativnom hemijskom analizom utvrđena je velika sličnost etarskog ulja čubra i origana, kao i ulja timijana. Kompletan kvalitativan i kvantitativan sastav etarskih ulja čubra, origana i timijana dat je u Prilogu 2. (Tabela 23).

Jedinjenja koja ulaze u sastav ova tri etarska ulja možemo podeliti na četiri grupe: 1) ugljovodonični monoterpeni, 2) oksidovani monoterpeni, 3) ugljovodonični seskviterpeni i 4) fenoli. Fenolna jedinjenja su dominantne komponente u ovim etarskim uljima, sa karvakrolom, odnosno timolom, kao predstavnicima za koje dokazana dobra antimikrobna aktivnost (Dikkbas *et al.*, 2008).

Dominantni predstavnik ugljovodoničnih monoterpena je *p*-cimen, od oksidovanih monoterpena je linalol, dok je β -kariofilen jedini seskviterpen ovih ulja. Udeo dominantnih komponenti u sva tri ulja prikazan je na Slici 23. Etarska ulja čubra i origana karakteriše ista dominantna komponenta, karvakrol sa različitim procentualnim udelom (50% u etarskom ulju čubra i 76% u etarskom ulju origana).



Slika 23. Udeo dominantnih komponenti u etarskim uljima: a) čubra, b) origana i c) timijana

Timol je, po procentualnom udelu, drugo važno fenolno jedinjenje u oba ulja (9,65% odnosno 3,71%)(Slika 23.).

Od 99,99% identifikovanih komponenti u etarskom ulju čubra, osim dominantnog karvakrola i timola, visokim procentualnim udelom izdvajaju se *p*-cimen (12,20%), γ -terpinen (6,50%), E-kariofilen (5,17%), a nešto manje borneol (2,41%) i linalol (1,63%). U etarskom ulju origana udeo ponutih terpenoidnih komponenti je nešto manji: *p*-cimen (2,11%), γ -terpinen (2,61%), E-kariofilen (2,76%), linalol (2,54%) i sa oko 1% β -pinen, 1,8-cineol i borneol.

U slučaju etarskog ulja timijana dominantna komponenta je timol sa 43,70% i njegov prekursor *p*-cimen, sa 23,22%. Sličnost sa prethodna dva ulja ogleda se u sadržaju manje zastupljenih komponenti: γ -terpinen (6,50%), linalol (4,95%), 1,8-cineol (3,71%), E-kariofilen (3,11%), karvakrol sa 2,95%. Za razliku od prethodna dva, u ulju timijana je, procentualno manje utvrđeno prisustvo α -terpinena (2,47%), kamfena (1,81%) i mircena (1,35%).

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. Ujednačenost delovanja, posebno etarskih ulja čubra i origana, ogleda se kroz sličnu osetljivost većine gljiva. Rast najvećeg broja testiranih gljiva inhibiran je istom koncentracijom, od 0,14 mg/ml. Ovo je MIC i etarskog ulja timijana za izvestan broj gljiva. Iz rezultata prikazanih u Tabeli 4. može se videti da nema značajnije razlike u MIC i MFC vrednostima, kao i da su sva tri etarska ulja bila efikasnija u inhibiciji rasta patogenih gljiva od komercijalnog antibiotika, flukonazola.

Analizirano pojedinačno, najveći antifunglani potencijal utvrđen je za etarsko ulja čubra. Iako ovo ulje ujednačeno deluje na testirane gljive, nešto veću osetljivost ispoljile su *F. oxysporum* (izolovan sa nevena) i *A. niger* za čiju je potpunu inhibiciju rasta neophodna najniža testirana koncentracija od 0,07 mg/ml. Veću tolerantnost na ovo ulje (MIC od 0,27 mg/ml) ispoljile su *A. flavus* i *F. sporotrichioides*, dok su najotpornije gljive bile *F. equiseti* (MIC 0,62 mg/ml) i *F. subglutinans* (0,95 mg/ml) (Tabela 4., Slika 24.).

Slično ulju čubra, ispitivanjem inhibitorne aktivnosti etarskog ulja origana, utvrđeno je da su koncentracija od 0,14 mg/ml, odnosno 0,28 mg/ml bile dovoljne za kompletnu inhibiciju rasta najvećeg broja testiranih gljiva (MIC ujednačen sa MFC). Najveću osetljivost na ulje origana ispoljio je, kao u slučaju etarskog ulja čubra, *F. oxysporum* ali izolovan sa kukuruzne svile, i *Phomopsis* sp. (MIC, kao i MFC je 0,07

mg/ml). Jedino odstupanje od ovako niskih inhibitornih vrednosti zabeleženo je za *F. subglutinans* koja je ujedno i najotpornija gljiva na etarsko ulje origana čija je potpuna inhibicija rasta ostvarena pri koncentraciji od 1,16 mg/ml.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da su testirane gljive ujednačeno osetljive na etarska ulja čubra i origana, odnosno da nema statistički značajne razlike u delovanju ovih ulja na sve gljive osim na *F. subglutinans* (Slika 24.) i *F. equiseti* u slučaju ulja čubra. Među testiranim gljivama, *F. oxysporum* je najosetljivija, a *F. subglutinans* najotpornija na oba etarska ulja.

Tabela 4. MIC i MFC vrednosti etarskih ulja (eu) čubra, origana i timijana (mg/ml)

Testirane gljive	eu čubra MIC	eu čubra MFC	eu origana MIC	eu origana MFC	eu timijana MIC	eu timijana MFC	flukonazol
<i>F. solani</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,16	0,20	1,8
<i>F. verticillioides</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	1,4
<i>F. tricinctum</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,19	0,24	0,8
<i>F. oxysporum</i> - neven	0,07	0,07	0,28	0,28	0,14	0,14	0,8
<i>F. oxysporum</i> - k.svila	0,14	0,14	0,07	0,07	0,14	0,14	0,8
<i>F. semitectum</i>	0,14	0,14	0,28	0,28	0,19	0,24	1,6
<i>F. subglutinans</i>	0,95	1,14	1,16	1,16	2,07	2,35	1,6
<i>F. sporotrichioides</i>	0,27	0,27	0,28	0,28	0,61	0,90	1,0
<i>F. equiseti</i>	0,62	0,91	0,28	0,28	0,98	0,98	1,0
<i>A. flavus</i>	0,27	0,27	0,14	0,14	1,18	1,18	1,0
<i>A. niger</i>	0,07	0,07	0,14	0,14	0,28	0,28	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	0,14	0,14	0,28	0,28	0,14	0,14	1,8
<i>A. alternata</i>	0,14	0,14	0,28	0,28	0,34	0,56	1,8
<i>Chaetomium</i> sp.	0,14	0,14	0,14	0,14	0,41	0,41	1,6
<i>G. roseum</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,34	0,34	2,0
<i>C. lunata</i>	0,14	0,14	0,28	0,28	0,17	0,19	0,6
<i>V. dahliae</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	1,0
<i>T. viride</i>	0,14	0,14	0,28	0,28	0,34	0,56	1,0
<i>T. roseum</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	2,0
<i>Phomopsis</i> sp.	0,14	0,14	0,07	0,07	0,21	0,21	0,8
<i>Phoma</i> sp.	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,16	0,8
<i>M. verrucaria</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,17	0,14	0,8

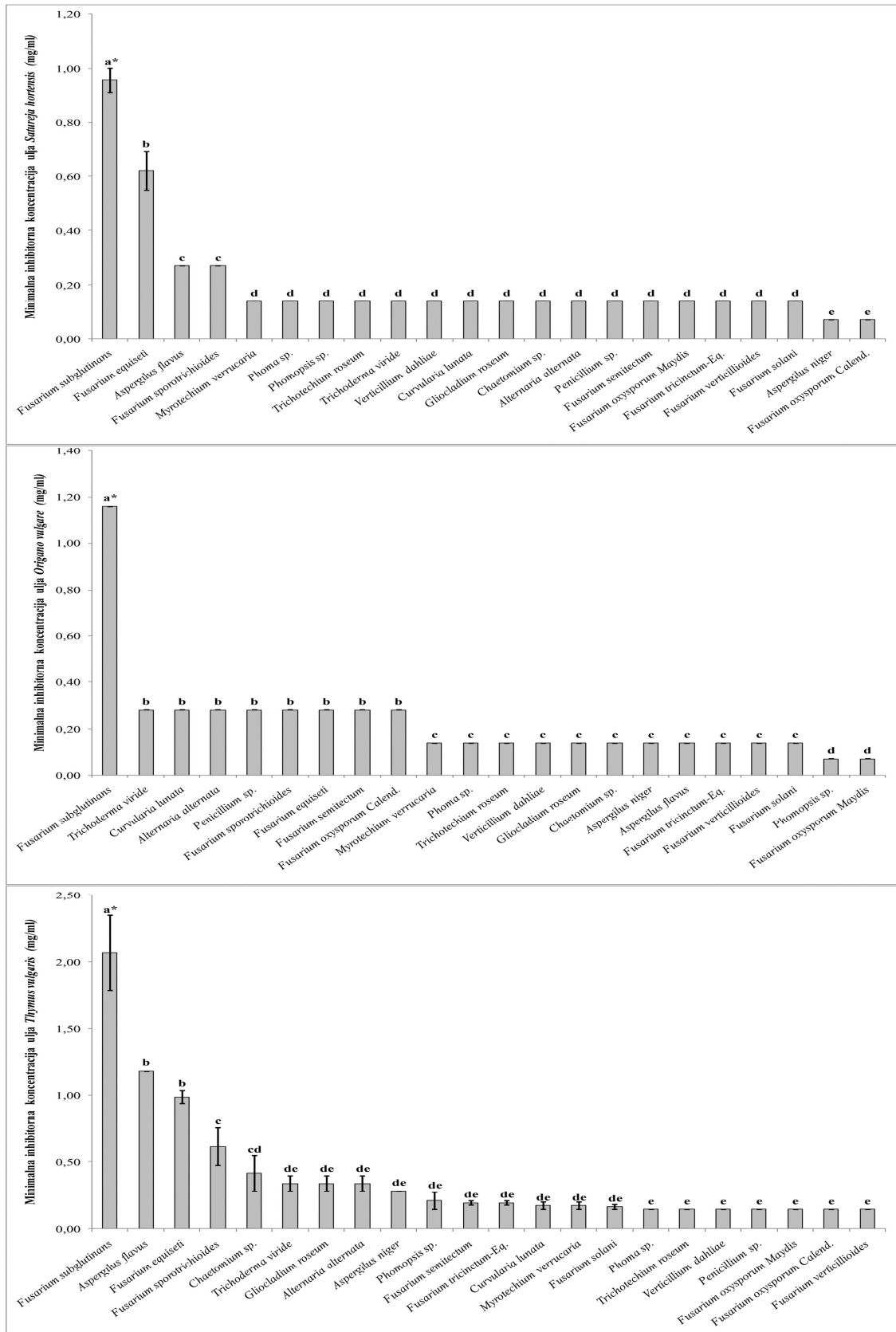
I etarsko ulje timijana ispoljilo je dobru antifungalnu aktivnost, nešto slabiju od ulja čubra i origana. Ovi rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima (Lee *et al*, 2007). U našem radu određeni broj gljiva jednako je osetljiv na ulje timijana, tj. njihova minimalna inhibitorna koncentracija iznosila je 0,14 mg/ml. Među vrstama roda *Fusarium*, to su *F. verticillioides* i *F. oxysporum* (izolovan sa nevena i kukuruzne svile), a od ostalih, *Penicillium* sp., *C. lunata*, *V. dahliae*, *T. roseum*, *Phoma* sp. i *M. verrucaria*. *F. solani* i *F. semitectum* su ispoljile neznatno manju osetljivost na ulje

timijana sa minimalnim inhibitornim koncentracijama od 0,16 do 0,19 mg/ml, kao i *F. sporotrichioides* (MIC iznosi 0,61 mg/ml). Za inhibiciju rasta *F. equiseti* i *A. flavus* potrebna je koncentracija ulja timijana od oko 1 mg/ml, a najmanju osetljivost ispoljio je *F. subglutinans*, za čiju je inhibiciju bila neophodna koncentracija od 2,07 (MIC) odnosno 2,35 mg/ml (MFC). Na osnovu ovih rezultata može se reći da je *F. subglutinans* najotpornija gljiva na sva tri etarska ulja. Statističkom analizom dobijenih rezultata (Slika 24.) može se reći da nema statistički značajne razlike u delovanju etarskog ulja timijana na testirane gljive osim na *F. subglutinans*, *F. equiseti* i *A. flavus*.

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*.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa brojnim literaturnim podacima koji ukazuju na to da ova etarska ulja ispoljavaju veoma jaku antifungalnu aktivnost na gotovo sve ispitivane gljive, često najjaču u odnosu na druga etarska ulja, kao i u našem ispitivanju (Hadizadeh *et al.*, 2009; Soković *et al.*, 2009; Arslan and Dervis, 2010).

Pokazano je da etarska ulja čubra, origana i timijana ispoljavaju izuzetno visoku antifungalnu aktivnost na fitopatogene gljive, kao i gljive uzrokovaoče kvarenja hrane, posebno na vrste roda *Aspergillus*, inhibirajući rast micelijuma pri niskim koncentracijama od 0,05 do 1 µl/ml, u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Dikkbas *et al.*, 2008; Ownagh *et al.*, 2010). Osim inhibicije rasta micelije, ulje origana i čubra inhibiraju germinaciju spora svih testiranih vrsta *Aspergillus* (ulje čubra i kod pojedinih vrsta roda *Penicillium*), a spore koje klijaju proizvode manje germinativnih tuba (rano rastuće hife) (Azaz, 2002; Carmo *et al.*, 2008). Smatra se da u ovoj aktivnosti dominantnu ulogu imaju fenolne komponente karvakrol i timol, ali doprinos imaju i druge komponente ovih ulja, kao npr. seskviterpeni (Dikkbas *et al.*, 2008).



Slika 24. MIC vrednosti etarskog ulja čubra (gore), origana (u sredini) i timijana (dole) (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega.

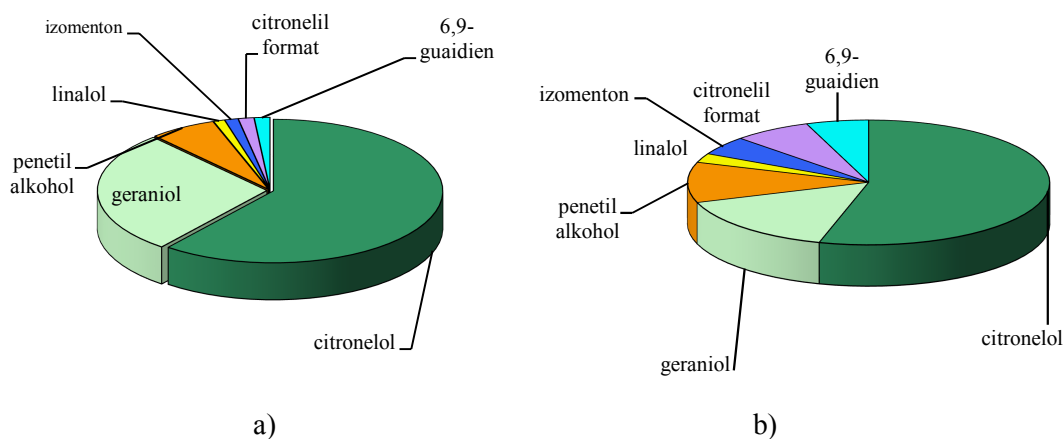
Po literaturnim podacima, ova tri etarska ulja efikasno inhibiraju sintezu različitih mikotoksina u *in vitro* ispitivanjima. Merenjem produkcije najpotentnijeg mikotoksina, aflatoksina, od strane mnogih *Aspergillus* vrsta, pokazano je da ulja inhibiraju 100% produkciju aflatoksina pri koncentraciji manjoj od 0,5 mg/ml (Kalemba and Kunicka, 2003). HPLC metodom pokazano je da su karvakrol i timol odgovorni za ovu inhibitornu aktivnost. Eksperimentalno je utvrđen značajan inhibitorni efekat ulja origana i na sintezu ohratoksina A od strane *A. ochraceus*, kao i fumonozina B1, mikotoksina *F. proliferatum* (Basílico and Basílico, 1999; Velluti *et al.*, 2005).

Posmatranjem pod transmisionim elektronskim mikroskopom nakon tretmana testiranih gljiva uljem timijana i origana uočena su veća oštećenja ćelijskog zida, prekidi u plazma membrani i razaranje mitohondrija (Rasooli and Owlia, 2005; Rasooli *et al.*, 2006). Povećanje koncentracije ulja uzrokuje curenje citoplazme iz micelijumskih ćelija, gubitak organela iz citoplazme, savijanje ovojnice jedra i tanjenje ćelijskog zida (Soylu *et al.*, 2005). Ovakva aktivnost ulja vezuje se sa njegova lipofilna svojstva i sposobnosti da penetriraju kroz plazma membranu. Promena propustljivosti ćelijske membrane obično je praćena gubitkom osmotske kontrole ćelije, što se smatra osnovnim principom antimikrobnog delovanja etarskih ulja (Soylu *et al.*, 2005).

Visoka antifungalna aktivnost ova tri ulja (karvakrol i timol tipa) objašnjava se visokim procentulanim udelom fenolnih komponenti kao i njihovih bioloških prekursora p-cimena i γ -terpinena (Rota *et al.*, 2007; Imelouane *et al.*, 2009). U istraživanjima Soković (2001) timol je, kao dominantna komponenta etarskog ulja timijana, pokazao identičan antifungalni potencijal kao i ukupno etarsko ulje timijana (MIC za timol 0,125-0,5 μ l/ml), dok je karvakrol, strukturni izomer timola, delovao jače na ispitivanje mikromicete sa MIC od 0,05 do 0,25 μ l/ml što ukazuje da obe fenolne komponente utiču na izrazit antifungalni potencijal ukupnog etarskog ulja. Nabigol and Morshedi (2011) su takođe utvrdili da je karvakrol bio aktivniji od timola u inhibiciji rasta fitopatogenih gljiva. Ovi podaci idu u prilog objašnjenju rezultata dobijenih u ovom radu, da su etarska ulja satireje i origana, bogatija karvakrolom, aktivnija u odnosu na etarsko ulje timijana.

4.2.2. Etarska ulja ruže (*Rosa damascena*) i zdravca (*Pelargonium graveolens*)

Analizom hemijskog sastava utvrđena je sličnost etarskog ulja ruže i etarskog ulja zdravca. Kompletan kvalitativan i kvantitativan sastav ovih ulja, određen primenom GC-FID i GC-MS tehnika, prikazan je u Prilogu 2 (Tabela 24). Etarska ulja ruže i zdravca karakterišu dve dominantne komponente, citronelol i geraniol, terpenoidni alkoholi sa dokazanom antifungalnom aktivnošću (Yeon-Suk *et al.*, 2008). Procentualni udeo oba jedinjenja je skoro dva puta veći u ružinom ulju nego u ulju zdravca: citronelol sa 51,26% u ružinom ulju u odnosu na 39,0% u ulju zdravca, a geraniol 25,84% u odnosu na 11,26% (Slika 25.). Među ostalim komponentama, u oba ulja ističu se procentualnim udelom penetil alkohol (6,05% odnosno 7,45%), linalol (1,16% odnosno 1,70%), izomenton (1,20% odnosno 3,48%), citronelil format (1,34% odnosno 5,08%) i 6,9-guaidien (1,39% odnosno 4,14%). U etarskom ulju zdravca značajniji još udeo geranil butanoata sa 4,81%. Pregled dominantnih komponenti prikazan je na Slici 25.



Slika 25. Udeo dominantnih komponenti u etarskim uljima: a) ruže i b) zdravca

Primenom mikrodilucione metode ispitan je antifungalni potencijal oba ulja. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 5. i na Slici 26. Oba ulja veoma su efikasna u inhibiciji rasta odabranih gljiva, znatno efikasnija od komercijalnog mikotika flukonazola, posebno etarsko ulje ruže. Najveći broj gljiva je ispoljio isti stepen

osetljivosti na ulje ruže tj. rast najvećeg broja gljiva bio je inhibiran sličnim koncentracijama od 0,19 do 0,33 mg/ml. To su *F. sporotrichioides*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *Penicillium* sp., *G. roseum*, *C. lunata*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. alternata* i *T. viride* (Tabela 5.).

Tabela 5. MIC i MFC vrednosti za etarsko ulje (eu) ruže i zdravca (mg/ml)

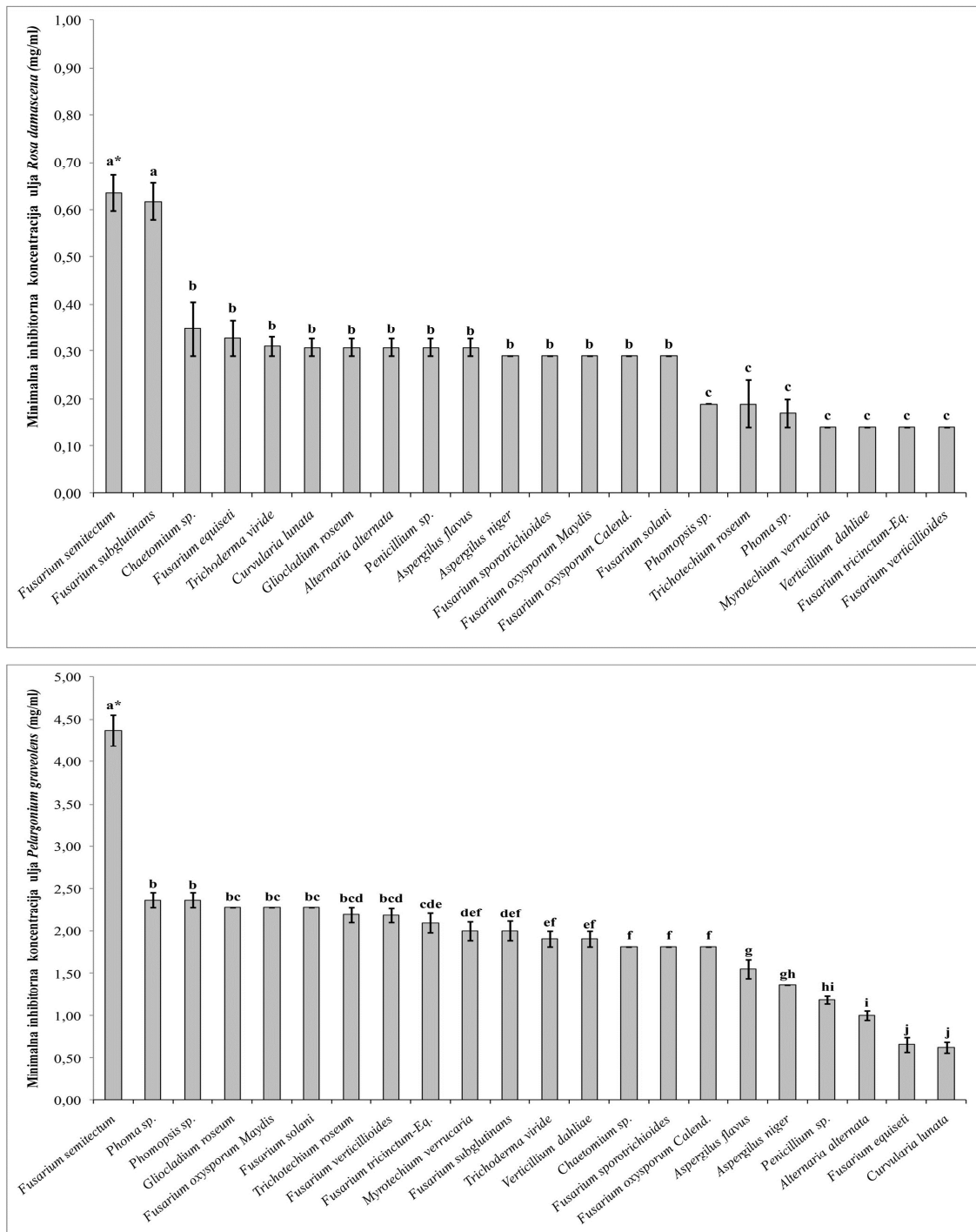
Testirane gljive	eu ruže MIC	eu ruže MFC	eu zdravca MIC	eu zdravca MFC	flukonazol
<i>F. solani</i>	0,29	0,29	2,28	2,28	1,8
<i>F. verticillioides</i>	0,14	0,14	1,91	2,28	1,4
<i>F. tricinctum</i>	0,14	0,14	2,09	2,28	0,8
<i>F. oxysporum</i> - neven	0,29	0,29	1,82	1,82	0,8
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	0,29	0,29	2,28	2,28	0,8
<i>F. semitectum</i>	0,64	0,77	4,4	4,55	1,6
<i>F. subglutinans</i>	0,62	0,77	2,00	2,28	1,6
<i>F. equiseti</i>	0,30	0,38	0,66	0,91	1,0
<i>F. sporotrichioides</i>	0,29	0,33	1,82	1,82	1,0
<i>A. flavus</i>	0,29	0,33	1,55	1,82	1,8
<i>A. niger</i>	0,29	0,29	1,37	1,37	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	0,31	0,31	1,18	1,37	1,8
<i>A. alternata</i>	0,31	0,38	1,00	1,14	1,6
<i>Chaetomium</i> sp.	0,35	0,38	1,82	1,82	2,0
<i>G. roseum</i>	0,31	0,31	2,28	2,28	0,6
<i>C. lunata</i>	0,31	0,31	0,62	0,73	1,0
<i>V. dahliae</i>	0,14	0,14	1,91	1,91	1,0
<i>T. viride</i>	0,31	0,38	1,90	2,28	2,0
<i>T. roseum</i>	0,18	0,18	2,20	2,20	0,8
<i>Phomopsis</i> sp.	0,19	0,19	2,37	2,73	0,8
<i>Phoma</i> sp.	0,17	0,17	2,37	2,37	0,8
<i>M. verrucaria</i>	0,14	0,14	2,11	2,3	0,8

Ulje ruže je najveću efikasnost ispoljilo na *F. verticillioides*, *F. tricinctum*, *V. dahliae* i *M. verrucaria* inhibirajući potpuno njihov rast pri najnižoj testiranoj koncentraciji od 0,14 mg. Nasuprot tome, najotpornije gljive bila su dva predstavnika roda *Fusarium*, *F. semitectum* i *F. subglutinans* izolovani sa kukuruzne svile za čiju inhibiciju je bila potrebna koncentracija od 0,6 mg/ml. Minimalne fungicidne koncentracije kojima je potpuno inhibiran rast pojedinih gljiva bile su neznatno veće od MIC vrednosti (videti u Tabeli 5.). Statističkom analizom rezultata antifungalnog dejstva ovog ulja pokazano je da statistički značajna razlika u delovanju ovog ulja postoji samo za *F. semitectum* i *F. subglutinans* (Slika 26.).

U skladu sa dobijenim rezultatima, koji potvrđuju izuzetnu antifungalnu aktivnost ulja ruže u odnosu na komercijalni antimikotik flukonazol, može se reći da

ovo ulje ima osobine koje ga preporučuju za dalje testiranje za primenu u biokontroli fitopatogenih gljiva. Značajan antifungalni potencijal etarskog ulja ruže može se pripisati visokom sadržaju citronelola i geraniola, monoterpenskim alkoholima, za koje je dokazan antifungalan potencijal kroz niz ranijih, *in vitro*, ispitivanja (Sun *et al.*, 2007; Yaouba *et al.*, 2010). Penetil alkohol, treća komponenta po procentualnom udelu u oba ulja (6,05% u ulju ruže i 7,45% u ulju zdravca) je u ranijim istraživanjima ispoljio slabu inhibitornu aktivnost na rast micelije, sporulaciju kao i germinaciju konidija *Penicillium italicum* (Li *et al.*, 2010).

I za etarsko ulje zdravca je utvrđena jaka inhibitorna aktivnost, ali za razliku od ulja ruže, testirane gljive su ispoljile različit stepen osjetljivosti na ovo ulje što se može videti iz rezultata prikazanih u Tabeli 5. i na Slici 26. Minimalne inhibitorne koncentracije za ulje zdravca kretale su se od 0,6 mg/ml do 4,4 mg/ml. Najosetljivije gljive na ovo ulje su *C. lunata* i *F. equiseti* za čiju je inhibiciju rasta potrebna koncentracija od 0,62 odnosno 0,67 mg/ml (MFC 0,91 i 0,73 mg/ml). Nešto manja osjetljivost utvrđena je za *A. alternata*, *Penicillium* sp., *A. niger* i *A. flavus* za koje je MIC vrednost od 1,0 mg/ml do 1,55 mg/ml. MIC i MFC za izvestan broj testiranih gljiva je isti, dok su za pojedine gljive MFC vrednosti bile neznatno veće. Rast ostalih gljiva (osim *F. semitectum*) inhibiran je sličnim koncentracijama ovog ulja, oko 2 mg/ml. *F. semitectum* je ispoljila najveću rezistentnost na etarsko ulje zdravca, kao i u slučaju ulja ruže. Koncentracijom od 4,4 mg/ml potpuno je inhibiran rast ove gljive izolovane sa kukuruzne svile.



Slika 26. MIC vrednosti etarskog ulja ruže (gore) i zdravca (dole) (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dinkanovom testu višestrukog opsega

Uporednom analizom aktivnosti etarskih ulja ruže i zdravca može se primetiti da je etarsko ulje ruže pri dvostruko nižim koncentracijama, inhibiralo rast testiranih gljiva, odnosno da je bilo dvostruko efikasnije od ulja zdravca, čak i više. Kao što se može

videti u Tabeli 5. i na Slici 26., najniža MIC vrednost za ulje zdravca je 0,6 mg/ml što je ujedno i najviša MIC vrednost za ulje ruže. Takođe, može se primetiti da sve gljive nisu podjednako osetljive na ova hemijski slična ulja. S jedne strane, nema statistički značajne razlike u delovanju etarskog ulja ruže na većinu gljiva, odnosno ovo ulje podjednako dobro inhibira rast gotovo svih testiranih ulja. Za razliku od ovog, postoji statistički značajna razlika u delovanju ulja zdravca na različite testirane gljive.

Rezultati naših istraživanja su u saglasnosti sa podacima Kalemba and Kunicka (2003), i Abo-El-Seoud and El-Tobgy (2010) prema kojima ulje zdravca ispoljava jaku antifungalnu aktivnost na rast micelijuma različitih fitopatogenih gljiva. Pored toga, potpuno inhibira sintezu aflatoksina B1 pri koncentraciji od 0,8 mg/ml.

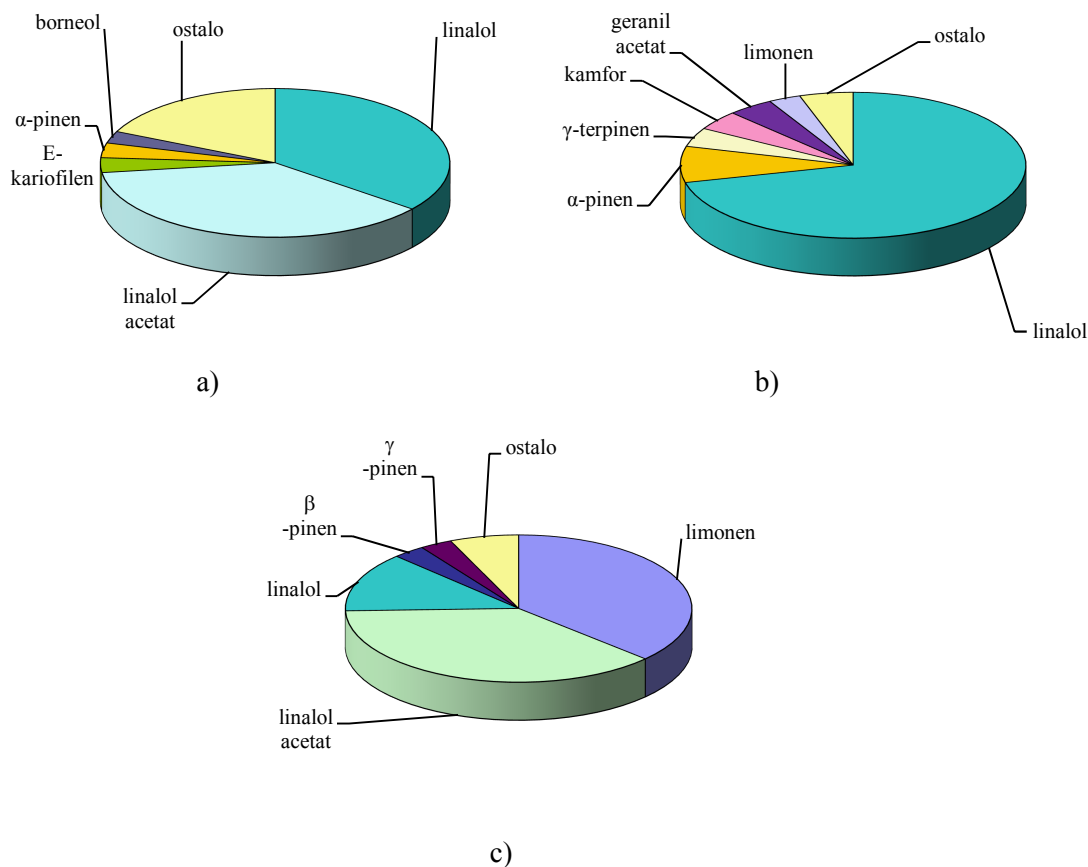
Sastav etarskog ulja, kao mešavine različitih jedinjenja, ja važan faktor koji utiče na antifungalnu aktivnost ulja. Koncentracija neke dominantne komponente određuje nivo aktivnosti ulja, ali i kombinacija većeg broja manje zastupljenih komponenti utiče na njihovu sinergističku aktivnost što dalje utiče na biološku aktivnost kompletnog ulja (Stanković *et al.*, 2011). Iako se ne može odbaciti pretpostavka da različite komponente prisutne u etarskom ulju ruže i zdravca imaju učešće u fungicidnoj aktivnosti kompletnog ulja, značajno veća aktivnost ružinog ulja od ulja zdravca, i njihova velika hemijska sličnost, ukazuje na to da verovatno dominantne komponente, citronelol i geraniol, u ovom slučaju imaju značajniju ulogu u fungicidnoj aktivnosti ovih ulja. Verovatno se u činjenici da su obe glavne komponente procentualno dvostruko više zastupljene u ulju ruže nego u ulju zdravca, može tražiti objašnjenje za bolju aktivnost ulja ruže u inhibiciji rasta testiranih fitopatogenih gljiva.

4.2.3. Etarska ulja lavande (*Lavandula angustifolia*), korijandera (*Coriandrum sativum*) i bergamota (*Citrus aurantium*)

Analiza hemijskog sastava etarskih ulja herbe lavande, korijandera i bergamota, ukazala je na izvesnu sličnost ova tri ulja. Kompletan sastav ovih ulja prikazan je u Prilogu 2 (Tabela 25).

Etarsko ulje korijandera karakteriše jedna dominantna komponenta, linalol sa 71,18%. U etarskom ulju lavande, linalol je procentualno podjednako zastupljen sa linalol acetatom (35% za linalol i 37% za linalol acetat). Etarsko ulje bergamota

karakterišu dve, podjednako zastupljene, komponente, limonen i linalol acetat sa po 37%, dok je linalol prisutan sa 13% (Slika 27.). Od ostalih jedinjenja, značajniji je udeo monoterpenskih ugljovodonika, α -pinena (sa 7,8 % u ulju korijandera i 3% u ulju lavande), γ -terpinen i kamfora sa po 4% u ulju korijandera, dok je u ulju bergamota γ -terpinen zastupljen sa 3%.



Slika 27. Udeo dominantnih komponenti u etarskim uljima: a) lavande, b) korijandera i c) bergamota

Među ove tri dominantne komponente, linalol je, u ranijim istraživanjima, pokazao najjaču antifungalnu aktivnost u mikrodilucionoj metodi, sa MIC vrednostima od 2-6 μ l/ml (Soković, 2001). U istim istraživanjima limonen je ispoljio umerenu do slabu antifungalnu aktivnost, blago višu od linalol acetata. Kako je linalol procentualno najzastupljeniji u etarskom ulju korijandera, očekivali smo da će ovo ulje ispoljiti najveću inhibitornu aktivnost na rast testiranih gljiva. Naši rezultati su pokazali da su testirane gljive generalno slično osetljive na sva tri ulja (sa manjim odstupanjima).

Rezultati antifungalne aktivnosti sva tri ulja izraženi kroz minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije (MIC) u mg/ml prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. MIC i MFC vrednosti za etarska ulja (eu) lavande, korijandera i bergamota (mg/ml)

Testirane gljive	eu lavande MIC	eu lavande MFC	eu korijandera MIC	eu korijandera MFC	eu bergamota MIC	eu bergamota MFC
<i>F. solani</i>	1,77	1,77	0,97	1,1	1,83	2,18
<i>F. verticillioides</i>	1,33	1,33	2,13	2,13	2,18	2,18
<i>F. tricinctum</i>	2,85	3,22	2,98	3,40	2,26	2,26
<i>F. oxysporum</i> - neven	1,15	1,15	1,96	2,13	2,69	3,05
<i>F. oxysporum</i> -k.svila	1,24	1,38	1,10	1,10	1,74	2,18
<i>F. semitectum</i>	4,60	4,60	4,25	4,25	3,04	3,48
<i>F. subglutinans</i>	6,80	7,36	3,40	3,40	3,5	3,92
<i>F. equiseti</i>	3,40	3,68	4,08	4,08	3,74	3,92
<i>F. sporotrichioides</i>	1,38	1,38	2,72	3,0	1,17	1,17
<i>A. flavus</i>	4,60	4,60	5,10	5,10	4,35	4,35
<i>A. niger</i>	3,04	3,22	1,23	1,23	2,0	2,2
<i>Penicillium</i> sp.	2,76	3,22	3,23	3,40	4,61	4,8
<i>A. alternata</i>	3,31	3,68	3,65	4,25	4,8	4,8
<i>Chaetomium</i> sp.	3,12	3,68	4,76	5,10	4,2	4,4
<i>G. roseum</i>	4,78	5,5	3,74	3,74	4,5	4,5
<i>C. lunata</i>	2,57	2,76	2,13	2,13	1,09	1,09
<i>V. dahliae</i>	2,30	2,30	1,76	1,76	1,04	1,04
<i>T. viride</i>	3,12	3,68	2,38	2,55	3,65	3,92
<i>T. roseum</i>	1,19	1,19	1,10	1,10	2,8	3,05
<i>Phomopsis</i> sp.	1,15	1,15	2,21	2,55	1,91	2,18
<i>Phoma</i> sp.	1,19	1,19	1,06	1,06	2,1	2,1
<i>M. verrucaria</i>	2,11	2,30	2,38	2,55	1,91	2,18

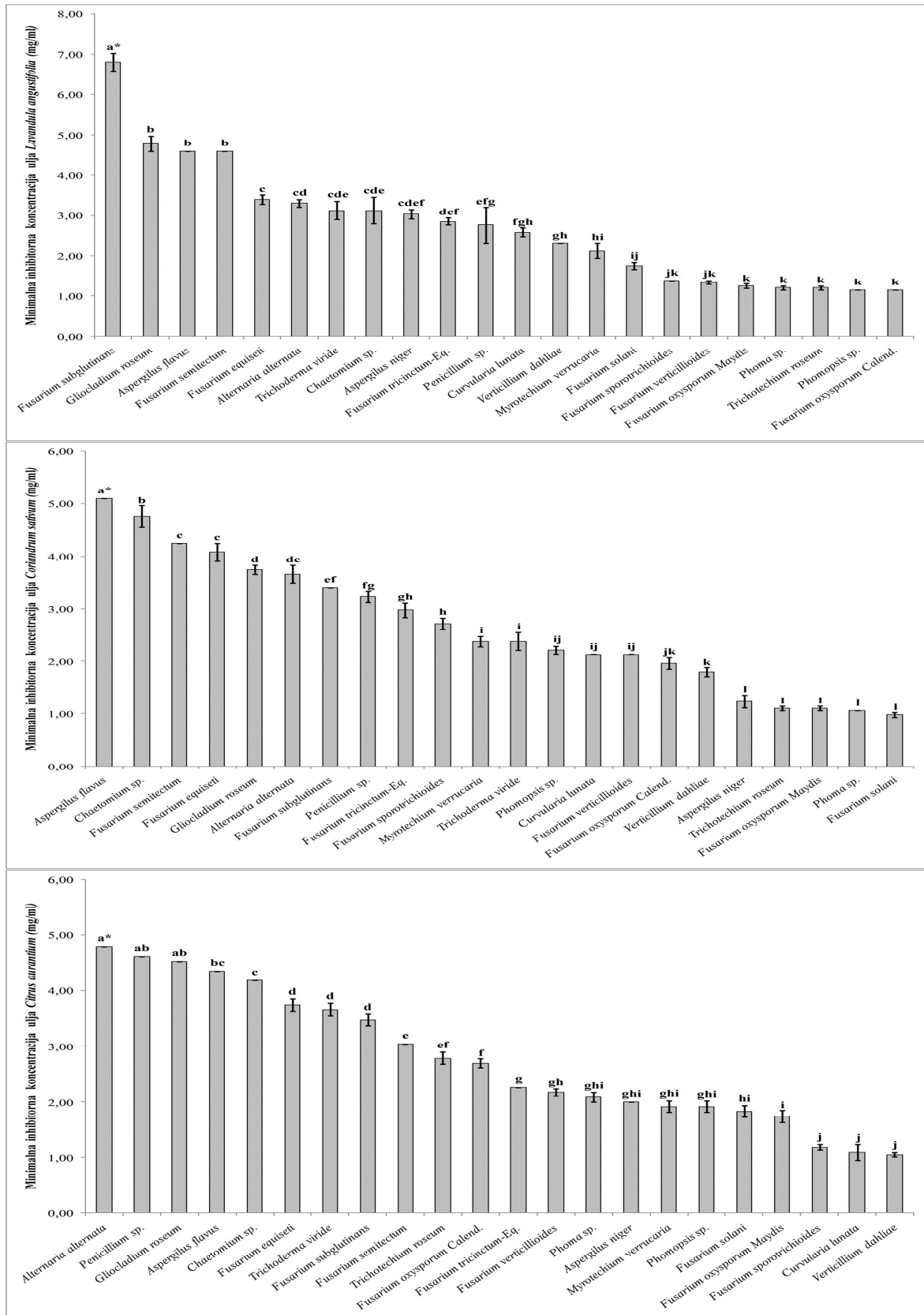
Minimalne inhibitorne koncentracije sva tri ulja bile su u opsegu od 1,1 do 4,8 mg/ml (MIC i MFC vrednosti) osim za *F. subglutinans* koja je ispoljila najveću otpornost na ulje lavande, za koju je zabeležena najveća MIC vrednost od 6,8 mg/ml. Iz rezultata prikazanih u Tabeli 6. može se videti da je *A. flavus*, potencijalni producent aflatoksina, takođe veoma otporna na sva tri ulja; neophodna je koncentracija od 4,3 mg/ml do 5,1 mg/ml sva tri ulja za potpunu inhibiciju ove skladišne plesni.

Etarsko ulje lavande je, ispoljilo neznatno veću antifungalnu aktivnost u odnosu na druga dva ulja. Najosetljivije gljive na ulje lavande su *F. oxysporum* (izolovan sa kukuruzne svile i nevena), *F. verticillioides*, *T. roseum*, *Phoma* sp. i *Phomopsis* sp. za čiju je inhibiciju bila dovoljna koncentracija od oko 1 mg/ml. Rast većeg broja testiranih gljiva inhibiran je koncentracijama oko 3 mg/ml. Najrezistentnije gljive na ulje lavande, osim pomenute *F. subglutinans*, su *A. flavus*, *F. semitectum* i *G. roseum* za

koje je koncentracija od 4,6 odnosno 4,8 mg/ml neophodna za inhibiciju rasta micelije (MFC vrednosti su neznatno veće, videti u Tabeli 6.). Visoka efikasnost etarskog ulja lavande pre se može objasniti interakcijama pojedinačnih komponenti, pre svega interakcijama linalil acetata i linalola, nego davati značaj nekoj od njih (Lis-Balchin, 1998). Prema ovom autoru i jedna i druga komponenta su bitne u određivanju antifungalnog potencijala ulja lavande i da deluju sinergistički.

Eksperimentalno je utvrđeno da je etarsko ulje lavande efikasnije u inhibiciji rasta tj. produžavanju germinativnih tuba i germinaciju konidija nekih vrsta gljiva nego na rast njihovih hifa (Cavanagh and Wilkinson, 2002; Soylu *et al.*, 2005). Takođe, pokazano je da ovo ulje uzrokuje degeneraciju hifa, remećenje citoplazmatične membrane, citoplazmatično pražnjenje i ćelijsku smrt (Soylu *et al.*, 2005; Zuzarte *et al.*, 2011). U sličnim ispitivanjima utvrđeno je da je linalol acetat u mogućnosti da suprimira formiranje spora, dok linalol ne inhibira proces sporulacije već ispoljava značajnu efikasnost u inhibiciji germinacije i rasta micelije.

U našim ispitivanjima, etarska ulja korijandera i bergamota su ispoljila nešto nižu, ali još uvek značajnu antifungalnu aktivnost na testirane biljne patogene gljive (Tabela 6. i Slika 28.). Najnižom koncentracijom, od oko 1 mg/ml etarsko ulje korijandera inhibiralo je rast *F. solani*, *F. oxysporum* (izolovan sa kukuruzne svile), *Phoma* sp., *T. roseum* i *A. niger*. Nasuprot njima, najveća koncentracija ovog ulja neophodna je za inhibiciju *A. flavus* (MIC i MFC su 5,1 mg/ml); blago osetljivija je *Chaetomium* sp. sa MIC od 4,6 mg/ml (MFC je neznatno viša, 5,1 mg/ml), kao i *F. semitectum* i *F. equiseti* čije su se MIC i MFC vrednosti kretale blago iznad 4 mg/ml. Dobijeni rezultati su u korelaciji sa istraživanjima El-Seoud and El-Tobgy (2010) koji su utvrdili visoku efikasnost ulja korijandera u kontroli fitopatogenih gljiva i sugerisali da se može koristiti u tretmanu semena i kao fumigans.



Slika 28. MIC vrednosti etarskih ulja lavande (gore), korijandera (u sredini) i bergamota (dole) (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega.

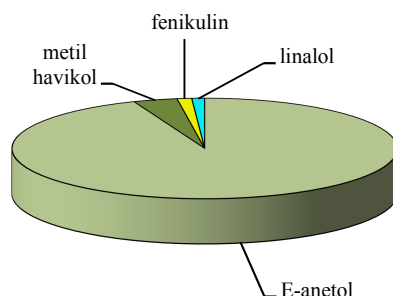
Etarsko ulje bergamota je ispoljilo najniži antifungalni potencijal među ova tri etarska ulja (Slika 28.). Čak pet testiranih gljiva (*A. flavus*, *A. alternata*, *Penicillium* sp., *Gliocladium roseum*, *Chaetomium* sp.) su pokazale veću tolerantnost na ovo ulje, sa MIC vrednostima preko 4 mg/ml. Najosetljivije su *C. lunata*, *V. dahliae* i *F. sporotrichioides* za koje je zabeležena najniža MIC vrednost od 1 mg/ml. Uz pomenute gljive, visoku osetljivost ispoljile su i *F. solani*, *F. oxysporum* (sa kukuruzne svile) i *Phoma* sp., slično kao i na etarska ulja lavande i korijandera (Tabela 6. i Slika 28.). Ispitivanja drugih istraživača su sugerisala da etarsko ulje bergamota ostvaruje antifungalna svojstva kroz redukciju rasta micelije i klijanje spora na gljivama izolovanih sa pirinča (Thobunluepop *et al.*, 2009).

Niži antifungalni potencijal etarskog ulja bergamota, u odnosu na druga dva ulja, može se delimično objasniti visokim sadržajem limonena i linalol acetata, monoterpenskih komponenti sa dokazanim niskim antifungalnim potencijalom. Iako niži, još uvek dobar, antifungalni potencijal ovog ulja verovatno se može pripisati prisustvu drugih, manje zastupljenih komponenti kao što su linalol (12,84%), β -pinen (3,00%) i γ -terpinen (3,06%), za koje je dokazana relativno dobra antifungalna aktivnost (Hammer *et al.*, 2003).

Komparativnom analizom sva tri ulja može se reći da su *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* i *C. lunata* ispoljile najveću osetljivost na sva tri ulja, dok je *A. flavus* najotporniji uz izvesna odstupanja u zavisnosti od ulja. Sa Slike 28. se može uočiti da postoje statistički značajne razlike u delovanju ova tri etarska ulja na različite testirane gljive.

4.2.4. Etarsko ulje ploda/semena anisa (*Illicum verum*)

U etarskom ulju ploda/semena anisa, primenom GC-FID i GC-MS tehnika, identifikovano je 14 komponenata, a samo četiri sa udelom većim od 1%. To su E-anetol, koji je sa 91,78%, dominantna komponenta, metil havikol (3,62%), fenikulin (1,20%) i linalol 1,05% (Slika 29). I prema Kosalec *et al.* (2005) ulje anisa sadrži uglavnom 80-95% *trans*-anetol, praćen metil havikolom i anisaldehydom. Kompletan kvalitativan i kvantitativan sastav etarskog ulja anisa prikazan je u Prilogu 2 (Tabela 26).



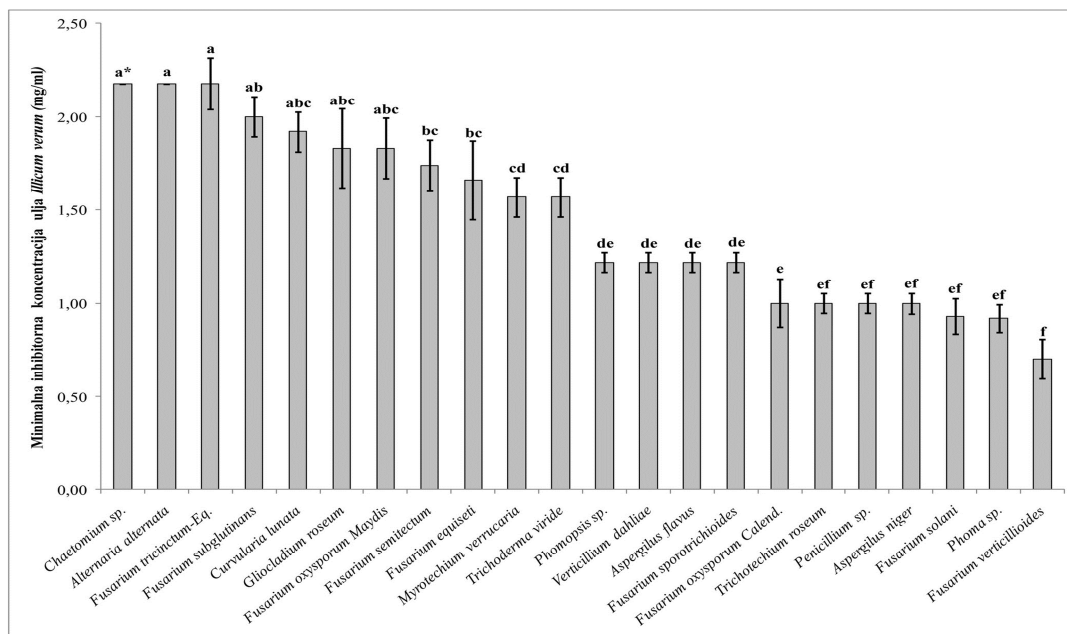
Slika 29. Udeo dominantnih komponenti u etarskom ulju anisa

Mikrodilucionom metodom utvrđen je visok antifungalni efekat etarskog ulja anisa na odabrane gljive izolovane sa biljnih droga. MIC i MFC vrednosti su se kretale od 0,7 mg/ml do 2,2 mg/ml (Tabela 7.). Najveću tolerantnost su ispoljile *F. tricinctum*, *A. alternata* i *Chaetomium* sp., dok su neznatno osetljivije *F. subglutinans*, *F. oxysporum* izolovan sa kukuruzne svile, *C. lunata* i *G. roseum* (MIC i MFC vrednosti oko 2,0 mg/ml). Najbolju inhibitornu aktivnost etarsko ulje anisa je ispoljilo na *F. verticillioides*, kao i *F. solani* i *Phoma* sp. čiji je rast inhibiran koncentracijama od 0,7 odnosno 0,9 mg/ml (Slika 30.). Za najveći broj testiranih gljiva minimalna inhibitorna koncentracija je bila između 1 i 2 mg/ml. Za pojedine testirane gljive MFC vrednosti su neznatno veće od MIC vrednosti (Tabela 7.).

Tabela 7. MIC i MFC vrednosti etarskog ulja anisa (mg/ml)

Testirane gljive	MIC	MFC	flukonazol
<i>F. solani</i>	0,93	1,1	1,8
<i>F. verticillioides</i>	0,7	0,9	1,4
<i>F. tricinctum</i>	2,18	2,18	0,8
<i>F. oxysporum</i> - neven	1,1	1,31	0,8
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	1,83	2,18	0,8
<i>F. semitectum</i>	1,74	1,74	1,6
<i>F. subglutinans</i>	2,00	2,18	1,6
<i>F. equiseti</i>	1,66	2,18	1,0
<i>F. sporotrichioides</i>	1,22	1,2	1,0
<i>A. flavus</i>	1,22	1,31	1,8
<i>A. niger</i>	1,00	1,00	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	1,00	1,0	1,8
<i>A. alternata</i>	2,18	2,18	1,6
<i>Chaetomium</i> sp.	2,18	2,18	2,0
<i>G. roseum</i>	1,83	2,18	0,6
<i>C. lunata</i>	1,92	1,9	1,0
<i>V. dahliae</i>	1,22	1,22	1,0
<i>T. viride</i>	1,57	1,74	2,0
<i>T. roseum</i>	1,00	1,0	0,8
<i>Phomopsis</i> sp.	1,22	1,31	0,8
<i>Phoma</i> sp.	0,92	1,1	0,8
<i>M. verrucaria</i>	1,6	1,74	0,8

Statističkom analizom dobijenih rezultata utvrđena je statički značajna razlika u delovanju ulja anisa na testirane gljive što se može videti na Slici 30.



Slika 30. MIC vrednosti etarskog ulja anisa (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega

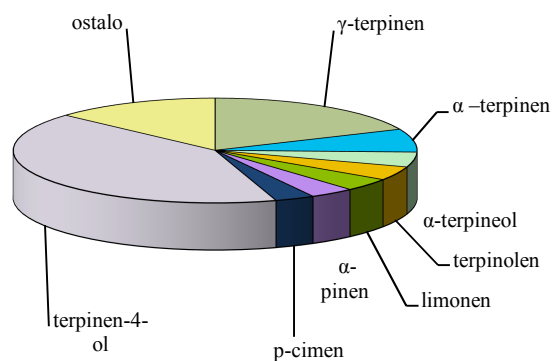
Prema ovoj analizi gljive su izdvojene u nekoliko grupa među kojima postoji statistički značajna razlika u inhibitornom delovanju ulja na rast fitopatogenih gljiva.

U ranijim ispitivanjima antibakterijske i antifungalne aktivnosti ulje anisa ispoljilo je snažan inhibitorni potencijal na bakterije, kvasce i dermatomicete, pri čemu je potpuno inhibiralo rast *Candida albicans* i *A. flavus*. Prema Soliman and Badea (2002), ovo ulje je kompletno inhibiralo *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* i *F. moniliforme* pri koncentraciji od ≤ 500 ppm. Kompletnija istraživanja Huang *et al.*, (2010) su ukazala da je etarsko ulje anisa, pri veoma niskim koncentracijama, inhibiralo rast 11 fitopatogenih gljiva (ID_{50} vrednosti su išle od 0,07 mg do 0,25 mg/ml). Isti autori su dokazali podjednaku efikasnost trans-anetola, dominantne komponente ovog ulja, u odnosu na testirane gljive; ID_{50} vrednosti su bile gotovo iste kao i za kompletno ulje. Ovi rezultati su ukazali da je za antifungalnu aktivnost ulja anisa odgovoran trans-anetol. Daljim ispitivanjem utvrđeno je da i etarsko ulje i anetol inhibiraju germinaciju spora ispitivanih gljiva.

Na osnovu ovih podataka može se pretpostaviti da je anetol, dominantna komponenta ulja anisa ispitivanog u ovom radu, odgovorna za njegov jak antifungalni potencijal.

4.2.5. Etarsko ulje lista čajnog drveta (*Melaleuca alternifolia*)

Prema dobijenim rezultatima kvalitativnog i kvantitativnog sastava ulja čajnog drveta može se reći da je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Straede *et al.*, 2007). Od 97,69% izolovanih jedinjenja, sa udelom od 40,66%, dominantnu komponentu predstavlja terpinen-4-ol. Od drugih komponenti ističu se: γ -terpinen sa 17,78%, α -terpinen (7,09%), α -terpineol (4,49%), terpinolen (4,16%), limonen (3,88%), α -pinen (3,48%), *p*-cimen (3,13%), E-kariofilen (2,69%), i nešto manje 1,8-cineol (1,87%), β -pinen (1,72%), mircen (1,50%). Ostale komponente su zastupljene sa manje od 1%. Kompletan kvalitativan i kvantitativan sastav etarskog ulja čajnog drveta prikazan je u Prilogu 2 (Tabela 27), dok je na Slici 31. prikazan udeo dominantnih komponenti.



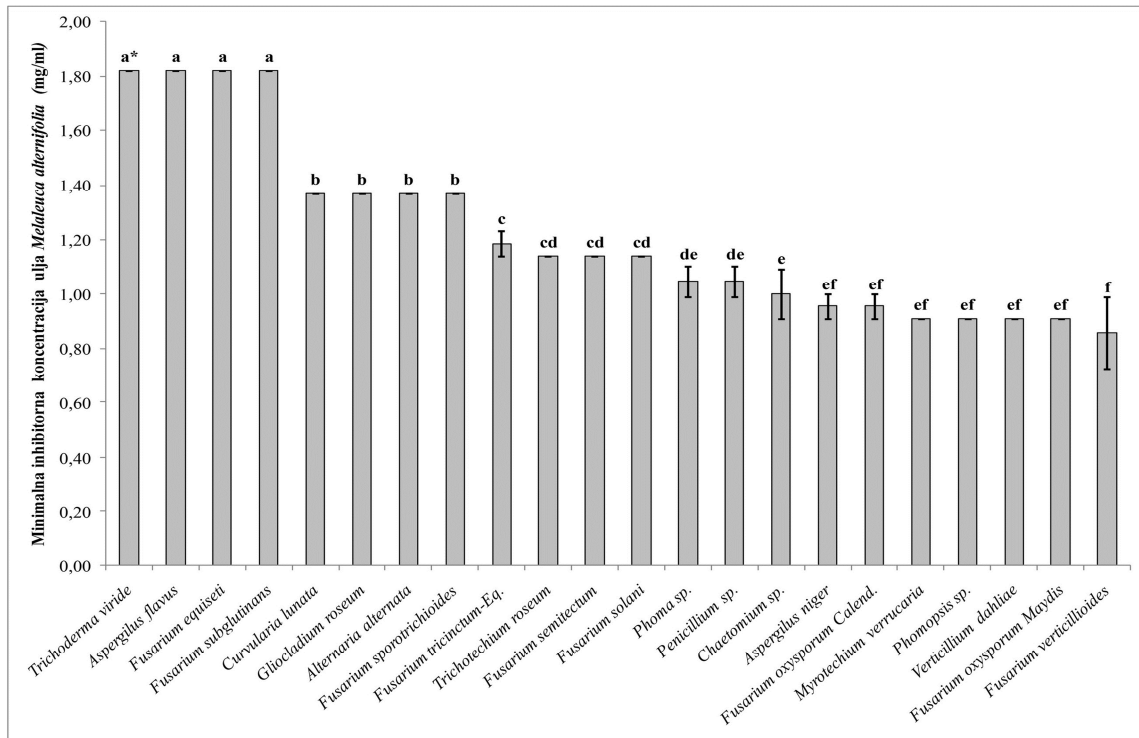
Slika 31. Udeo dominantnih komponenti u etarskom ulju čajnog drveta

Mikrodilucionom metodom utvrđena je veoma dobra antifungalna aktivnost etarskog ulja čajnog drveta pri čemu je prilično ujednačenim koncentracijama inhibiralo rast testiranih gljiva (Tabela 8., Slika 32.). Za najveći broj gljiva MIC i MFC vrednosti su oko 1 mg/ml. Najveća koncentracija, kojom je potpuno inhibiran rast *F. subglutinans*, *F. equiseti*, *A. flavus* i *T. viride*, je 1,8 mg/ml (MIC i MFC). *F. subglutinans* je i u ovom ispitivanju potvrđena kao jedna od otpornijih gljiva.

Tabela 8. MIC i MFC vrednosti za etarsko ulje čajnog drveta (mg/ml)

Testirane gljive	MIC	MFC	flukonazol
<i>F. solani</i>	1,14	1,4	1,8
<i>F. verticillioides</i>	0,86	1,14	1,4
<i>F. tricinctum</i>	1,18	1,4	0,8
<i>F. oxysporum</i> - neven	0,96	1,14	0,8
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	0,91	0,91	0,8
<i>F. semitectum</i>	1,14	1,14	1,6
<i>F. subglutinans</i>	1,82	1,82	1,6
<i>F. equiseti</i>	1,82	1,82	1,0
<i>F. sporotrichioides</i>	1,4	1,4	1,0
<i>A. flavus</i>	1,82	1,82	1,8
<i>A. niger</i>	0,96	1,14	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	1,05	1,14	1,8
<i>A. alternata</i>	1,4	1,4	1,6
<i>Chaetomium</i> sp.	1,0	1,4	2,0
<i>G. roseum</i>	1,4	1,4	0,6
<i>C. lunata</i>	1,4	1,4	1,0
<i>V. dahliae</i>	0,91	0,91	1,0
<i>T. viride</i>	1,82	1,82	2,0
<i>T. roseum</i>	1,14	1,14	0,8
<i>Phomopsis</i> sp.	0,91	0,91	0,8
<i>Phoma</i> sp.	1,05	1,14	0,8
<i>M. verrucaria</i>	0,91	0,91	0,8

Analizom rezultata utvrđeno je da se izdvaja nekoliko grupa testiranih gljiva među kojima postoji statistički značajna razlika u delovanju etarskog ulja čajnog drveta. Rezultati statističke analize antifungalne aktivnosti ovog ulja prikazani su na Slici 32.



Slika 32. MIC vrednosti etarskog ulja čajnog drveta (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega

I u drugim istraživanjima etarsko ulje čajnog drveta pokazalo je veoma jaku antifungalnu aktivnost, sa MIC koncentracijama i manjim od dobijenih u ovom radu. Prema Carson *et al.* (2006), najmanji MIC (od 0,008 do 0.4 % (v/v)) ovo ulje je ispoljilo na *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.* i *A. niger*. Dalja istraživanja ovih autora pokazuju da je fluidnost membrana ćelija tretiranih ovim uljem značajno povećana. Studije, u kojima je inhibirana ATPaza plazma membrane, su ukazale da su ovakve ćelije gljiva mnogo osjetljivije na etarsko ulje čajnog drveta od kontrolnih ćelija, što dalje sugeriše da ATPaza plazma membrane ima ulogu u zaštiti ćelija od destabilišućeg ili letalnog efekta ovog ulja (Carson *et al.*, 2006). Prema ovim autorima ulje čajnog drveta takođe inhibira formiranje germinativnih tuba.

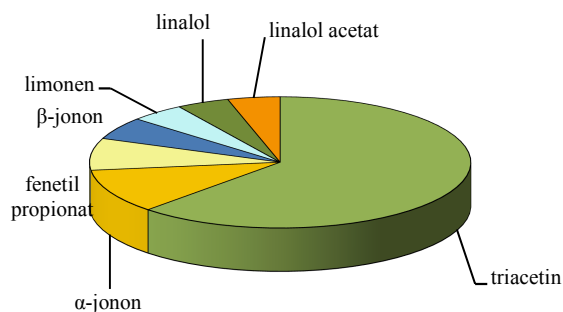
U *in vivo* ispitivanjima, Burgiel and Smagłowski (2008) su utvrdili da se prskanjem nevena (*Calendula officinalis* L.) ovim uljem redukuje razvoj pepelnica

(*Erysiphe* spp.). U upotrebi je preparat TimorexTM, koji sadrži 60% ulja čajnog drveta, koji se koristi u zaštiti paradajza od infekcija izazvanim gljivama iz roda *Phytophthora* i *Alternaria* (Sobolewski *et al.*, 2006; Abbo *et al.*, 2009).

Smatra se da je visok antifungalni potencijal etarskog ulja čajnog drveta posledica visokog sadržaja terpinen-4-ola, monoterpenskog alkohola, koji je u ranijim istraživanjima pokazao veoma dobru antifungalnu aktivnost na vrste roda *Aspergillus* i *Penicillium* (Hammer *et al.*, 2003). Na antifungalnu aktivnost ovog ulja verovatno imaju uticaj i monociklični terpeni γ -terpinen, α -terpinen, terpinolen koji su u istraživanjima (Dorman and Deans, 2000) bili manje aktivni od kompletnog ulja čajnog drveta.

4.2.6. Etarsko ulje ljubičice (*Viola odorata*)

U etarskom ulju ljubičice identifikovano je 33 komponente što predstavlja 99,03% ulja. Dominantna komponenta je triacetin sa 53,74%, a uz nju značajnije prisustvo zabeleženo je za α -jonon (9,38%), fenetil propionat (6,84%), β -jonon (4,78%), limonen (4,03%), linalol (3,86%) i linalol acetat (3,84%). Rezultati kompletne hemijske analize etarskog ulja ljubičice prikazani su u Prilogu 2 (Tabela 28.), dok je na Slici 33. predstavljen udeo dominantnih komponenti.



Slika 33. Udeo dominantnih komponenti u etarskom ulju ljubičice

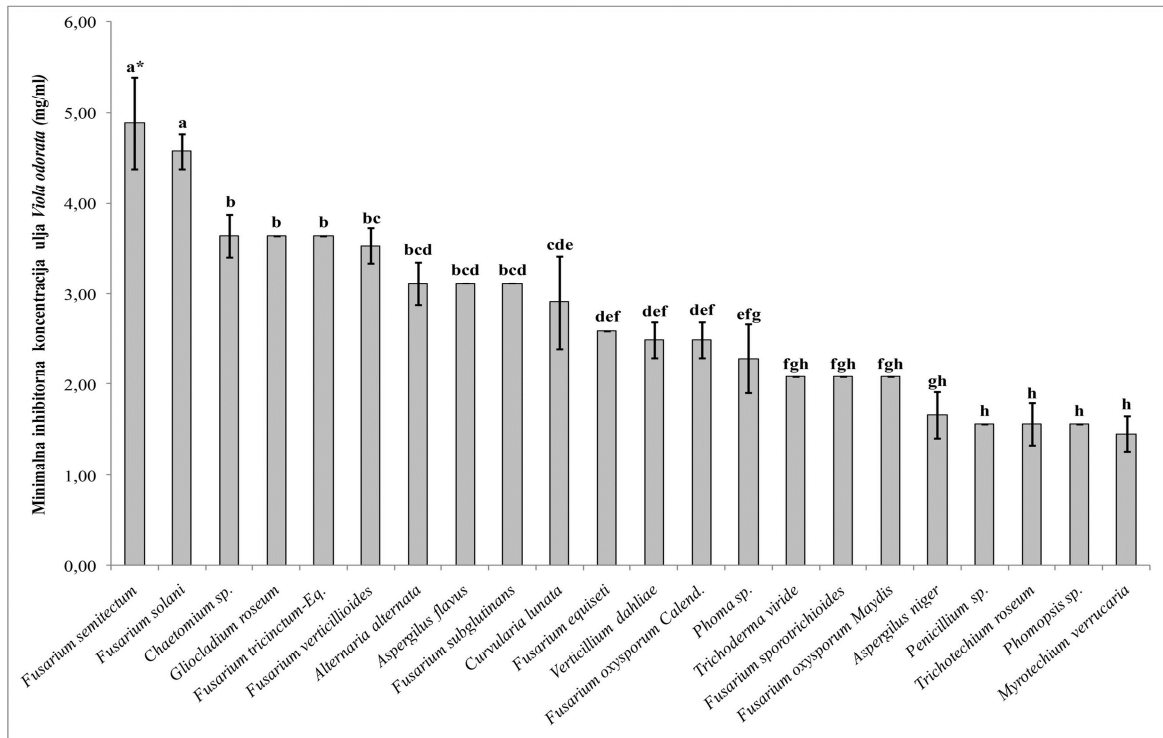
Etarsko ulje ljubičice ispoljilo je dobar antifungalni potencijal uglavnom na sve testirane fitopatogene gljive, što se, verovatno, može pripisati visokom udelu triacetina. Najotpornije su bile *F. solani* i *F. semitectum* sa MIC od 4,6 mg/ml, odnosno 4,8 mg/ml i MFC od 5,2 mg/ml. Nešto veća osetljivost utvrđena je za *F. tricinctum*, *G. roseum* i

Chaetomium sp. za čiju inhibiciju je potrebna koncentracija od 3,64 mg/ml, kao i *F. verticillioides* sa MIC od 3,53 mg/ml. Najnižom MIC (ujedno i MFC) vrednošću od 1,45 mg/ml inhibiran je rast *M. verrucaria* (Tabela 9.). Visoka osetljivost na ulje ljubičice utvrđena je i za *A. niger*, *Penicillium* sp., *T. roseum*, *Phomopsis* sp. sa MIC od 1,56 mg/ml i neznatno većim MFC vrednostima za pojedine gljive. Ostale gljive ujednačenije su reagovale na testirano ulje sa MIC vrednostima između 2 i 3 mg/ml.

Tabela 9. MIC i MFC vrednosti za etarsko ulje ljubičice (mg/ml)

Testirane gljive	MIC	MFC	flukonazol
<i>F. solani</i>	4,6	5,20	1,8
<i>F. verticillioides</i>	3,53	4,16	1,4
<i>F. tricinctum</i>	3,64	3,64	0,8
<i>F. oxysporum</i> - neven	2,5	2,5	0,8
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	2,08	2,08	0,8
<i>F. semitectum</i>	4,88	5,20	1,6
<i>F. subglutinans</i>	3,12	3,12	1,6
<i>F. equiseti</i>	2,60	2,60	1,0
<i>F. sporotrichioides</i>	2,08	2,08	1,0
<i>A. flavus</i>	3,12	3,12	1,8
<i>A. niger</i>	1,66	2,08	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	1,56	1,56	1,8
<i>A.alternata</i>	3,12	3,64	1,6
<i>Chaetomium</i> sp.	3,64	4,16	2,0
<i>G. roseum</i>	3,64	3,64	0,6
<i>C. lunata</i>	2,91	4,16	1,0
<i>V. dahliae</i>	2,5	3,12	1,0
<i>T. viride</i>	2,08	2,08	2,0
<i>T. roseum</i>	1,56	2,08	0,8
<i>Phomopsis</i> sp.	1,56	1,56	0,8
<i>Phoma</i> sp.	2,28	3,12	0,8
<i>M. verrucaria</i>	1,45	1,45	0,8

Sa Slike 34. se može videti da se testirane gljive mogu podeliti u nekoliko grupa između kojih postoji statistička značajna razlika u stepenu antifungalnog efekta ulja ljubičice.

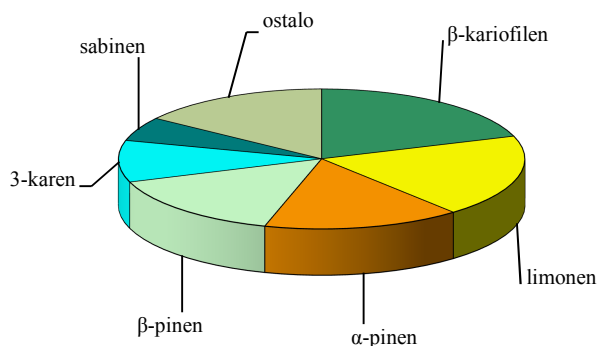


Slika 34. MIC vrednosti etarskog ulja ljubičice (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega

Prema literaturnim podacima, komponente sa većinskim procentualnim udelom u ovom ulju, ispoljavaju, ispitivane pojedinačno, značajnu antifungalnu aktivnost, te utiču na aktivnost kompletnog ulja. Glavna komponenta, triacetin, ili glicerol triacetat, sa 53,74%, je triestar sa dokazanim antifungalnim svojstvima koji se koristi kao lek u tretmanu površinskih gljivičnih infekcija kože kao što su gljivične infekcije noktiju, atletsko stopalo, impetigo i dr. (Gennaro, 1990). Osim triacetina i za karbonilne komponente, α - i β -jonon, prisutni u našem ulju sa 9,38 odnosno 4,78%, postoje podaci o antifungalnoj aktivnosti (Lalko *et al.*, 2007).

4.2.7. Etarsko ulje crnog bibera (*Piper nigrum*)

U etarskom ulju crnog bibera identificovano je 99,61% sastava ulja. Seskviterpen β -kariofilen (sinonim E-kariofilen) sa 19,44% i limonen sa 18,75% su dominantni, uz α -pinen i β -pinen (sa 15,49 odnosno 14,87%). Nešto manje su zastupljeni 3-karen (9,54%), sabinen (5,48%), α -felandren (2,84%), *p*-cimen (1,47%) i mircen (1,06%) od monoterpena, a od seskviterpena α -kopaen (1,86%) i δ -elemen sa (1,12%). Rezultati kompletne kvantitativne i kvalitativne analize etarskog ulja crnog bibera prikazani su Prilogu 2 (Tabela 29.). Na Slici 35. predstavljen je udeo dominantnih komponenti.



Slika 35. Udeo dominantnih komponenti u etarskom ulju crnog bibera

Rezultati drugih istraživanja ukazuju na sličan sastav pojedinačnih komponenti etarskog ulja bibera samo u drugačijem odnosu tj. procentualnom udelu (Raju and Maridas, 2011).

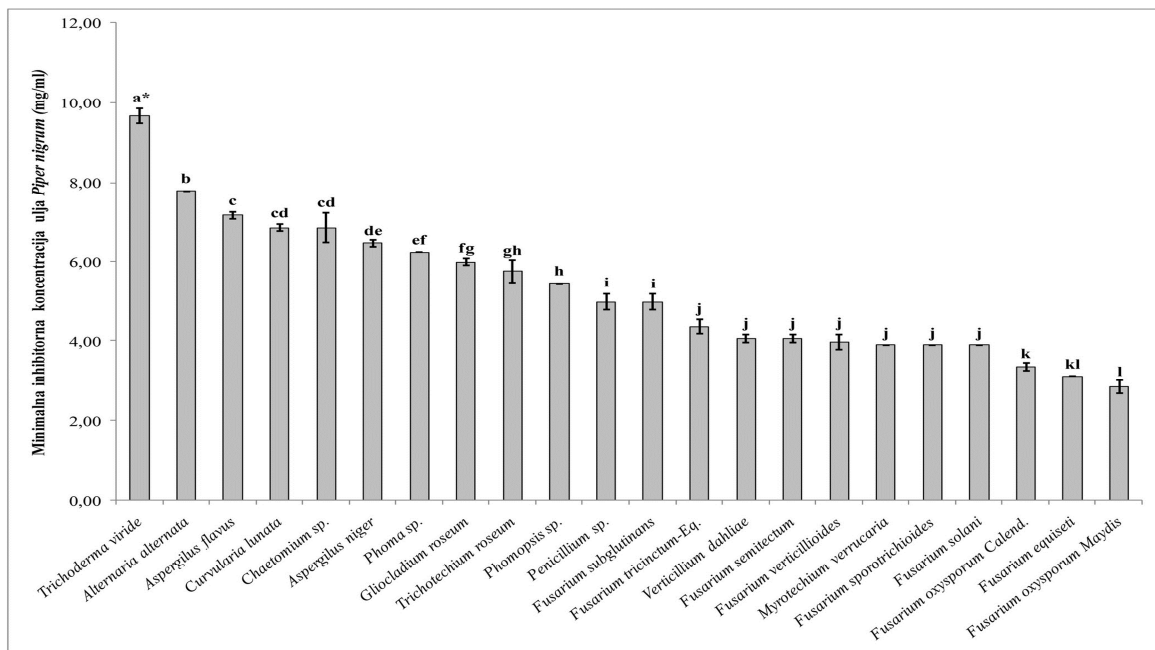
Etarsko ulje crnog bibera ispoljio je, u odnosu na komercijalni mikotik, dobar do umeren antifungalni potencijal inhibirajući rast većeg broja testiranih gljiva koncentracijama između 4 i 6 mg/ml (Tabela 10.). Najveća minimalna inhibitorna koncentracija ovog ulja potrebna je za inhibiciju *T. viride* (9,6 mg/ml, MFC 10,1 mg/ml) i *A. alternata* (MIC i MFC 7,8 mg/ml). Toleratnost na ulje bibera ispoljile su i *A. flavus* (7,2 mg/ml), *Chaetomium* sp. i *C. lunata* sa MIC od 6,86 mg/ml, kao i *A. niger* (MIC 6,5 mg/ml). Veću osetljivost na ovo ulje ispoljile su vrste roda *Fusarium* sa MIC vrednostima između 3 i 4 mg/ml, pri čemu je *F. subglutinans* među njima bila najotpornija (MIC je 4,9 mg/ml i MFC od 5,5 mg/ml). Najmanja koncentracija ulja

bibera potrebna za vidljivu inhibiciju rasta zabeležena je za *F. oxysporum* (izolovane sa nevena i kukuruzne svile), sa MIC malo iznad 3 mg/ml i *F. equiseti* sa 3,9 mg/ml.

Tabela 10. MIC i MFC vrednosti etarskog ulja bibera (mg/ml)

Tastirane gljive	MIC	MFC	flukonazol
<i>F. solani</i>	3,90	3,90	1,8
<i>F. verticillioides</i>	3,98	4,29	1,4
<i>F. tricinctum</i>	4,36	4,68	0,8
<i>F. oxysporum</i> - neven	3,35	3,51	0,8
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	2,84	3,12	0,8
<i>F. semitectum</i>	4,05	4,3	1,6
<i>F. subglutinans</i>	4,92	5,5	1,6
<i>F. equiseti</i>	3,12	3,12	1,0
<i>F. sporotrichioides</i>	3,90	3,90	1,0
<i>A. flavus</i>	7,17	7,41	1,8
<i>A. niger</i>	6,5	6,5	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	4,9	5,5	1,8
<i>A. alternata</i>	7,80	7,80	1,6
<i>Chaetomium</i> sp.	6,86	7,80	2,0
<i>G. roseum</i>	6,0	6,24	0,6
<i>C. lunata</i>	6,86	6,86	1,0
<i>V. dahliae</i>	4,06	4,3	1,0
<i>T. viride</i>	9,67	10,14	2,0
<i>T. roseum</i>	5,77	6,24	0,8
<i>Phomopsis</i> sp.	5,46	5,46	0,8
<i>Phoma</i> sp.	6,24	6,24	0,8
<i>M. verrucaria</i>	3,90	3,90	0,8

Statističkom analizom dobijenih rezultata pokazano je da postoji statistički značajna razlika u stepenu inhibitorne aktivnosti etarskog ulja crnog bibera na različite testirane gljive (rezultati prikazani u Slici 36.).



Slika 36. MIC vrednosti etarskog ulja crnog bibera (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega

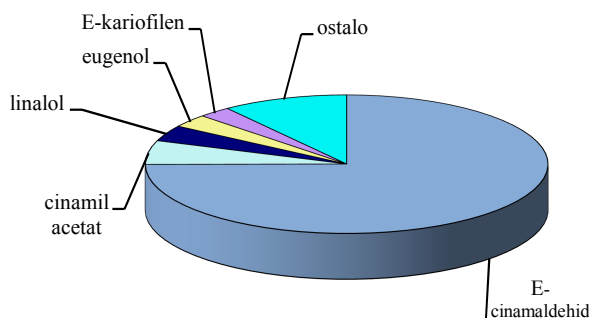
I literaturni podaci o antifungalnoj aktivnosti etarskog ulja crnog bibera, kojih nema mnogo za ovu vrstu, ukazuju na dobru do umerenu aktivnost. Veći broj podataka ukazuje na dobar antibakterijski potencijal ovog ulja (Sabulal *et al.*, 2006). Sasidharan i Menon (2010) su eksperimentalno utvrdili dobru, kako antibakterijsku, tako i antifungalnu aktivnost ulja bibera, pri čemu su *A. nigrum* i *Penicillium* spp., bile osetljivije na ovo ulje od gljive *T. viride*. *T. viride* je i u našim istraživanjima najrezistentnija gljiva što se može videti iz Tabele 10. i Slike 36.

Veći broj autora je mišljenja da je dobra aktivnost ulja bibera posledica aktivnosti β -kariofilena (sinonim E-kariofilen), seskviterpena koji ima kritičnu ulogu u odbrani biljke (Ulubelen *et al.*, 1994). β -kariofilen i kariofilen oksid su u mnogim istraživanjima bili veoma fungitoksični na različite fitopatogene gljive. Amiel *et al.* (2012) su objavili da β -kariofilen uz izuzetna antifungalna svojstva, ispoljava i anti-inflamatornu aktivnost kao i aktivnost lokalnog anestetika ili agensa indukcije apoptoze. Rezultati istraživanja Bitner *et al.*, (2009) ukazuju da se inhibitorna aktivnost etarskog ulja crnog bibera može pripisati i bicikličnom monoterpenu, 3-karenu, prisutnom u našem ulju sa 9,54%. Antifungalnom potencijalu ovog ulja verovatno doprinosi i biciklični monoterpen, sabinen, za koji je dokazan inhibitorni efekat na rast gljiva

(Kohzaki *et al.*, 2009). O aktivnosti bicikličnih monoterpena, α - i β -pinena, prisutnih u ulju bibera sa oko 15%, postoje oprečni rezultati. Dok je u radu Soković (2001) utvrđen umeren do slab antifungalni potencijal, drugi istraživači su utvrdili dobru efikasnost α -pinena u inhibiciji vrsta *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium* i dermatomiceta (Mercier *et al.*, 2009; Raju i Maridass, 2009). U poređenju sa α -pinenom, β -pinen se pokazao efikasniji antifungalni agens na *Fusarium* vrste: *F. poae*, *F. culmorum* i *F. solani* (Krauze-Baranowska *et al.*, 2002).

4.2.8. Etarsko ulja kore cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*)

Hemijskom analizom identifikovano je 99,88% etarskog ulja cimeta sa E-cinamaldehydom (74,4%) kao dominantnom komponentom (Slika 37.). Ostale komponente su zastupljene u značajno manjem procentu: cinamil acetat (5,55%), linalol (3,70%), eugenol (3,08%), E-kariofilen (2,60%), 1,8-cineol (2,22%) i bornil acetat (2,13%) (Prilog 2, Tabela 30.).



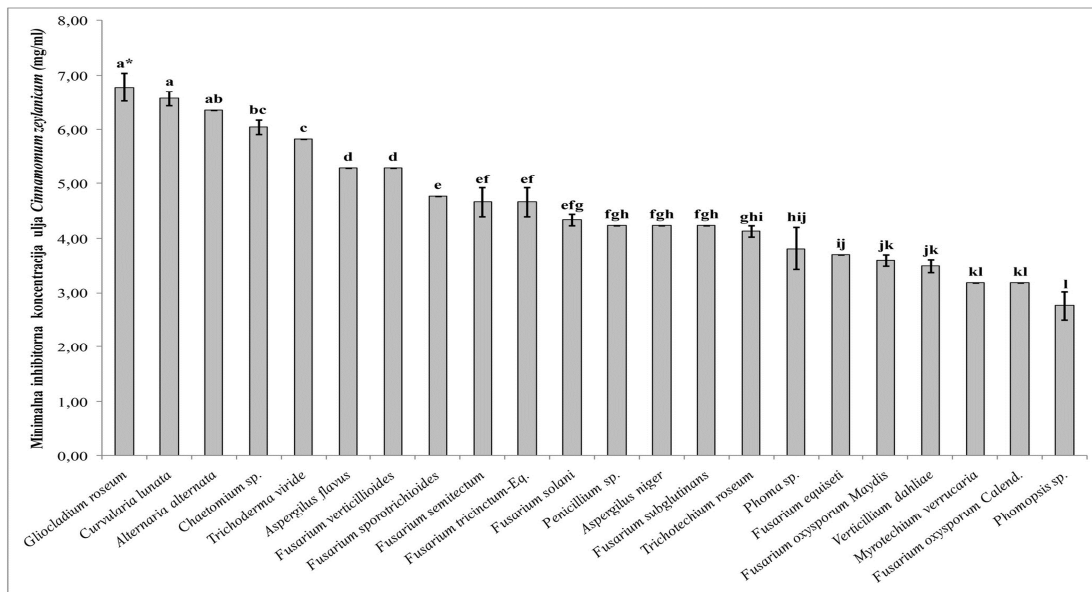
Slika 37. Udeo dominantnih komponenti u etarskom ulju cimeta

Dobijene minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije etarskog ulja kore cimeta kretale su se u opsegu od 2,8 mg/ml za *Phomopsis* do 6,8 mg/ml za *G. roseum* i *C. lunata*, koje su uz *A. alternata* (sa MIC od 6,4 mg/ml) ujedno i najotpornije gljive na ovo etarsko ulje. Najosetljivija gljiva na ulje cimeta je *Phomopsis* sp. (Tabela 11., Slika 38.).

Tabela 11. MIC i MFC vrednosti za etarsko ulje kore cimeta (mg/ml)

Testirane gljive	MIC	MFC	flukonazol
<i>F. solani</i>	4,34	4,34	1,8
<i>F. verticillioides</i>	5,30	5,30	1,4
<i>F. tricinctum</i>	4,66	5,30	0,8
<i>F. oxysporum</i> - neven	3,2	3,2	0,8
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	3,60	3,60	0,8
<i>F. semitectum</i>	4,66	5,30	1,6
<i>F. subglutinans</i>	4,24	4,24	1,6
<i>F. equiseti</i>	3,71	3,71	1,0
<i>F. sporotrichioides</i>	4,77	4,77	1,0
<i>A. flavus</i>	5,30	5,30	1,8
<i>A. niger</i>	4,24	4,24	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	4,24	4,24	1,8
<i>A. alternata</i>	6,36	6,36	1,6
<i>Chaetomium</i> sp.	6,02	6,36	2,0
<i>G. roseum</i>	6,78	7,42	0,6
<i>C. lunata</i>	6,5	6,9	1,0
<i>V. dahliae</i>	3,5	3,71	1,0
<i>T. viride</i>	5,83	5,83	2,0
<i>T. roseum</i>	4,13	4,24	0,8
<i>Phomopsis</i> sp.	2,75	3,18	0,8
<i>Phoma</i> sp.	3,81	4,77	0,8
<i>M. verrucaria</i>	3,18	3,18	0,8

Najveći broj gljiva pokazuje sličnu osjetljivost na ovo ulje tj. MIC i MFC vrednosti su se kretale od 3,5 do 4,5 mg/ml (Tabela 11.). Prema ovim rezultatima može se reći da etarsko ulje kore cimeta ispoljava dobar do umeren antifungalni potencijal i da postoji statistički značajna razlika u njegovom delovanju na različite testirane gljive (Slika 38.).



Slika 38. MIC vrednosti etarskog ulja kore cimeta (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega

Cinamaldehyd je organsko jedinjenje koje cimetu, pa i ulju cimeta, daje miris i ukus. Identifikovana je kao glavna fungitoksična komponenta etarskog ulja cimeta (Jham *et al.*, 2005). Carmo *et al.* (2008) su objavili da je etarsko ulje cimeta snažno inhibiralo rast micelije *A. niger*, *A. flavus* i *A. fumigatus*, ali i germinaciju spora. Glavne morfološke promene posmatrane pod svetlosnim mikroskopom, uzrokovane ovim etarskim uljem, na ćelijama gljiva su: inhibicija stvaranja konidija, nedostatak sporulacije, gubitak pigmentacije, neregularan razvoj hifa i fragmentacija. Takođe, ulje jasno uzrokuje smanjenje glava konidija, sa formiranjem izobličenih konidiofora. Na nivou ćelije vidljiv je gubitak sadržaja citoplazme, kao i poremećaj ćelijske strukture što ukazuje na degeneraciju ćelijskog zida gljive. Pretpostavka ovih autora je da su modifikacije u strukturi micelijuma uzrokovane delovanjem etarskog ulja cimeta na enzime odgovorne za sintezu ćelijskog zida.

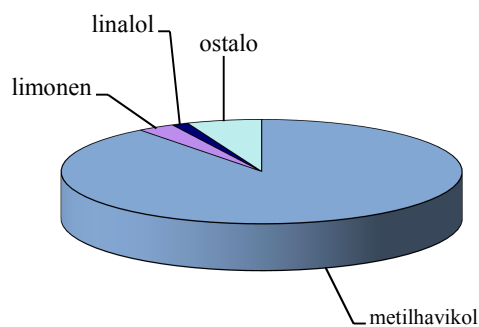
Kada su u pitanju antifungalna svojstva komponenata etarskog ulja cimeta (mono- i seskviterpena, fenola i cinamaldehyda) isti autori smatraju da uzrokuju inhibiciju sinteze ekstracelularnih enzima i poremećaje u strukturi ćelijskog zida što rezultuje u gubitku citoplazme, narušavanju integriteta ćelije i konačno dovodi do uginuća micelije. Smatra se da prisustvo aldehidne grupe, konjugovane dvostruke veze i dugog CH lanca van prstena, kao što je slučaj kod cinamaldehyda, obezbeđuje snažnu

antifungalnu aktivnost (Cheng *et al.*, 2008), te može biti potencijalno vodeće jedinjenje u razvoju antifungalnih proizvoda kroz kontrolu sinteze β -(1,3)-glukana i hitina kod kvasaca i plesni (Bang *et al.*, 2000).

Verovatno i cinamil acetat, u našem ulju prisutan sa 5,5%, svojom izrazitom antifungalnom aktivnošću (Lee *et al.*, 2005), doprinosi inhibitornoj aktivnosti kompletnog ulja. I za eugenol, fenolnu komponentu, je dokazano da poseduje jak antifungalni potencijal, te verovatno doprinosi aktivnosti kompletnog etarskog ulja cimeta (Yen and Chang, 2008).

4.2.9. Etarsko ulje bosiljka (*Ocimum basilicum*)

Postoji veći broj hemotipova etarskog ulja bosiljka u zavisnosti od toga koje komponente preovlađuju. Uglavnom je to linalol, te su to linalol hemotipovi ulja bosiljka. Etarsko ulje analizirano u ovom radu može se svrstati u metilhavikol hemotip, jer metilhavikol, sa 88,97%, predstavlja dominantnu komponentu, slično rezultatima Tiziana-Barrata *et al.*, (1998). Procentualni udeo dominantnih komponenti u etarskom ulju bosiljka prikazan je na Slici 39.



Slika 39. Udeo dominantnih komponenti u etarskom ulju bosiljka

Uz metilhavikol, u daleko manjem procentu prisutni su i limonen (3,00%) i linalol (1,30%), sa 1% zastupljeni su γ -terpinen i α -bergamoten, dok su ostale komponente zastupljene sa manje od 1%. Kompletan kvalitativan i kvantitativan sastav etarskog ulja bosiljka prikazan je u Prilogu 2 (Tabela 31.).

Rezultati ispitivanja antifungalne aktivnosti etarskog ulja bosiljka prikazani su u Tabeli 12. i na Slici 40. Prema dobijenim rezultatima antifungalni potencijal etarskog ulja bosiljka može se okarakterisati kao umeren.

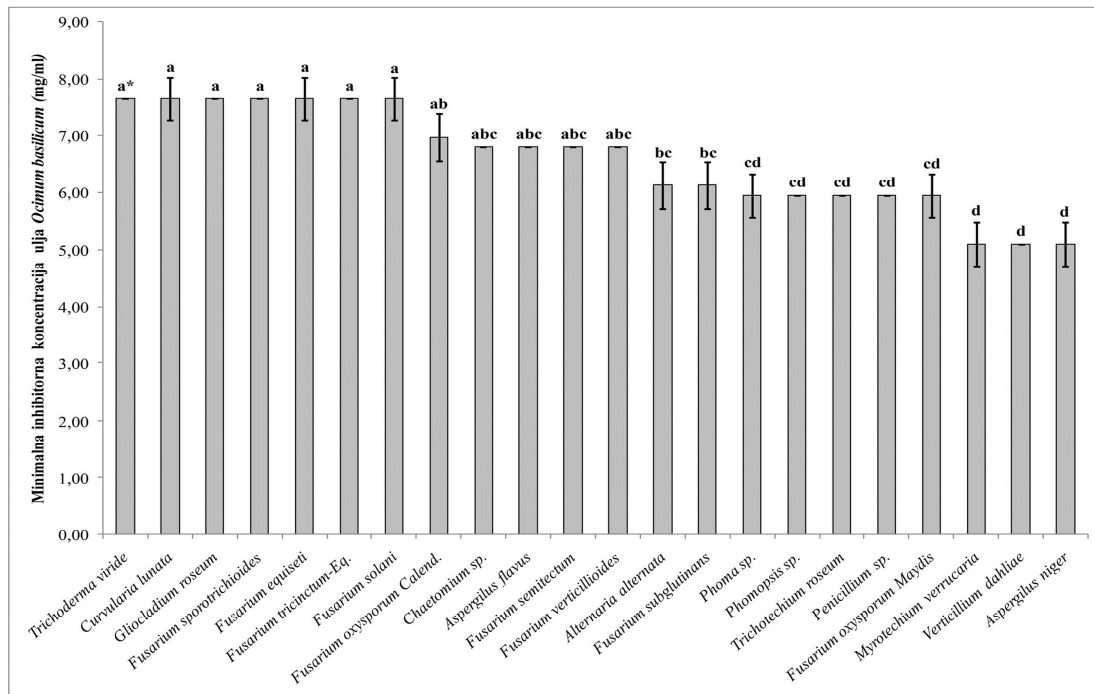
Tabela 12. MIC i MFC vrednosti etarskog ulja bosiljka (mg/ml)

Testirane gljive	MIC	MFC	flukonazol
<i>F. solani</i>	7,65	8,5	1,8
<i>F. verticillioides</i>	6,8	6,8	1,4
<i>F. tricinctum</i>	7,65	7,7	0,8
<i>F. oxysporum</i> - neven	6,97	7,65	0,8
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	5,95	6,80	0,8
<i>F. semitectum</i>	6,8	6,8	1,6
<i>F. subglutinans</i>	6,12	6,80	1,6
<i>F. equiseti</i>	7,65	8,50	1,0
<i>F. sporotrichioides</i>	7,65	7,65	1,0
<i>A. flavus</i>	6,8	6,8	1,8
<i>A. niger</i>	5,1	5,95	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	5,95	5,95	1,8
<i>A. alternata</i>	6,12	6,80	1,6
<i>Chaetomium</i> sp.	6,8	6,8	2,0
<i>G. roseum</i>	7,65	7,65	0,6
<i>C. lunata</i>	7,65	8,5	1,0
<i>V. dahliae</i>	5,1	5,1	1,0
<i>T. viride</i>	7,65	7,65	2,0
<i>T. roseum</i>	5,95	5,95	0,8
<i>Phomopsis</i> sp.	5,95	5,95	0,8
<i>Phoma</i> sp.	5,95	5,95	0,8
<i>M. verrucaria</i>	5,1	5,95	0,8

Rast *V. dahliae* i *M. verrucaria* je inhibiran najnižom koncentracijom ulja bosiljka od 5,1 mg/ml (MIC). MFC vrednost za *M. verrucaria* je nešto viša i iznosi 5,95 mg/ml. Među *Fusarium* vrstama, najosetljivije su bile *F. suglutinans* i *F. oxysporum* (sa kukuruzne svile), gde je nešto veća koncentracija od 5,95 mg/ml bila minimalna inhibitorna. Ista koncentracija je bila neophodna i za inhibiciju rasta *Penicillium* sp., *A. alternata*, *T. roseum*, *Phomopsis* sp. i *Phoma* sp. Koncentracija od 7,65 mg/ml je bila najveća zabeležena MIC vrednost etarskog ulja bosiljka kojom je inhibiran rast nekoliko testiranih gljiva: *F. solani*, *F. tricinctum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *G. roseum*, *C. lunata* i *T. viride* (MFC vrednost se kretala do 8,5 mg/ml).

Na osnovu dobijenih rezultata testirane gljive se mogu svrstati u manji broj grupa unutar kojih nije bilo statističke značajne razlike u antifungalnoj aktivnosti ulja

bosiljka tj. da je ovo ulje prilično ujednačeno delovalo na sve testirane gljive, što se može videti na Slici 40.



Slika 40. MIC vrednosti etarskog ulja bosiljka (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega

Dobijeni su interesantni rezultati za inhibiciju rasta *F. subglutinans* koja je u prethodno opisanim ispitivanjima bila među najotpornijim gljivama na sva ispitivana ulja. U slučaju etarskog ulja bosiljka, pokazano je da je to najosetljivija gljiva.

Slabiji antifungalni potencijal ispitivanog ulja može se pripisati dominaciji metil havikola koji je u ranijim ispitivanjima ispoljio varijabilnu aktivnost u zavisnosti od test organizma. Prema Tadtong *et al.*, (2009) ustanovljena je umerena do slaba antimikrobna aktivnost metil havikola. Nasuprot ovome, prema istraživanjima Suppakul *et al.* (2003) metilhavikol hemotip ulja bosiljka ispoljilo je dobru antifungalnu aktivnost na *A. niger*, *A. ochraceus* i *F. culmorum* (od 70 do 94%). Takođe, prema *in vitro* i *in vivo* istraživanjima Oxenham *et al.* (2005) etarsko ulje bosiljka, istog hemotipa, značajno je inhibiralo fitopatogenu gljivu *Botrytis fabae*. Eksperimentima u polju ovo ulje je redukovalo infekciju lišća boba pomenutom fitopatogenom gljivom kao i sa *Uromyces fabae*. Smatra se da povećanje aktivnosti kataboličkih enzima diamin oksidaze (DAO) i

poliamin oksidaze (PAO) u gljivi *B. fabae* u prisustvu ulja bosiljka, može biti delimično odgovorno za antifungalnu aktivnost ulja bosiljka, verovatno preko stvaranja vodonik peroksida i pokretanjem programirane ćelijske smrti (Oxenham and Svoboda, 2005). Khan *et al.*, (2010) smatraju da metil havikol ostvaruje fungicidnu aktivnost stvaranjem oksidativnih oštećenja na plazmamebrani gljivičnih ćelija.

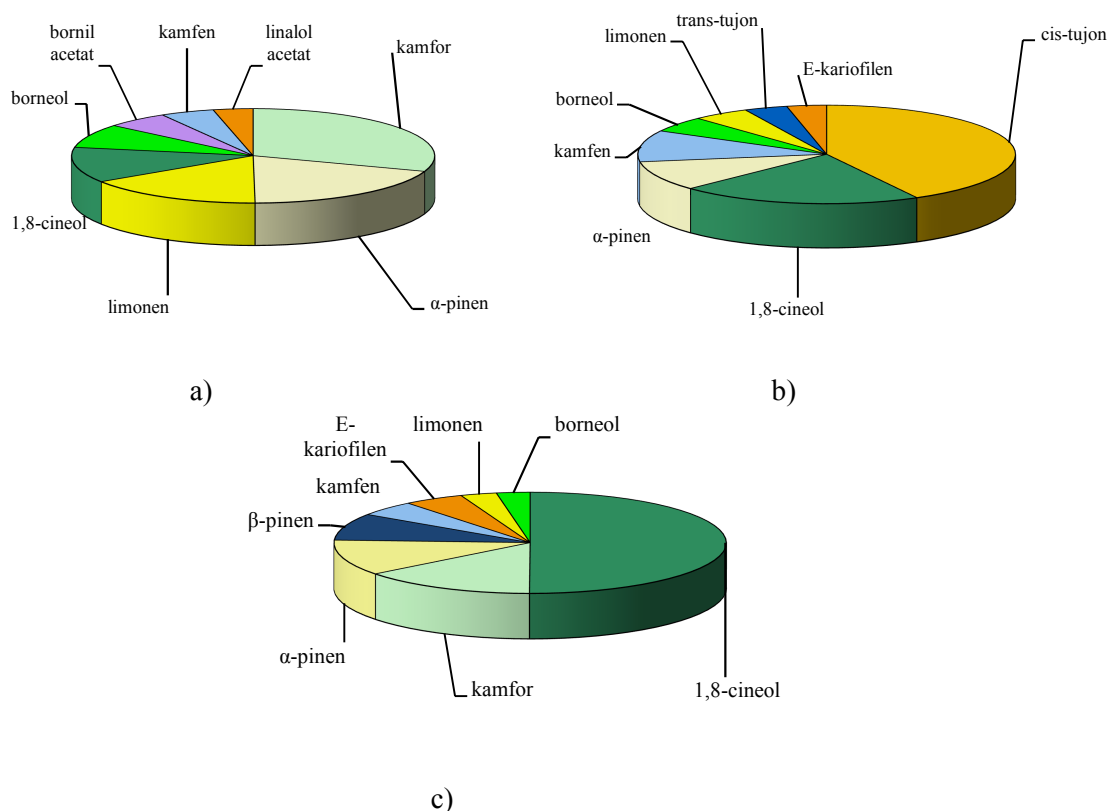
4.2.10. Etarska ulja dalmatinske žalfije (*Salvia officinalis*), španske žalfije (*Salvia lavandulifolia*) i ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*)

Analizirana su etarska ulja dve vrste roda *Salvia*: *Salvia officinalis*, poreklom iz Dalmacije i *Salvia lavandulifolia*, poreklom iz Španije i etarsko ulje ruzmarina, za koje je utvrđena sličnost u sastavu (Tabela 32. u Prilogu 2)

U etarskom ulju dalmatinske žalfije identifikovano je 25 jedinjenja što predstavlja 78,57%. Dominantne komponente su *cis*-tujon (28,54%), 1,8-cineol (13,95%), kamfen (7,11%) i α -pinen (6,65%). Procentualno manje su zastupljeni borneol (3,52%), limonen (3,28%), *trans*-tujon (2,54%), E-kariofilen (2,31%), bornil acetat (2,20%), β -pinen (1,79%), α -terpineol (1,34%) i linalol (1,0%) (Slika 41a.). Dobijeni rezultati su donekle u korelaciji sa rezultatima drugih ispitivanja gde je *cis*-tujon dominantna komponenta ulja dalmatinske žalfije, ali su druge dve najzastupljenije komponente bile *trans*-tujon i viridiflorol (15,0% odnosno 14,2%) (Maksimović *et al.*, 2007). Prema drugim istraživanjima etarska ulja žalfije *cis*-tujon hemotipa, od glavnih komponentata, uz *cis*-tujon i 1,8-cineol sadrže i manool i α -humulen (Bernotiene *et al.*, 2007). Razlike u sastavu mogu se biti posledica geografskog porekla populacije kao i ekoloških uslova u kojima biljke rastu (Maksimović *et al.*, 2007).

U etarskom ulju španske žalfije identifikovano je ukupno 27 jedinjenja što čini 97,96%. Kao što se može videti na slici 41b., dominantnu komponentu sa 26,64% predstavlja kamfor. Utvrđen je i značajan je udeo α -pinena (17,14%), limonena (13,88%), 1,8-cineola (10,56%), kao i borneola (7,14%), bornil acetata (4,94%), kamfena (4,62%). Nešto manji je, ali znatan, udeo linalol acetata (3,09%), β -pinena (2,46%) i α -terpineola (2,31%). Slične vrednosti dobili su istraživači iz slovačke prema kojima je ulje *S. lavandulifolia* Vahl. najviše sadržalo kamfor i 1,8-cineol, a veoma malo tujon (Veverkova *et al.*, 2004).

Etarsko ulje ruzmarina prema sadržaju monoterpeničkih komponenti, slično je etarskim uljima žalfije, posebno španskoj, uz njihov različit procentualni udeo (Slika 41c.). Hemijskom analizom ulja ruzmarina, monoterpenički oksid, 1,8-cineol, je identifikovan kao dominantna komponenta sa 45,34%. Od drugih monoterpeničkih komponenti u većoj količini prisutni su, monoterpenički keton, kamfor sa 13%, monoterpenički hidrokarboni α - i β -pinen sa 10,3% odnosno 7,86%, monoterpeni kamfen (4,44%), limonen (2,68%), monoterpenički alkohol borneol (2,54%), α -terpineol (1,68%), bornil acetat (1,08%) i *p*-cimen (1%), a od seskviterpena E-kariofilen (4,48%). Ukupno je identifikovano 29 komponenti, što predstavlja 99,84% ulja. Sastav etarskog ulja ruzmarina ispitivanog u ovom radu, u korelaciji je sa podacima Faixova and Faix (2008), prema kojima je 1,8-cineol dominantna komponenta uz sličan procentualni udeo.



Slika 41. Udeo dominantnih komponenti u etarskim uljima: a) španske žalfije, b) dalmatinske žalfije i c) ruzmarina

Ispitivanjem antifungalne aktivnosti sva tri etarska ulja utvrđena je različita osetljivost testiranih gljiva. Izvesne razlike u sastavu verovatno su uticale na razliku u inhibitornoj aktivnosti ispitivanih ulja. To se posebno ogleda u aktivnosti etarskih ulja

dve vrste roda *Salvia*, pri čemu je ulje dalmatinske žalfije ispoljilo znatno jaču antifungalnu aktivnost tj. pri nižim koncentracijama je inhibiralo rast testiranih gljiva. Dok je ulje dalmatinske žalfije ispoljilo dobru do umerenu antifungalnu aktivnost, u zavisnosti od testirane gljive, ulje španske žalfije ispoljilo je umerenu do slabu antifungalnu aktivnost. Nasuprot njima, etarsko ulje ruzmarina ispoljilo je veoma dobar inhibični efekat na rast testiranih gljiva. Rezultati antifungalne aktivnosti sva tri ulja prikazani su u Tabeli 13. i na Slici 42.

Tabela 13. MIC i MFC vrednosti za ulja (eu) španske i dalmatinske žalfije i ruzmarina (mg/ml)

Testirane gljive	eu španske žalfije MIC	eu španske žalfije MFC	eu dalmatinske žalfije MIC	eu dalmatinske žalfije MFC	eu ruzmarina MIC	eu ruzmarina MFC
<i>F. solani</i>	7,33	7,33	4,50	4,50	1,5	1,5
<i>F. verticillioides</i>	7,52	7,52	4,60	4,60	1,2	1,2
<i>F. tricinctum</i>	14,10	14,10	10,3	11,94	5,4	5,4
<i>F. oxysporum</i> - neven	14,10	14,10	7,7	7,7	3,4	3,4
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	10,94	11,28	7,2	7,2	2,3	2,3
<i>F. semitectum</i>	11,46	12,22	7,4	7,4	3,4	3,4
<i>F. subglutinans</i>	13,72	14,10	9,38	10,12	5,4	5,74
<i>F. equiseti</i>	7,10	7,10	4,60	4,60	4,1	4,51
<i>F. sporotrichioides</i>	14,10	14,10	8,09	9,20	3,51	4,10
<i>A. flavus</i>	14,66	15,10	5,33	5,33	5,10	5,74
<i>A. niger</i>	7,33	7,33	4,78	5,52	3,3	3,3
<i>Penicillium</i> sp.	10,24	10,24	7,0	7,0	5,2	5,74
<i>A. alternata</i>	9,40	9,40	5,70	6,44	3,85	4,92
<i>Chaetomium</i> sp.	11,84	12,22	5,55	6,44	3,6	4,10
<i>G. roseum</i>	9,40	9,40	8,83	8,83	5,6	5,6
<i>C. lunata</i>	7,90	9,40	3,86	3,86	4,8	4,8
<i>V. dahliae</i>	6,01	6,58	3,6	3,6	3,4	3,4
<i>T. viride</i>	13,72	14,10	8,1	9,20	5,2	5,74
<i>T. roseum</i>	9,02	9,40	3,5	3,5	2,6	2,87
<i>Phomopsis</i> sp.	8,64	9,40	4,05	4,60	2,9	4,0
<i>Phoma</i> sp.	7,14	7,52	3,7	3,7	1,9	1,9
<i>M. verrucaria</i>	5,60	5,60	3,5	3,5	2,2	2,46

Najniži inhibični potencijal etarsko ulje španske žalfije ispoljilo je na vrste *A. flavus*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum* i *F. oxysporum* (izolovan sa nevena) za čiju je inhibiciju rasta bila neophodna koncentracija preko 14 mg/ml. Najveću rezistenstnost na ovo ulje ispoljila je potencijalno toksigena *A. flavus* za koju su utvrđene najviše MIC i MFC vrednosti (14,66 odnosno 15,10 mg/ml). Neznatno veću osetljivost na ovo ulje ispoljile su *T. viride* i *F. subglutinans* sa MIC od 13,7 mg/ml (MFC je 14,10 mg/ml). Najmanje minimalne inhibitorne koncentracije zabeležene su za *M. verrucaria* i *V. dahliae* od 5,6 odnosno 5,8 mg/ml. Veću osetljivost na ovo ulje ispoljile su i *Phoma* sp.,

A. niger, *F. solani*, *F. equiseti* i *F. verticillioides* za koje je koncentracija od oko 7 mg/ml bila dovoljna za potpunu inhibiciju rasta (MFC).

Ispitivanjem etarskog ulja dalmatinske žalfije dobijene su niže minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije za većinu testiranih gljiva koje su se kretale od 3,5 mg/ml do 10,3 za MIC mg/ml, odnosno od 3,5 mg/ml do 11,94 mg/ml za MFC. Na ovo ulje najosetljivije su *M. verrucaria*, *T. roseum*, *V. dahliae* i *Phoma* sp. za čiju inhibiciju je bila neophodna najniža koncentracija ulja (3,5 tj. 3,7 mg/ml). Najmanju osetljivost ispoljile su *F. tricinctum*, *F. subglutinans*, *G. roseum*, *T. viride* i *F. sporotrichioides*, jer su za inhibiciju njihovog rasta bile neohodne najveće koncentracije etarskog ulja dalmatinske žalfije (od 8 do 10 mg/ml, odnosno od 8,8 do 11,4 mg/ml za MFC) (Tabela 13.). Takođe se može primetiti da su vrste *Fusarium* manje osetljive na ovo ulje u odnosu na vrste drugih rodova.

Iako je etarsko ulje dalmatinske žalfije ispoljilo bolji antifungalni potencijal od etarskog ulja španske žalfije, može se primetiti da oba ulja, u različitim koncentracijama, slično deluju na iste vrste gljiva, odnosno slične vrste gljiva su i najosetljivije i najotpornije na oba ulja. Tako su, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans* i *T. viride* najotpornije gljive na etarska ulja obe žalfije, dok su *M. verrucaria* i *V. dahliae*, kao i *Phoma* sp. među najosetljivijim.

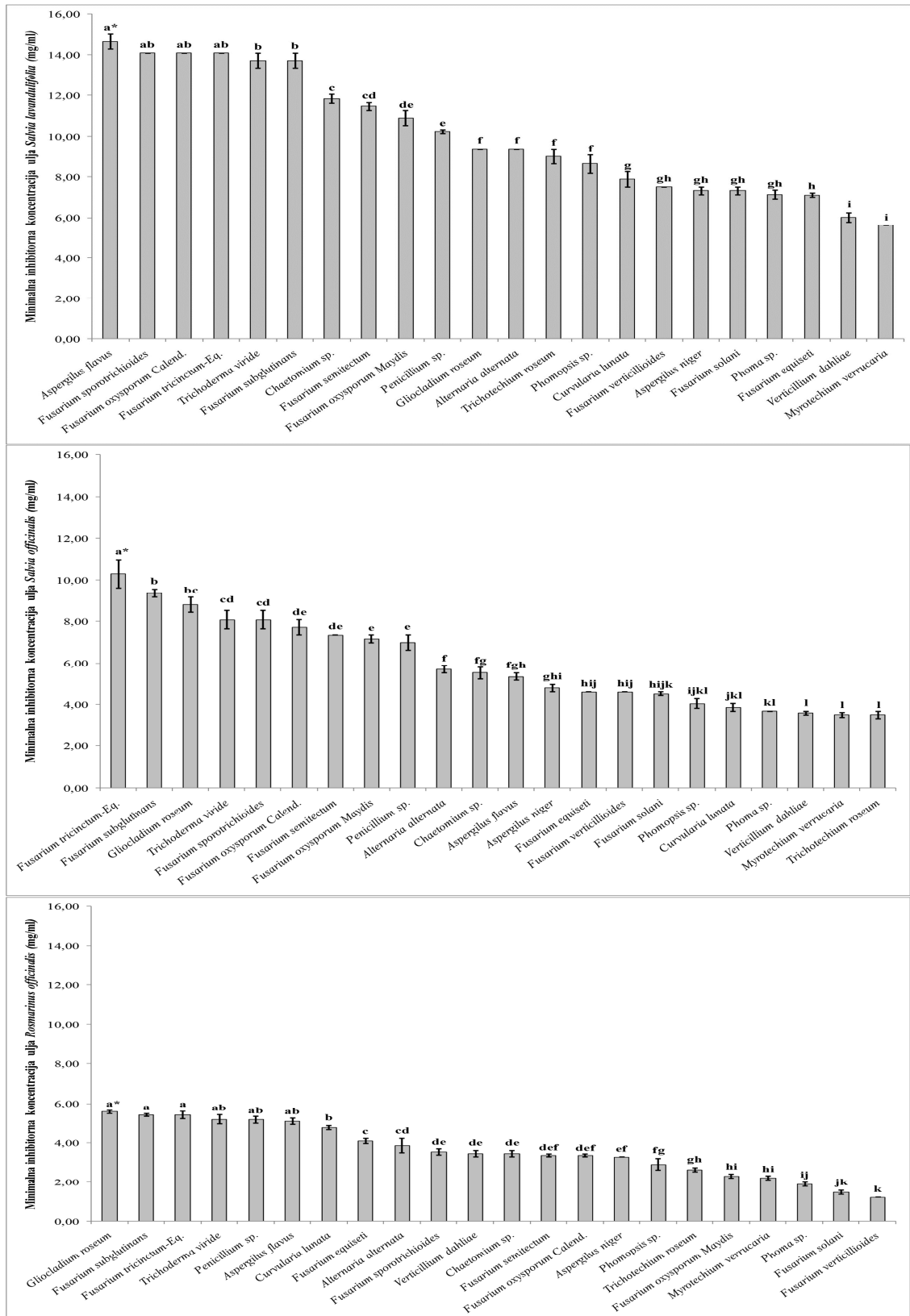
Može se pretpostaviti da je bolja antifungalna aktivnost etarskog ulja dalmatinske žalfije posledica prisustva tujona kao glavne komponente, kao i većeg udela 1,8-cineola u ovom ulju, u odnosu na ulje španske žalfije. Smatra se da su tujonima bogatija ulja žalfije aktivnija, od onih gde dominiraju druge terpenke komponente (Baričević and Bertol, 2000). Ispitivanja aktivnosti ulja žalfije, tujon hemotipa, ukazala su na izrazit antifungalni potencijal na kliničke izolate vrsta roda *Candida*, dermatomicete kao i gljive iz rodova *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Fusarium* (Pinto *et al.*, 2007). Osim inhibitorne aktivnosti na rast micelije, potpuno redukuju produkciju aflatoksina B i G (Baričević and Bertol, 2000).

Slabija antifungalna aktivnost ulja španske žalfije može se objasniti, pretežnim udelom monoterpena sa manjim antifungalnim potencijalom kao što su kamfor, α -pinen i limonen, koji među monoterpenskim komponentama ispoljavaju najniži antifungalni potencijal (Soković, 2001). I za acetate (u našem radu linalol- i bornil acetat) je pokazana slaba antifungalna aktivnost. Džamić *et al.* (2008) su sugerisali da postoji

veza između većeg prisustva linalol acetata i linalola u etarskom ulja *Salvia sclarea* i njegove umerene antifungalne aktivnosti.

U poređenju sa etarskim uljem obe žalfije, etarsko ulje ruzmarina je efikasnije u inhibiciji rasta odabranih gljiva (Tabela 13. i Slika 42.). Ovo ulje je pokazalo umeren do dobar antifungalni potencijal sa minimalnim inhibitornim koncentracijama od 1,2 do 5,6 mg/ml. MFC vrednosti su u ospegu od 1,2 do 5,74 mg/ml.

Najosetljivije gljive na ovo ulje bile su *F. verticillioides* i *F. solani* sa MIC vrednostima od 1,2 odnosno 1,5 mg/ml. Neznatno manju osetljivost ispoljile su *Phoma* sp. (MIC od 1,85 mg/ml), *Phomopsis* sp. sa MIC 2,0 mg/ml, *M. verrucaria* (MIC 2,2 mg/ml), *F. oxysporum* (iz kukuruzne svile) i kao i *T. roseum* (MIC 2,6 mg/ml). Rast većeg broja gljiva bio je inhibiran koncentracijama od 3,5 do 4,3 mg/ml (Slika 42.), dok su najmanje osetljive bile *G. roseum* sa MIC od 5,6 mg/ml, kao i *F. subglutinans* i *F. tricinctum* sa MIC od 5,4 tj. 5,2 mg/ml.



Slika 42. MIC vrednosti etarskog ulja španske (gore) i dalmatinske žalfije (u sredini) i ruzmarina (dole) (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega

Prema Clausen *et al.*, (2010), ulje ruzmarina snažno je inhibiralo rast gljiva *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* i *Trichoderma viride*. Tretiranjem patogena *Penicillium digitatum* ovim uljem utvrđena je inhibicija, ne samo rasta micelije, nego i formiranja tipične boje micelijuma, procesa sporulacije kao i promena boje spora (Yigit *et al.*, 2000). Takođe, znatno je redukovana gustina konidija i konidiofora na miceliji. Sva ova svojstva mogu uzrokovati znatno smanjenje virulencije ovih patogena, pa se time smanjuje i učestalost oboljenja na voću koji isti izazivaju. Moghtader *et al.*, (2011) iznose podatak da ulje ruzmarina kompletno inhibira rast *A. flavus* kao i sintezu aflatoksina B1. Analize koje su sprovedeli Bartynska and Budzikur-Ramza (2001) ukazuju i na visoku toksičnost ulja ruzmarina na vrste roda *Fusarium*, što je pokazano i u ovom radu, pri čemu je rast najvećeg broja gljiva ovog roda bio inhibiran nižim testiranim koncentracijama. Zbog ovakve inhibitorne aktivnosti preporučuje se kao konzervans pri konzerviranju nekih namirnica u cilju zaštite od toksigenih gljivičnih infekcija (Moghtader *et al.*, 2011).

Antifungalna aktivnost ulja ruzmarina pripisuje se aktivnosti 1,8-cineola (Deabes, 2011). Prema rezultatima istraživanja Soković (2001) izolovane komponente ovog ulja, 1,8-cineol i kamfor, su ispoljile dobar do umeren antifungalni potencijal sa MIC od 2 – 8 $\mu\text{l/ml}$. U istraživanju Combrinck *et al.*, (2011) 1,8-cineol, kao pojedinačna komponenta, je bio efikasniji u inhibiciji fitopatogenih gljiva, posebno *A. alternata*, od kompletnog ulja. I borneol je u inhibiciji rasta micelija gljiva ispoljio visoku efikasnost. Kada su borneol i cineol primene kao mešavina, u proporciji u kojoj su zastupljeni u kompletnom ulju, deluju efikasnije nego pojedinačno, kompletno inhibirajući rast ispitivanih gljiva, što ukazuju da ove komponente deluju sinergistički (Clausen *et al.*, 2010).

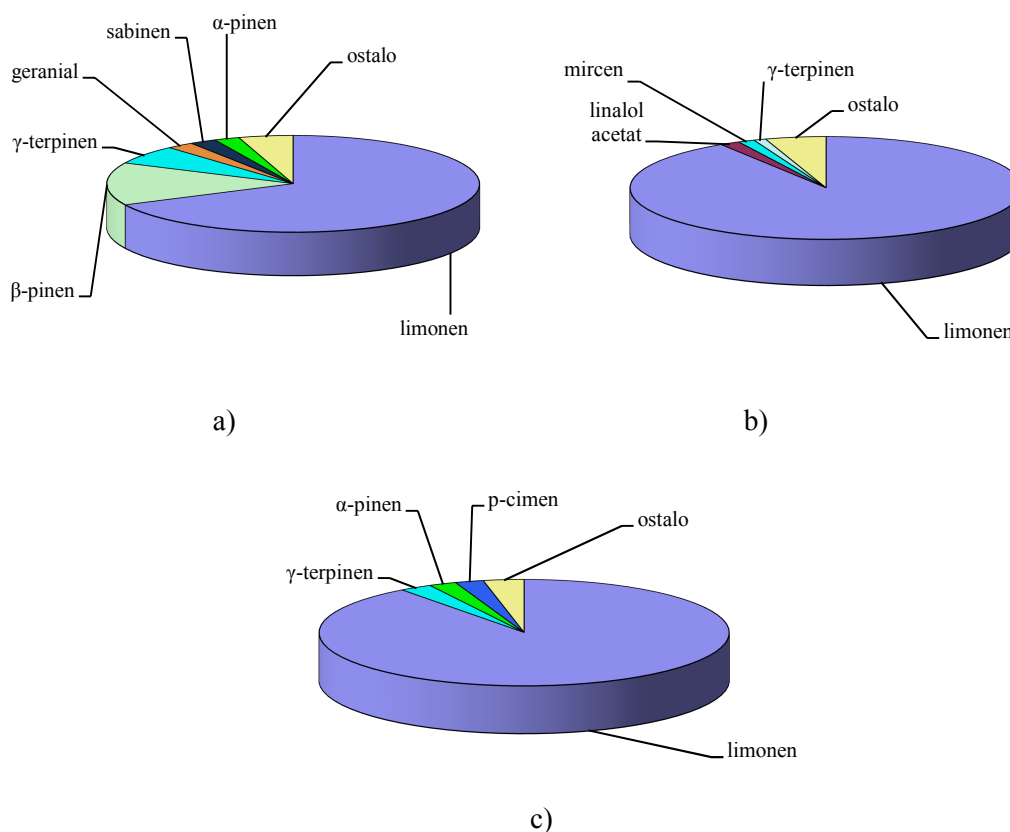
Na osnovu literaturnih podataka o aktivnosti pojedinačnih komponenti prisutnih u ulju ruzmarina testiranog u ovom radu, može se reći da je njegova umerena do dobra inhibitorna aktivnost posledica, verovatno, sinergističke aktivnosti različitih komponenti. Bolja inhibitorna aktivnost ulja ruzmarina u odnosu na etarska ulja dalmatinske i španske žalfije je verovatno posledica većeg procentualnog udela 1,8-cineola, koji sa 45% predstavlja dominantnu komponentu. Prisustvo seskviterpena E-kariofilena sa jakim antifungalnim efektom verovatno ima svoj doprinos (Amiel *et al.*, 2012). U etarskom ulju ruzmarina manji je sadržaj limonena i acetata, za koji je

pokazano da poseduju slab antifungalni potencijal, što takođe može imati uticaj na bolju aktivnost istog.

4.2.11. Etarska ulja limuna (*Citrus limon*), narandže (*Citrus aurantium*) i eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*)

Etarska ulja kore limuna, narandže i lista eukaliptusa izdvojena su prema, hemijskoj sličnosti, odnosno prema istoj dominantnoj komponenti, monoterpenskom ugljovodoniku, limonenu. Procentualni udeo dominantnih komponenti u etarskim uljima limuna, narandže i eukaliptusa prikazan je na Slici 43., dok je kompletan sastav sva tri ulja prikazan u Prilogu 2 (Tabela 33.).

U etarskom ulju kore limuna identifikovano je 19 komponenti što čini 99,99% sastava. Uz limonen kao dominantnu komponentu (65,86%), u većem procentu identifikovane su i β -pinen sa 13,86% i γ -terpinen sa 6,19%, a zatim i geranial sa 2,29%, sabinen sa 2,25% i α -pinen sa 2,13%. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa literaturnim podacima po kojima su limonen, uz β -pinen i γ -terpinen dominantne komponente u etarskom ulju kore limuna (Viuda-Martos *et al.*, 2008).



Slika 43. Udeo dominantnih komponenti u etarskim uljima: a) limuna, b) narandže i c) eukaliptusa

U etarskom ulju narandže udeo limonena je 90,88%, a svih ostalih identifikovanih komponenti svega 9%. Sa oko 1% prisutni su linalol acetat (1,64%), mircen (1,36%) i γ -terpinen (1%), dok su ostale komponente zastupljene sa ispod 1%. Dobijeni rezultati u saglasnosti sa literaturnim podacima u kojima je limonen dominantna komponenta u ovom ulju (Brien *et al.*, 2008).

U etarskom ulju lista eukaliptusa limonen je zastupljen u sličnoj koncentraciji kao i u etarskom ulju narandže, sa 89,92%. γ -terpinen je zastupljen sa 2,54%, α -pinen sa 2,14% i *p*-cimen sa 2,22%. Na osnovu udela dominantne komponente, limonena, ulja narandže i eukaliptusa su hemijski sličnija nego ulja dve vrste roda *Citrus*.

Rezultati ispitivanja aktivnosti ova tri ulja ukazali su na njihov slabiji antifungalni potencijal, uz neznatno bolju aktivnost etarskog ulja eukaliptusa. Rezultati su prikazani u Tabeli 14. i na Slici 44.

Tabela 14. MIC i MFC vrednosti etarskih ulja limuna, narandže i eukaliptusa (mg/ml)

Testirane gljive	eu limuna MIC	eu limuna MFC	eu narandže MIC	eu narandže MFC	eu eukaliptusa MIC	eu eukaliptusa MFC
<i>F. solani</i>	7,65	8,70	12,0	12,15	9,7	9,7
<i>F. verticillioides</i>	8,0	8,70	12,1	12,1	8,9	9,7
<i>F. tricinctum</i>	10,4	10,4	14,6	15,39	8,7	8,7
<i>F. oxysporum</i> - neven	9,57	10,88	13,3	13,77	5,8	5,8
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	6,61	6,61	9,7	9,7	4,85	4,85
<i>F. semitectum</i>	6,94	7,83	9,7	9,7	7,76	7,76
<i>F. subglutinans</i>	13,0	13,0	16,2	16,2	8,7	9,7
<i>F. equiseti</i>	6,26	6,96	8,7	9,7	6,8	6,8
<i>F. sporotrichioides</i>	13,0	13,0	14,6	14,6	10,7	11,4
<i>A. flavus</i>	13,4	13,92	15,2	16,2	8,9	9,70
<i>A. niger</i>	12,7	13,4	12,1	12,1	6,6	6,6
<i>Penicillium</i> sp.	13,0	13,0	16,2	16,2	7,9	8,7
<i>A. alternata</i>	15,66	15,66	16,4	17,01	10,7	10,7
<i>Chaetomium</i> sp.	11,5	13,0	12,2	12,96	11,6	12,6
<i>G. roseum</i>	8,0	8,0	12,1	12,1	10,1	10,67
<i>C. lunata</i>	11,13	11,13	15,2	16,2	10,5	11,6
<i>V. dahliae</i>	6,09	6,96	12,15	12,15	7,4	7,76
<i>T. viride</i>	13,4	13,92	14,0	14,58	10,5	11,6
<i>T. roseum</i>	5,74	5,74	14,2	14,58	5,2	5,82
<i>Phomopsis</i> sp.	6,96	7,40	9,7	9,7	5,2	5,2
<i>Phoma</i> sp.	6,96	7,40	10,4	11,4	4,85	4,85
<i>M. verrucaria</i>	5,2	5,2	8,1	8,91	5,4	5,82

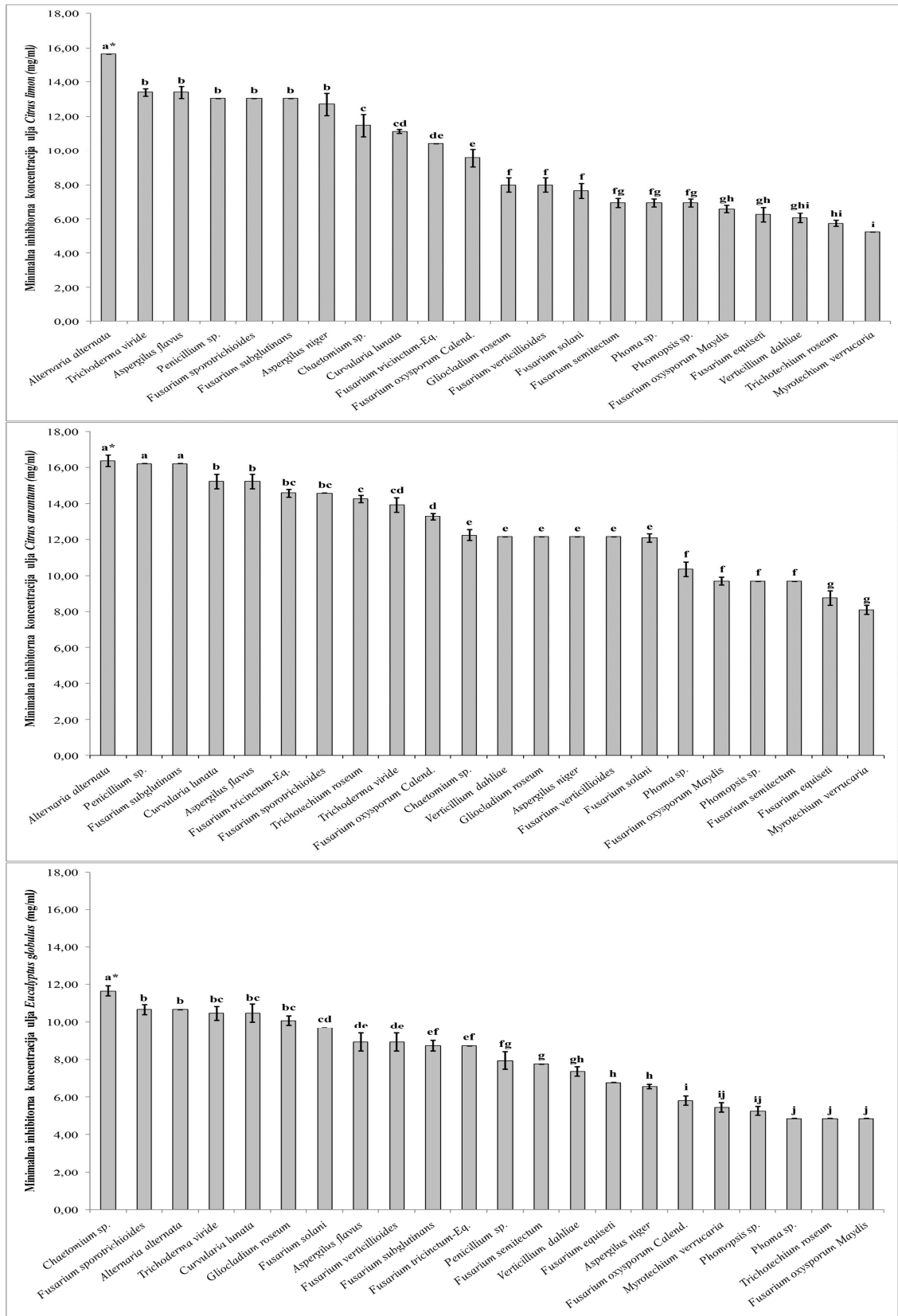
Minimalne inhibitorne koncentracije za ulje limuna se kreću od 5,2 mg/ml do 15,6 mg/ml, što su ujedno najmanje i najveće ne samo MIC, nego i MFC vrednosti. Najosetljivija gljiva na ovo ulje je *M. verrucaria* (MIC 5,2 mg/ml), dok su manje

osetljive *F. equiseti*, *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *F. semitectum*, *F. oxysporum* (sa cvetova nevena) za čiju je inhibiciju rasta potrebna koncentracija između 6 i 7 mg/ml (MFC vrednosti su neznatno veće). Najveću toleratnost na ulje kore limuna ispoljila je *A. alternata* za koju je zabeležena MIC vrednost od 15,6 mg/ml, što je ujedno i najveća MIC i MFC vrednost za ovo ulje. Nešto veću osetljivost ispoljile su *T. viride*, *A. flavus*, *Penicillium* i *F. subglutinans* sa MIC vrednostima oko 13 mg/ml.

Za potpunu inhibiciju rasta testiranih gljiva etarskim uljima narandže potrebne su, uglavnom, veće koncentracije. Za inhibiciju rasta najvećeg broja testiranih gljiva potrebna je koncentracija iznad 10 mg/ml, pri čemu su *F. subglutinans*, *A. flavus* i *Penicillium* sp. sa MIC od 16 mg/ml najotpornije gljive na ovo ulje. Najmanja MIC vrednost za ulje narandže zabeležena je za *M. verrucaria* (8,1 mg/ml) odnosno *F. equiseti* (8,5 mg/ml). Ovako visoke MIC i MFC vrednosti svrstavaju ulje narandže u grupu slabo aktivnih.

Salb do umeren antifungalni potencijal zabeležen je i za etarsko ulje eukaliptusa. Ipak, u odnosu na etarska ulja limuna i narandže, ulje eukaliptusa se pokazalo bolje u inhibiciji rasta testiranih gljiva. Najveće MIC i MFC vrednosti utvrđene su za inhibiciju rasta *Chaetomium* sp. (11,6 odnosno 12,6 mg/ml). Slabiju antifungalnu aktivnost etarsko ulje eukaliptusa je ispoljilo i na *F. sporotrichioides*, *A. alternata*, *C. lunata*, *G. roseum* i *T. viride* (MIC vrednosti oko 10 mg/ml). Najmanja koncentracija ulja eukaliptusa bila je potrebna za inhibiciju rasta *Phoma* sp. i *F. oxysporum* (sa kukuruzne svile)(4,85 mg/ml), kao i *Phomopsis* sp., *T. roseum* i *M. verrucaria* (neznatno iznad 5 mg/ml).

Rezultati prikazani na Slici 44. ukazuju da postoji statistički značajna razlika u inhibitornom efektu sva tri ulja na rast testiranih gljiva.



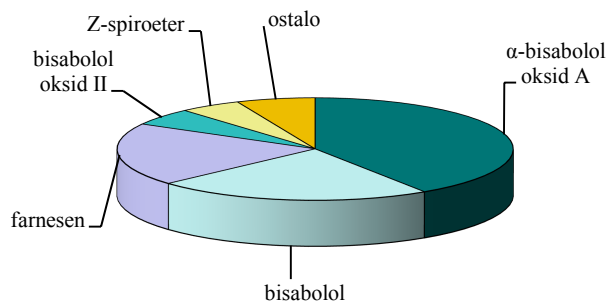
Slika 44. MIC vrednosti etarskog ulja limuna (gore), narandže (u sredini) i eukaliptusa (dole) (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega

U ranijim istraživanjima etarska ulja ovih vrsta ispoljila su slabu aktivnost u odnosu na većinu testiranih patogena kao i u našem ispitivanju. Ispitivanja etarskih ulja 4 vrste roda *Eucalyptus*, ispoljila su veoma slabu aktivnost na testirane gljive, iako je u nekima od njih bilo značajnije prisustvo 1,8-cineola, monoterpenskog oksida, sa dokazanom antifungalnom efikasnošću (Combrink *et al.*, 2011). Prema ovim autorima limonen je, među svim pojedinačnim komponentama, najslabiji inhibitor rasta testiranih patogenih gljiva, koji kao dominantna komponenta utiče na slabu aktivnost kompletnog ulja. Takođe, pokazano je da etarsko ulje eukaliptusa čak stimulira germinaciju spora u konidijama *A. niger* pri nižim koncentracijama (Deans, 2002).

Prema rezultatima dobijenim u ovom radu etarsko ulje limuna ispoljava bolji tj. jači antifungalni efekat na testirane gljive u odnosu na etarsko ulje kore narandže. Ranija, paralelna ispitivanja ulja limuna i narandže ukazala su, kao i u ovom radu, bolju antifungalnu aktivnost ulja limuna, mada su oba ispoljila slab antifungalni potencijal (Soković, 2001). U istom radu dokazana je slaba antifungalna aktivnost limonena, dominantne komponente u sva tri ulja, čime se može objasniti njihova slabija antifungalna aktivnost.

4.2.12. Etarsko ulje cveta kamilice (*Matricaria recutita*)

U etarskom ulju kamilice identifikovano je ukupno 95,64% sastava ulja pri čemu su dominantne komponente seskviterpeni dok su monoterenske komponente prisutne samo u tragovima (Tabela 34. u Prilogu 2). α -bisabolol oksid A je sa 37,98% identifikovan kao dominantna komponenta, dok je značajan udeo i bisabolola sa 21,11% i farnesena sa 18,52%. Bisabolol oksid II je zastupljen sa 5,06%, Z-spiroeter sa 4,72%, hamazulen sa 2,22% i germakren D sa 1,22% (Slika 45). Ostale komponente su zastupljene sa ispod 1%. Plava boja ulja kamilice posledica je prisustva terpenoida hamazulena.



Slika 45. Udeo dominantnih komponenti u etarskom ulju kamilice

Ranija istraživanja hemijskog sastava etarskog ulja kamilice pokazala su veliku varijabilnost u sastavu, posebno u procentualnom udelu dominantnih komponenata. Kao dominantne komponente preovlađuju α -bisabolol i hamazulen, mada to mogu biti i santolin alkohol, izobutil angelat ili *trans*- β -farnesen. Smatra se da visok sadržaj bisabolola u ulju odgovorno za većinu aktivnosti ovog ulja: antibakterijsku, antifungalnu, antiinflamatornu kao i antiulceroznu ali nisu potpuno razjašnjeni mehanizmi dejstva (Berry, 1995; *Matricaria recutita*, 2008).

Ispitivanjem aktivnosti etarskog ulja kamilice u inhibiciji rasta fitopatogenih gljiva, pokazan je slab antifungalni potencijal. Uzimajući u obzir da je etarsko ulje bogato oksidovanim komponentama, očekivalo se da pokaže jaču antifungalnu aktivnost. Rezultati su prikazani u Tabeli 15. i na Slici 46.

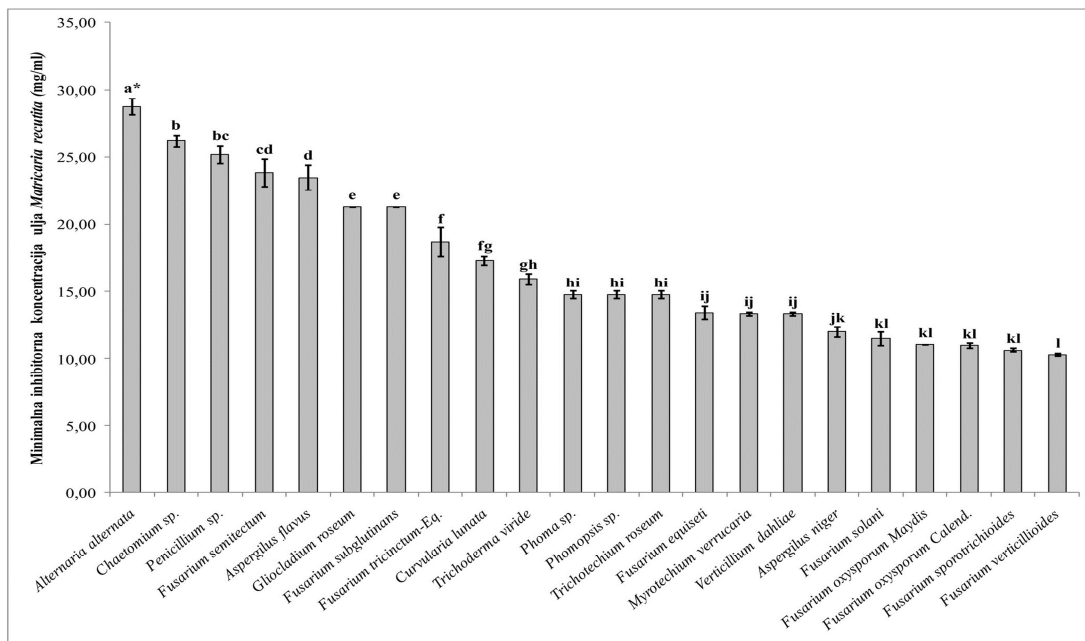
Minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije nisu ispod 10 mg/ml, dok je naveća od 28,7 mg/ml (MIC), odnosno 29,7 mg/ml (MFC) neophodna za inhibiciju rasta *A. alternata*. Veliku tolerantnost na ulje kamilice ispoljile su i *F. semitectum*, *F. subglutinans*, *A. flavus*, *Penicillium* sp., *Chaetomium* sp. i *G. roseum* za čiju su inhibiciju rasta bile neophodne koncentracije iznad 20 mg/ml.

Tabela 15. MIC i MFC vrednosti etarskog ulja kamilice (mg/ml)

Testirane gljive	MIC	MFC	flukonazol
<i>F. solani</i>	11,5	12,7	1,8
<i>F. verticillioides</i>	10,3	10,3	1,4
<i>F. tricinctum</i>	18,7	21,25	0,8
<i>F. oxysporum</i> - neven	11,0	11,5	0,8
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	11,0	11,0	0,8
<i>F. semitectum</i>	23,4	25,5	1,6
<i>F. subglutinans</i>	21,25	21,25	1,6
<i>F. equiseti</i>	13,4	15,30	1,0
<i>F. sporotrichioides</i>	10,6	11,05	1,0
<i>A. flavus</i>	23,5	25,5	1,8
<i>A. niger</i>	12,0	12,75	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	25,2	25,2	1,8
<i>A. alternata</i>	28,7	29,7	1,6
<i>Chaetomium</i> sp.	26,2	27,2	2,0
<i>G. roseum</i>	21,25	21,25	0,6
<i>C. lunata</i>	17,3	17,3	1,0
<i>V. dahliae</i>	13,4	13,4	1,0
<i>T. viride</i>	16,0	17,0	2,0
<i>T. roseum</i>	14,8	15,3	0,8
<i>Phomopsis</i> sp.	14,8	15,3	0,8
<i>Phoma</i> sp.	14,8	15,3	0,8
<i>M. verrucaria</i>	13,4	13,4	0,8

Najosetljivija gljiva na ovo ulje je *F. verticillioides* čiji rast je potpuno inhibiran sa 10,3 mg/ml. Veću osjetljivost na ulje kamilice, od ostalih testiranih gljiva, ispoljile su *F. sporotrichioides* sa MIC od 10,6 mg/ml, kao i *F. oxysporum* (izolovan sa nevena i kukuruzne svile) i *F. solani* za čiju inhibiciju rasta je bila neophodna koncentracija od 11 mg/ml (MFC vrednosti su neznatno više).

Na Slici 46. se može videti da postoji statistički značajna razlika u inhibitornoj aktivnosti ulja kamilice na testirane gljive.



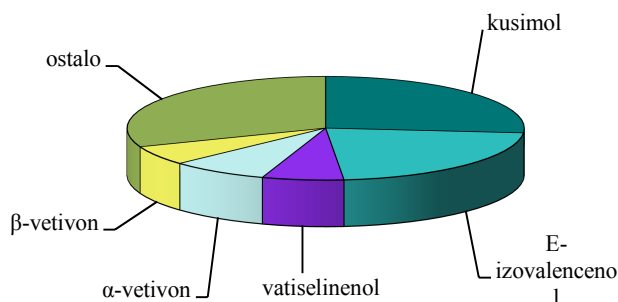
Slika 46. MIC vrednosti etarskog ulja kamilice (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega

Ranija istraživanja su dala oprečne rezultate. Rezultati istraživanja Soković (2001) su u saglasnosti sa našim rezultatima, prema kojima etarsko ulje kamilice poseduje slabiji antifungalni potencijal, mada nešto jači od utvrđenog u ovom radu. Sa druge strane, prema Jian-Yu (2012) ulje kamilice je ispoljilo visok antifungalni efekat na rast kako bakterija, tako i gljiva. Prema ovim autorima, antimikrobna aktivnost pripisuje se glavnim komponentama kao što su farnesen, bisabolol oksid, bisabolol i farnesol. Istraživanjima Maria-Rose *et al.* (2004) i Pauli (2006) su ukazali da farnesen poseduje izrazit inhibitorni potencijal prema mikroorganizmima hrane, a α -bisabolol može da inhbira rast gljiva kroz specifičnu inhibiciju biosinteze ergosterola. Iako su pomenute komponente prisutne i u etarskom ulju kamilice ispitivanom u ovom radu, značajniji antifungalni efekat nije zabeležen.

4.2.13. Etarsko ulje vetivera (*Vetiveria zizanoides*)

Vetiver je višegodišnja biljka, visoka trava tropskih i suptropskih područja. Ulje vetivera se dobija iz korena ove biljke. U ulju vetivera identifikovani su manje poznati seskviterpeni, seskviterpenoli i seskviterpenoni (ciklični ketoni). Najzastupljenije

komponente su isparljivi seskviterpeni kusimol sa 18,22%, E-izovalencenol sa 14,67%, vetiselinenol sa 4,52%, kao i α - i β -vetivon sa 5,42 odnosno 4,13% što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Thubthimthed *et al.*, 2000). Sa oko 3 % zastupljeni su junenol, valerianol i 10-epi- γ -Eudezmol. Udeo dominantnih komponenti predstavljen je na Slici 47., dok je kompletan hemijski sastav ulja vetivera dat u Tabeli 35. u Prilogu 2.



Slika 47. Udeo dominantnih komponenti u etarskom ulju vetivera

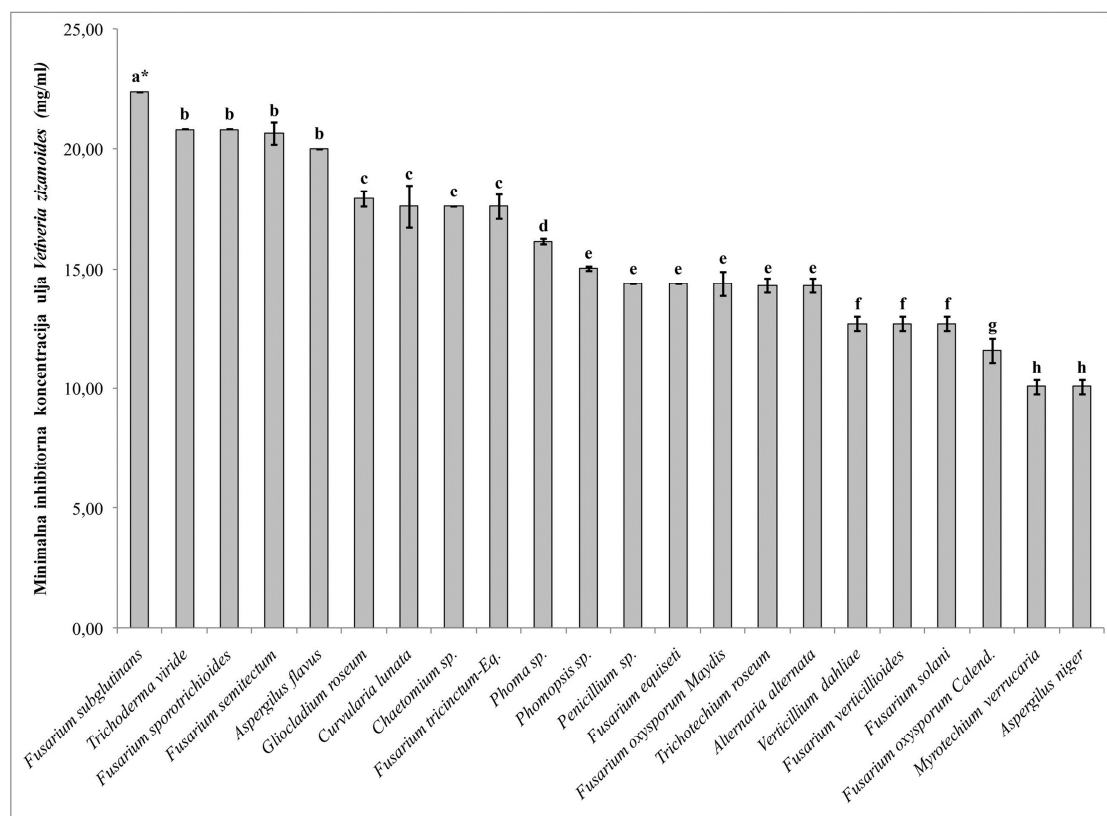
Primenom mikrodilucione metode utvrđen je veoma slab inhibitorski efekat ovog ulja na rast svih testiranih gljiva, što se može videti u Tabeli 16. i na Slici 48.

Tabela 16. MIC i MFC vrednosti etarskog ulja vetivera

Testirane gljive	MIC	MFC	flukonazol
<i>F. solani</i>	12,7	13,20	1,8
<i>F. verticillioides</i>	12,7	13,20	1,4
<i>F. tricinctum</i>	17,6	17,6	0,8
<i>F. oxysporum</i> - neven	11,6	12,40	0,8
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	14,4	14,80	0,8
<i>F. semitectum</i>	20,6	21,6	1,6
<i>F. subglutinans</i>	22,4	22,4	1,6
<i>F. equiseti</i>	14,4	14,4	1,0
<i>F. sporotrichioides</i>	20,8	20,8	1,0
<i>Aspergillus flavus</i>	20,0	20,0	1,8
<i>A. niger</i>	10,1	10,8	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	14,4	14,4	1,8
<i>A. alternata</i>	14,3	14,8	1,6
<i>Chaetomium</i> sp.	17,6	17,6	2,0
<i>G. roseum</i>	17,9	19,2	0,6
<i>C. lunata</i>	17,6	17,6	1,0
<i>V. dahliae</i>	12,7	13,2	1,0
<i>T. viride</i>	20,8	20,8	2,0
<i>T. roseum</i>	14,3	14,8	0,8
<i>Phomopsis</i> sp.	15,0	15,0	0,8
<i>Phoma</i> sp.	16,2	16,2	0,8
<i>M. verrucaria</i>	10,1	10,8	0,8

MIC i MFC vrednosti su preko 10 mg/ml za sve gljive, pri čemu je najveća test koncentracija od 22 mg/ml tj. 20 mg/ml neophodna za inhibiciju rasta *F. subglutinans*, odnosno *F. sporotrichioides* i *A. flavus* (MFC vrednosti su neznatno veće za pojedine gljive).

Statističkom analizom dobijenih rezultata antifungalne aktivnosti izdvojeno je nekoliko grupa gljiva među kojima postoje statistički značajne razlike u delovanju ovog ulja (Slika 48.).



Slika 48. MIC vrednosti etarskog ulja vetivera (mg/ml) na rast odabranih gljiva. Srednje vrednosti MIC i standardna greška su prikazani. *Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega

Veoma je malo podataka o antimikrobnoj aktivnosti etarskog ulja vetivera. U ispitivanjima antimikrobne aktivnosti 52 etarska ulja, etarsko ulje vetivera inhibiralo je rast samo Gram pozitivnih bakterija i *C. albicans* (Hammer *et al.*, 1999) i to najslabije od svih ispitivanih ulja. Prema Dweck (1994) β -eudesmol je odgovoran za baktericidnu aktivnost ovog ulja.

4.3. Sinergistička aktivnost etarskih ulja

Iako postoji niz radova o fungitoksičnim svojstvima isparljivih komponenata etarskih ulja, manja pažnja posvećena je fungitoksičnosti ovih supstanci u kombinaciji. Ove informacije su neophodne jer je pokazano da se fungitoksični potencijal većine fungicida povećava kada se kombinuju (Pandey and Dubey, 1992). Povećanje fungitoksičnog potencijala mešavine etarskih ulja može biti posledica udružene aktivnosti dve ili više komponenta etarskog ulja (Scardavi, 1966). Ovaj sinergizam bi imao prednost u postžetvenoj zaštiti jer patogeni mikroorganizmi ne mogu lako da steknu rezistentnost na više komponenti etarskih ulja.

U našem radu pratili smo aktivnost tri vrste mešavina od po dva etarska ulja na odabrane gljive: mešavinu etarskog ulja ruže i lavande, etarskog ulja origana i lavande i mešavinu etarskog ulja timijana i origana. U prve dve kombinacije ispitivali smo efekat mešavine jednog ulja koje je ispoljilo izrazit antifungalni potencijal (ulje ruže i origana), i lavandinog ulja koje je ispoljilo slabiji antifungalni potencijal u odnosu na prethodna dva. U trećoj kombinaciji pratili smo kako dva ulja sa izrazitim antifungalnim potencijalom deluju u kombinaciji na rast odabranih gljiva.

Tumačenje rezultata inetrakcije dva ulja se razlikuje u zavisnosti od autora. U našem radu, za interpretaciju rezultata sinergističke aktivnosti odabranih ulja koristili smo tumačenje prema da Silva *et al.*, (2011). Prema ovim autorima interakcija dva ulja se definiše kao sinergizam kada je frakcioni indeks inhibitorne koncentracije $FIC_{\text{indeks}} \leq 0.5$; indiferentni efekat kada je $FIC_{\text{indeks}} 0.5-2$ i antagonistički kada je $FIC_{\text{indeks}} \geq 2$. Ovi autori daju tumačenje efekata na sledeći način, što je korišćeno i u ovom radu:

Sinergistička aktivnost kombinacije dve komponente je prisutna ukoliko je aktivnost tj. efekat te kombinacije veći od aktivnosti (efekta) pojedinačnih komponenti.

Parcijalni sinergija/aditivni efekat definiše slučaj kada je efekat kombinacije dve komponente jednak zbiru efekata pojedinačnih komponenti.

Indiferentni efekat definiše onu kombinaciju kada je efekat kombinacije dve komponente jednak efektu najaktivnije komponente.

Antagonizam se javlja ako je efekat kombinacije dve komponente manji u poređenju sa efektom najaktivnije pojedinačne komponente.

4.3.1. Antifungalna aktivnost mešavine etarskih ulja ruže i lavande

Minimalne inhibitorne vrednosti ulja lavande i ulja ruže, kao i efikasnost njihove kombinacije, ispitivane na pet gljiva, prikazane su u Tabeli 17. Aktivnosti mešavine etarskih ulja ruže i lavande praćena je na sledeće gljive: *A. flavus*, *F. subglutinans*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides* i *Penicillium* sp.

Dobijeni rezultati pokazuju da je kombinacija ova dva ulja ispoljila značajan sinergistički antifungalni efekat na predstavnike roda *Fusarium*. Sinergistička aktivnost je utvrđena za *F. subglutinans* kada su ulja u odnosu $1/16 \times \text{MIC}$ etarskog ulja ruže i $1/4 \times \text{MIC}$ etarskog ulja lavande, dok je za druge dve *Fusarium* vrste sinergizam zabeležen u odnosu od $1/16 \times \text{MIC}$ za oba ulja (Tabela 17.). Takođe, rast *F. subglutinans*, koja je u ovim istraživanjima među najotpornijim gljivama na većinu etarskih ulja, uspešno je inhibiran kombinacijom ova dva ulja. Za inhibiciju rasta ove gljive, potrebne su najveće inhibitorne koncentracije oba ulja, kada su se ispitivala pojedinačno, dok su u kombinaciji potrebne mnogo niže vrednosti ($1/16 \times \text{MIC}$ etarskog ulja ruže i $1/4 \times \text{MIC}$ etarskog ulja lavande).

Tabela 17. Sinergistički efekat mešavine etarskih ulja ruže i lavande

Testirane gljive	MIC eu ruže mg/ml	FIC eu ruže	MIC eu lavande mg/ml	FIC eu lavande	FiCi eu ruže/ eu lavande
<i>A. flavus</i>	0,3	0,0625	4,6	1	1,0625
<i>F. subglutinans</i>	0,6	0,0625	6,8	0,25	0,3125
<i>F. equiseti</i>	0,32	0,0625	3,4	0,0625	0,125
<i>F. sporotrichioides</i>	0,28	0,0625	2,6	0,00625	0,0685
<i>Penicillium</i> sp.	0,3	0,0625	2,7	2,0	2,0625

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija etarskog ulja (eu); FIC – frakciona inhibitorna koncentracija eu; FiCi - frakcioni indeks inhibitorne koncentracije dva etarska ulja

Tumačenjem FiCi vrednosti prema da Silva *et al.*, (2011) aktivnost mešavine ulja ruže i lavande na rast *A. flavus* se može okarakterisati kao aditivni efekat. Kada je u pitanju *Penicillium* sp., aktivnost mešavine ova dva ulja je na granici između indiferentnog i aditivizma.

Može se primetiti da je MIC vrednost za ulje ruže u odnosu na sve testirane patogene gljive drastično manji, i do 50 puta kada se primenjuje u mešavini sa lavandinim uljem, osim za *F. subglutinans* gde je MIC vrednost smanjena 10 puta.

Kada je u pitanju lavandino ulje, značajno smanjenje MIC vrednosti kada je u kombinaciji sa uljem ruže, zabeleženo je za *F. subglutinans*, *F. equiseti*, a posebno za *F. sporotrichioides* (preko 400 puta).

4.3.2. Antifungalna aktivnost mešavina etarskih ulja timijana i origana

Kada je u pitanju mešavina dva pojedinačno izrazito aktivna etarska ulja, timijana i origana, može se primetiti dalje povećanje njihove antifungalne aktivnosti u odnosu na pojedinačnu aktivnost. Sem za *F. subglutinans*, mešavina ova dva ulja ispoljava znatnu sinergističku aktivnost na sve testirane gljive. FiCi vrednosti se kreću od 0,125 do 0,375. Uočava se i smanjenje MIC vrednosti oba ulja (FIC u tabeli) kada su u kombinaciji u odnosu na MIC vrednosti kada se ispituju pojedinačno.

Za vrlo otpornu gljivu *F. subglutinans* ni mešavina ova dva vrlo efikasna ulja nije ispolila poboljšanje u inhibiciji rasta, već antagonistički efekat. Rezultati aktivnosti mešavine etarskih ulja timijana i origana prikazani su Tabeli 18.

Tabela 18. Sinergistički efekat mešavine etarskih ulja timijana i origana

Testirane gljive	MIC ulje timijana mg/ml	FIC ulje timijana	MIC ulje origana mg/ml	FIC ulje origana	FiCi Timijan/ origano
<i>A. flavus</i>	0,65	0,0625	0,13	0,0625	0,125
<i>F. subglutinans</i>	0,88	2,0	0,16	4,0	6,0
<i>F. solani</i>	0,15	0,0625	0,13	0,0625	0,125
<i>F. semitectum</i>	0,18	0,125	0,27	0,25	0,375
<i>Penicillium sp.</i>	0,13	0,0625	0,27	0,0625	0,125

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija etarskog ulja (eu); FIC – frakciona inhibitorna koncentracija eu; FiCi - frakcioni indeks inhibitorne koncentracije dva etarska ulja

4.3.3. Antifungalna aktivnost mešavina etarskih ulja origana i lavande

Praćenjem rezultata antifungalne aktivnosti etarskih ulja origana i lavande može se reći da ova mešavina nije ispoljila tako dobru aktivnost kao prethodne. Sinergistički efekat ova dva ulja zabeležen je samo u odnosu na *F. subglutinans* i *F. semitectum*, dok se aktivnost ova dva ulja u odnosu na *A. flavus* i *F. solani* može definisati kao indiferentna. Sa FiCi vrednošću od 2,065 aktivnost mešavine ulja origana i lavande u odnosu na *A. alternata* je na granici između indiferentne i antagonizma (Tabela 19.).

Tabela 19. Sinergistički efekat mešavine etarskih ulja origana i lavande

Testirane gljive	MIC ulje origana mg/ml	FIC ulje origana	MIC ulje lavande mg/mg	FIC ulje lavande	FiCi origano/lavanda
<i>A. flavus</i>	0,13	1,0	4,6	0,0625	1,0625
<i>F. subglutinans</i>	0,16	0,0625	6,8	0,0625	0,125
<i>F. solani</i>	0,13	1,0	1,7	0,0625	1,0625
<i>F. semitectum</i>	0,27	0,0625	4,6	0,25	0,3125
<i>A. alternata</i>	0,27	0,0625	3,3	2,0	2,0625

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija etarskog ulja (eu); FIC – frakciona inhibitorna koncentracija eu; FiCi - fracioni indeks inhibitorne koncentracije dva etarska ulja

U slučaju indiferentnog efekta mešavine ova dva ulja na gljive *A. flavus* i *F. solani* može se primetiti porast MIC vrednosti ulja origana (FIC u tabeli) u odnosu na slučaj kada se ispituje samo. Kada je u pitanju inhibicija rasta ostalih gljiva primećuje se da ulje origana efikasnije deluje kada je u kombinaciji sa uljem lavande, tj. smanjuju se MIC vrednosti. Iz rezultata prikazanih u Tabeli 19. može se primetiti da se MIC vrednosti etarskog ulje lavande, takođe drastično smanjuju kada je u kombinaciji sa uljem origana (FIC ulja lavande) u odnosu kada deluje kao pojedinačno ulje.

Generalno, može se reći da su etarska ulja ispitivana u kombinaciji u našem radu uglavnom efikasnija u inhibiciji rasta većine fitopatogenih gljiva, nego pojedinačna i da im se uglavnom značajno smanjuju MIC vrednosti. Važan je podatak da je sinergistički efekat kombinacije ulja ispoljen u odnosu na gljive koje su pri ispitivanjima sa pojedinačnim etarskim uljima ispoljile veliku rezistentnost: *F. subglutinans*, *F. semitectum* i *A. flavus*.

Pojedine kombinacije ulja su ispoljile indiferentan efekat ili antagonizam na rast pojedinih testiranih gljiva, tako da su neophodna detaljna ispitivanja u ovom pravcu pri potencijalnoj formulaciji biofungicida na bazi kombinacije etarskih ulja. Ove informacije bi bile od velikog značaja jer je u praksi pokazano da se fungitoksičan potencijal fungicida značajno povećava kada se isti kombinuju (Tripathi and Dubey, 2004).

4.4. In vitro i in situ ispitivanja uticaja odabranih etarskih ulja na ukupan broj gljiva na biljnim drogama

U laboratoriji za mikrobiološku kontrolu Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, gde je obavljen najveći deo ovog rada, osnovna ispitivanja bazirana su na analizi mikrobiološke ispravnosti polu- i gotovih proizvoda, počev od osušene biljne droge kao početne sirovine za sve proizvode. Mikrobiološka ispravnost kako droge, tako i proizvoda, procenjuje se utvrđivanjem ukupnog broja aerobnih bakterija, ukupnog broja kvasaca i plesni, kao i specifičnih bakterija u odnosu na granične vrednosti zadate Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda (*“Sl. glasnik RS”, br. 45/2010, 27/2011 i 50/2012*). Kao što je ranije navedeno u ovom radu, utvrđeno je da je najveći uzrok mikrobiološke nečistoće biljnih droga kontaminiranost različitim gljivama.

Imajući ovo u vidu, isprobali smo efikasnost odabranih etarskih ulja, koja su pokazala dobru antifungalnu aktivnost u ovom radu, na redukciju ukupnog broja gljiva. Korišćene su droge koje su u ranijim ispitivanjima pokazale najveći stepen kontaminacije fitopatogenim gljivama: herba rastavića, herba i list nane i list koprive (Stević, 2009).

Za *in vitro* i *in situ* ispitivanja odabrali smo sledeća etarska ulja: etarsko ulje timijana, čubra, origana, ruže, čajnog drveta, korijandera, zdravca, lavande i anisa. U *in vitro* ispitivanjima, primenili smo SRPS ISO 21527-2 metodu, zadatu navedenim Pravilnikom, za utvrđivanje ukupnog broja kvasaca i plesni u uzorku droge dobijene iz Odeljenja prerade Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“. Utvrđena je izrazita redukcija ukupnog broja gljiva u svim uzorcima droge, tretiranim svim ispitivanim etarskim uljima. Kao najefikasnija pokazala su se etarska ulja čubra, timijana i origana koja su redukovala broj gljiva i do 100%. I ostala ulja znatno su inhibirala rast gljiva. Rezultati su prikazani u Tabeli 20.

Tabela 20. Redukcija ukupnog broja gljiva u uzorcima biljnih droga tretiranih etarskim uljima

Etarska ulja (eu)	test	nana	kopriva	rastavić	k.svila	neven
		ukupan broj gljiva pre tretmana				
		9×10^4	2×10^4	3×10^4	5×10^5	2×10^5
ukupan broj gljiva posle tretmana						
eu timijana	<i>in vitro</i>	0	0	0	0	0
	<i>in situ</i>	7×10^1	6×10^1	6×10^1	3×10^2	2×10^2
eu čubra	<i>in vitro</i>	0	0	0	0	0
	<i>in situ</i>	6×10^2	4×10^2	5×10^2	8×10^2	9×10^2
eu origana	<i>in vitro</i>	0	0	0	0	0
	<i>in situ</i>	2×10^2	6×10^1	9×10^1	3×10^2	2×10^2
eu ruže	<i>in vitro</i>	0	0	0	0	0
	<i>in situ</i>	2×10^2	9×10^1	6×10^1	3×10^2	4×10^2
eu čajnog drveta	<i>in vitro</i>	0	0	0	0	0
	<i>in situ</i>	4×10^2	10^2	9×10^1	5×10^2	5×10^2
eu korijandera	<i>in vitro</i>	3×10^1	10^1	2×10^1	5×10^1	4×10^1
	<i>in situ</i>	3×10^2	3×10^2	10^2	8×10^2	6×10^2
eu zdravca	<i>in vitro</i>	5×10^1	2×10^1	3×10^1	6×10^1	4×10^1
	<i>in situ</i>	3×10^3	6×10^2	2×10^3	6×10^3	4×10^3
eu lavande	<i>in vitro</i>	2×10^1	2×10^1	10^1	5×10^1	4×10^1
	<i>in situ</i>	4×10^2	5×10^2	3×10^2	10^3	6×10^2
eu anisa	<i>in vitro</i>	2×10^1	0	0	5×10^1	5×10^1
	<i>in situ</i>	7×10^2	5×10^2	5×10^2	10^3	7×10^2

Koncentracija za etarska ulja timijana, čubra, origana i ruže je 30 μ l/filter disku, za čajno drvo i anis 40 μ l/filter disku; za korijander i lavandu 50 μ l/filter disku, za etarska ulja zdravca 80 μ l/filter disku.

U *in situ* ispitivanjima koristili smo modifikovanu metodu isparavanja etarskog ulja sa filter papira u zatvorenoj kesici sa ispitivanom drogom, tzv. „pad delivery system“ tj. „soaking pad system“ (Plaza *et al.*, 2004; Arrebola *et al.*, 2007). Pre tretmana i posle 3, 5 i 7 dana, utvrđivan je ukupan broj gljiva u uzorcima prema navedenoj, ISO metodi. Rezultati ovih ispitivanja su pokazala da su sva etarska ulja značajno inhibirala ukupan broj gljiva na biljnoj drogi, između 97% i 99% (Tabela 20.).

Najveću efikasnost u redukciji ukupnog broja gljiva u testiranim uzorcima ispoljila su ulja timijana, origana i ruže. Neznatno manju inhibitornu aktivnost u *in situ* uslovima ispoljila su etarska ulja čubra, korijandera, zdravca i lavande. Aplikacijom rastućih koncentracija ispitivanih ulja na filter papir postavljen u kesicu sa drogom pokazano je da je koncentracija od 30 μ l po filter disku (isečen u prečniku 1cm) ulja timijana, origana i ruže redukovala ukupan broj gljiva preko 50%. Pri istoj koncentraciji etarskog ulja čubra zapažen je neznatno veći ukupan broj gljiva što je u suprotnosti sa *in vitro* istraživanjima, kao i ispitivanjima minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Etarsko ulje čubra je pri najnižim MIC vrednostima u odnosu na sva ulja potpuno

inhibiralo rast svih gljiva. Etarsko ulje čajnog drveta i anisa su redukovali broj gljiva sa oko 50% pri koncentraciji od 40 μl /filter disku, a za ulje korijandera i lavande značajna redukcija bila je zabeležena pri koncentraciji od 50 μl /filter papiru. Najveća koncentracija za značajniju redukciju gljiva u *in situ* uslovima bila je neophodna za ulja lavande i zdravca (80 μl /filter papiru) (Tabela 20.).

Na osnovu rezultata dobijenih u našem radu, kao i literaturnih podataka, može se pretpostaviti da bi odabrana etarska ulja čubra, timijana, origana i ruže bila efikasna u biokontroli skladišnih gljiva sa biljnih droga putem fumigacije. Bilo bi neophodno, ispitati organoleptička svojstva droge nakon fumigacije, kao i utvrditi eventualno prisustvo rezidua. Primena etarskih ulja i pojedinih aktivnih komponenti na ovaj način u mnogome bi doprinelo rešavanju problema mikrobiološki nesipravne droge usled kontaminacije patogenim gljivama.

4.5. Uporedna analiza antifungalne aktivnosti etarskih ulja u *in vitro* testovima

Na osnovu dobijenih rezultata analize antifungalnog potencijala 22 etarska ulja može se reći da su sva etarska ulja ispoljila inhibitorni efekat na rast svih odabranih gljiva izolovanih sa biljnih droga, sa značajnim razlikama u toj aktivnosti.

Pojedina etarska ulja svrstana su u grupe prema hemijskoj sličnosti. Kriterijum za podelu ulja prema antifungalnoj efikasnosti je bila aktivna doza, tj., vrednost MIC. Etarska ulja čubra, origana i timijana su bila najaktivnija u smislu inhibicije svih fitopatogenih gljiva tj. ispoljila su najjači antifungalni potencijal pri najnižoj koncentraciji, znatno jači od komercijalnog mikotika, flukonazola. Neznatno manju aktivnost ispoljilo je etarsko ulje ruže, a odmah potom i ulja anisa i čajnog drveta. Po dobroj antifungalnoj aktivnosti istakla su se i etarska ulja zdravca, lavande, korijandera, bergamota, ljubičice i ruzmarina. Nešto manju, ali još uvek dobru aktivnost, ispoljila su etarska ulja cimeta i bibera. Umerenu do slabu inhibitornu aktivnost na rast testiranih gljiva ispoljila su etarska ulja bosiljka, dalmatinske i španske žalfije. U odnosu na sintetički fungicid, slabu aktivnost pokazala su etarska ulja eukaliptusa, limuna i narandže, dok je najslabija antifungalna aktivnost zabeležena za etarska ulja kamilice i vetivera.

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 (Nychas, 1995). 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 (Kalemba and Kunicka, 2003; Carmo *et al.*, 2008a; Zuzarte *et al.*, 2011). Takođe je pokazano da etarska ulja mogu remetiti aktivnost membrane mitohondrija što je povezano sa remećenjem enzimatskih reakcija kao što je transport elektrona u procesu respiracije, transport proteina i fosforilacija ADP-a (Atanda *et al.*, 2006; Carmo *et al.*, 2008b).

Utvrđeno je da glavne komponente etarskih ulja prilično dobro reflektuju biofizičke i biološke karakteristike ulja i da intenzitet antimikrobnog delovanja ulja zavisi od koncentracija glavnih komponenata (Ipek *et al.*, 2005). Međutim, potvrđeno je da na antimikrobnu aktivnost etarskih ulja mogu uticati procentualno manje zastupljena jedinjenja.

Smatra se da na aktivnost komponenata etarskih ulja glavni uticaj ima lipofilni karakter ugljovodoničnog skeleta i hidrofilni karakter funkcionalnih grupa. Prema literaturnim podacima fenolne komponente pokazuju najjaču antifungalnu aktivnost među svim komponentama etarskih ulja. Za fenolima po antifungalnom potencijalu slede alkoholi, a za njima aldehidi i ketoni. Monoterpenški ugljovodonic i acetati poseduju najslabiju antifungalnu aktivnost. Njihova nerastvorljivost u vodi i nizak kapacitet stvaranja vodoničnih veza, uzrok je male antifungalne aktivnosti (Kalemba and Kunicka, 2003). Od fenilpropana, eugenol poseduje izrazito dobru antifungalnu aktivnost, a ostali dobru do umerenu.

U odabranim etarskim uljima, ispitivanim u ovom radu, hemijskom analizom identifikovani su mono- i seskviterpeni, kao i fenilpropani. Među monoterpenima, prema procentualnom udelu, kao dominantne komponente se izdvajaju: a) fenoli (npr. karvakrol i timol), b) ugljovodonic (limonen, α - i β -pinen, p-cimen, γ -terpinen), c) alkoholi (linalol, geraniol, citrenol, terpinen-4-ol, borenol), d) oksidovani alkoholi (1,8-cineol), e) aldehidi (citronelal, geranial, neral), f) ketoni (kamfor, fenhon, tujon, karvon)

i acetati (npr. bornil- i linalil acetat). Od seskviterpena identifikovani su: a) ugljovodonici (npr. E ili (β)-kariofilen, hamazulen, farnesen), b) alkoholi (bisabolol), c) oksidovani alkoholi (bisabolol oksid). Fenilpropanska jedinjenja koja su identifikovana su cimetaldehid, metilhavikol, eugenol i anetol.

Nivo aktivnosti etarskih ulja ispitivanih u ovom radu u skladu je sa navedenim podacima o stepenu aktivnosti pojedinačnih komponenti. Naime, može se reći da je najbolja antifungalna aktivnost etarskih ulja čubra, timijana i origana posledica aktivnosti dominantnih fenolnih komponenti, karvakrola i timola, za koje je navedeno da poseduju najviši antifungalni potencijal među svim komponentama etarskih ulja (Kalemba and Kunicka, 2003).

Antimikrobna aktivnost fenolnih jedinjenja pripisuje se prisustvu aromatičnog jezgra i aktivnosti OH grupe koja formira vodonične veze sa aktivnim mestima ciljnih enzima ćelijskog zida gljiva kao što su hitinaza i α - i β -glukanaza čime posredno oštećuju hitinski sloj, a time se obezbeđuje nesmetani prolaz pojedinačnih komponenti ili etarskih ulja u unutrašnjost ćelije (Velluti *et al.*, 2005; Amini *et al.*, 2012). Fenoli mogu reagovati i sa proteinima citoplazmatične membrane, uzrokujući deformacije u njihovoj strukturi i funkcionalnosti, a takođe mogu narušiti enzimske procese ćelije, uključujući i one koje učestvuju u produkciji energije i sintezi strukturnih jedinjenja (Ultee *et al.*, 2002). Generalno, inhibitorna aktivnost fenolnih komponenata, karvakrola i timola, na rast micelije i produkciju mikotoksina može se pripisati njihovoj sposobnosti da povećavaju permeabilnost ćelijske membrane mikroorganizama omogućavajući na taj način gubitak makromolekula iz unutrašnjosti ćelije (Ultee *et al.*, 2002; Mahmoudi and Kazempour, 2011). Prema ovim autorima karvakrol i timol direktno deluju na membranu dezintegrišući je, i u veoma malim koncentracijama ($>1\mu\text{l/ml}$) inhibiraju fosforilaciju ADP-a u ćelijama gljiva. Davidson (2001) iznosi pretpostavku da timol i karvakrol mogu da remete i funkcionalnost genetičkog materijala.

Kako je dokazana sinergistička aktivnost između timola i karvakrola (Didry *et al.*, 1993), međusobna interakcija ovih fenolnih komponenti ima važnu ulogu u ostvarenju ukupne antifungalne aktivnosti etarskih ulja u čiji sastav ulaze. Na osnovu svega navedenog, kao i u činjenici da je karvakrol, kao dominantna komponenta, zastupljeniji u etarskom ulju čubra i origana nego u ulju timijana i da ispoljava bolji

antifungalni potencijal od timola, može se tražiti objašnjenje za njihovu neznatno veću antifungalnu aktivnost od ulja timijana utvrđenu u ovom radu.

Veoma dobra antifungalna aktivnost utvrđena je i za etarska ulja u kojima dominiraju monoterpeni alkoholi. Tako se dobar antifungalni efekat etarskih ulja ruže i zdravca može pripisati dominaciji citronelola i geraniola, a etarskog ulja čajnog drveta, terpinen-4-ola. Slično ovome, pretpostavlja se da visok udeo alkohola linalola utiče na dobru aktivnost ulja lavande i korijandera, dok oksidovani alkohol 1,8-cineol određuje dobru inhibitornu aktivnost ulja ruzmarina. Smatra se da su monoterpeni alkoholi posebno aktivni zbog njihove relativno visoke rastvorljivosti u vodi i prisustva alkoholne grupe (Griffin *et al.*, 1999; Dorman and Deans, 2000), i da dobru antifungalnu aktivnost ostvaruju interakcijom sa ćelijskom membranom (Vardar *et al.*, 2003; Imelouane *et al.*, 2009). Pri relativno niskim koncentracijama, ove interakcije mogu dovesti do promena u propustljivosti membrane (Uribe *et al.*, 1985; Cox *et al.*, 2000) i inhibicije respiracije (Uribe *et al.*, 1985). Pri većim koncentracijama može doći do totalnog gubitka homeostaze, oštećenja membrane i smrti ćelije (Carson *et al.* 2002). Mada se linalol razlikuje od ostalih monoterpenih alkohola jer je acikličan, ispoljava značajnu antifungalnu aktivnost. Ovo sugerise da prisustvo alkoholne grupe mnogo više determiniše antifungalnu aktivnost jedinjenja nego ciklična ili aciklična struktura (Adegoke *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2001; Inouye *et al.*, 2001).

Oksidovani monoterpeni, kao što je 1,8-cineol, ispoljavaju različit stepen citotoksičnosti. Kao tipične lipofilne komponente, prolaze kroz citoplazmatičnu membranu gljivičnih ćelija i remete njenu strukturu kao i transport jona. Takođe je pokazano da ometaju procese disanja na membranama mitohondrija (Deba *et al.*, 2008).

Dobru inhibitornu aktivnost na rast svih ispitivanih gljiva pokazalo je i etarsko ulje bergamota u čijem sastavu dominiraju monoterpeni ugljovodonik limonen i acetat, linalol acetat, za koje je utvrđen najslabiji antifungalni efekat među svim komponentama etarskih ulja. Može se pretpostaviti da je dobrom inhibitornom efektu ovog ulja doprinelo prisustvo manje zastupljenih komponenti, linalola i γ -terpinena za koji je potvrđen dobar antifungalni potencijal (Mahboubi and Kazempour, 2011).

U grupu ulja sa veoma dobrom antifungalnom aktivnošću spada i etarsko ulje anisa sa dominantnom komponentom E-anetolom (fenilpropan) za koji je dokazana

dobra antifungalna aktivnost. Visok inhibitorni potencijal u redukciji rasta svih ispitivanih gljiva pokazalo je i etarsko ulje ljubičice u čijem sastavu dominira triacetat.

U kategoriju ulja sa dobrim do umerenim antifungalnim potencijalom svrstavaju se etarska ulja cimeta i crnog bibera što se može pripisati dominaciji komponenti za koje je potvrđeno da poseduju dobar do umeren antifungalnim potencijal. Za ulje cimeta to je fenilpropan, cinamaldehyd, dok je u ulju bibera skoro podjednak udeo, β -pinena i limonena, monoterpena sa umerenim do niskim antifungalnim potencijalom, i seskviterpena, E-kariofilena, sa izrazitom antifungalnom aktivnošću. Aktivnost etarskog ulja ne može se pripisati samo dominantnim komponentama, već i njihovoj složenoj ineterakciji, kao i manje zastupljenim jedinjenjima (Chang *et al.*, 2008).

Umeren do slab antifungalni potencijal etarskog ulja bosiljka može se pripisati dominaciji metil havikola, fenilpropana sa umerenim do slabim antifungalnim efektom na rast gljiva. Slabija antifungalna aktivnost metil havikola objašnjava se manjom rastvorljivosti u vodi koja je važna za mogućnost penetriranja kroz ćelijski zid bakterija ili gljiva (Suppakul *et al.*, 2003).

U etarskim uljima španske i dalmatinske žalfije, a posebno eukaliptusa, limuna i narandže, dominiraju monoterpeni ugljovodonici te se ovakvom hemijskom sastavu može pripisati i njihov slabiji inhibitorni efekat na rast testiranih ulja. Monoterpeni ugljovodonici γ -terpinen, α -terpinen, terpinolen, *p*-cimen, limonen i α -felandren su manje aktivni od prethodnih grupa monoterpena (fenola i alkohola). U radu Dorman and Deans (2000) α -pinen i β -pinen su ispoljili umerenu antifungalnu aktivnost, posebno β -pinen, za razliku od istraživanja Soković (2001) gde su ispoljili neznatnu antifungalnu aktivnost. Utvrđeno je da monoterpeni ugljovodonici, kao i oksidovani monoterpeni, mogu da remete ćelijski integritet, stvaraju prekide u plazma membrani i inhibiraju transport jona i proces respiracije na membrani mitohondrija (Deba *et al.*, 2008; Imelouane *et al.*, 2009). Tako je utvrđeno da β -pinen može da deluje na membranu kvasca dovodeći do manjka K^+ i H^+ jona ili oštećuje mitohondrije time što dovodi do deenergizacije organele usled prestanka respiracije (Uribe *et al.*, 1985). Neki od pomenutih monoterpenih ugljovodonika, kao što su α -pinen, β -pinen, γ -terpinen i limonen povećavaju propustljivost plazma membrane što dovodi do povećanja pH gradijenta i elektrohemijskog potencijala, a svaki od ovih procesa je od osnovnog značaja za energetske sistem ćelije (Sun *et al.*, 2007). Među nabrojanim monoterpenima,

γ -terpinen, biološki prekursor timola i karvakrola, pokazuje najbolju antifungalnu aktivnost (Imelouane *et al.*, 2009).

S druge strane, drugi prekursor fenola, *p*-cimen, prisutan u etarskim uljima čubra i timijana sa 12%, odnosno 23%, ne ispoljava antimikrobnu aktivnost ali povećava antimikrobnu aktivnost fenolnih komponenti. Smatra se da *p*-cimen sa fenolnim komponentama ispoljava sinergističku inhibitornu aktivnost na rast gljiva (Soto-Mendivil *et al.*, 2008; Mahmoudi and Kazempour, 2011). Naime, *p*-cimen uzrokuje širenje citoplazmatične membrane, a u kombinaciji sa karvakrolom inkorporira se u citoplazmatičnu membranu čime se olakšava transport karvakrola kroz istu (Mihajilov-Krstev *et al.*, 2009). Takođe, smatra se da *p*-cimen deluje i na aktivnost mitohondrija tj. smanjuje potencijal membrane mitohondrija, smanjuje stopu fosforilacije ADP-a i stimuliše potrošnju kiseonika posle fosforilacije ADP-a (Custódio *et al.*, 2011).

Etarska ulja žalfije, iako su izolovana iz dve vrste istog roda *Salvia*, ispoljila su različit stepen inhibitorne aktivnosti u odnosu na rast testiranih gljiva. Dok je ulje dalmatinske žalfije ispoljilo dobar do umeren antifungalni potencijal, etarsko ulje španske žalfije ispoljilo je umeren do slabiji potencijal. Bolja aktivnost etarskog ulja dalmatinske žalfije verovatno je posledica većeg udela komponenti sa dokazanim antifungalnim potencijalom kao što su tujoni i monoterpeni alkoholi, 1,8-cineol i borneol (Tabanca *et al.*, 2001.). U etarskom ulju španske žalfije preovlađuju komponente sa umerenim ili slabim antifungalnim potencijalom kao što su kamfor (monoterpeni keton) i monoterpeni hidrokarboni, α -pinen i limonen (Soković, 2001), kao i acetati za koje je dokazana najslabija antifungalna aktivnost od svih komponenti etarskih ulja. Džamić *et al.* (2008) su sugerisali da postoji veza između većeg prisustva linalol acetata u etarskom ulju *Salvia sclarea* i njegove umerene antifungalne aktivnosti.

Dominacija monoterpenog ugljovodonika limonena sa slabim antifungalnim potencijalom verovatno je uzrok slabe antifungalne aktivnosti etarskih ulja eukaliptusa, limuna i narandže.

Najslabiju inhibitornu aktivnost u odnosu na rast svih testiranih fitopatogenih gljiva ispoljila su etarska ulja kamilice i vetivera u kojima dominiraju seskviterpeni ugljovodonici sa slabijim antifungalnim potencijalom.

Statističkom analizom dobijenih rezultata pokazano je da su pojedina ulja delovala ujednačeno na sve testirane gljive. Izdvaja se grupa od 4 etarska ulja, čubra, origana, timijana i ruže, između kojih nema statistički značajne razlike u antifungalnoj aktivnosti na gotovo sve testirane fitopatogene gljive. Statistička analiza antifungalne aktivnosti svih ulja na pojedinačne testirane gljive prikazana je u Prilogu 3 (Tabela 36).

Rezultati statističke analize (Prilog 3) delovanja svih etarskih ulja na pojedinačne gljive ukazuju na to da su među vrstama roda *Fusarium*, *F. subglutinans*, *F. semitectum* i *F. sporotrichioides*, generalno 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*, *T. roseum*, *V. dahliae*, donekle i *Phomopsis* sp. i *Phoma* sp. Takođe je uočljivo da je *A. niger* osetljivija na većinu etarskih ulja od *A. flavus*.

Dobijeni rezultati su pokazali da pojedina odabrana etarska ulja predstavljaju dobru osnovu za potencijalnu formulaciju biofungicida koji bi se mogao koristiti u biološkoj kontroli fitopatogenih gljiva, najpre fumigacijom biljnih droga. Kako su etarska ulja isparljiva jedinjenja, fumigacija se prema literaturnim podacima, pokazala kao efikasan vid primene etarskih ulja u kontroli patogenih gljiva na uskladišetnom voću.

4.6. Antifungalna aktivnost izolata *Bacillus* sp.

4.6.1. Ispitivanja antagonističkog potencijala različitih izolata *Bacillus* sp.

Pokazano je da bakterije iz rodova *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Enterobacter* i dr., imaju sposobnost inhibicije rasta različitih fitopatogenih gljiva različitim mehanizmima (Sharma *et al.*, 2009; Toure *et al.*, 2004; Pal and Gardener, 2006; Protolipac *et al.*, 2011). Rezultati istraživanja ukazuju na visoku efikasnost vrsta roda *Bacillus*, posebno *B. subtilis* i srodne *B. amyloliquefaciens*, u biokontroli različitih bolesti biljaka, voća i povrća uzrokovanih zemljišnim ili postžetvenim patogenim gljivama (Toure, 2004; Ćirić *et al.*, 2011; Jošić *et al.*, 2011; Živković, 2011). Posebna pažnja posvećena je izolatima *Bacillus* sp. koji svoju antagonističku aktivnost, između ostalog, ispoljavaju sintezom metabolita sa visokom antimikrobnom aktivnošću.

Naša istraživanja bila su usmerena na *in vitro* ispitivanja antagonističkog potencijala 14 različitih izolata *Bacillus* sp., izolovanih sa različitih staništa Srbije, prema fitopatogenim gljivama testiranim u prethodnim ispitivanjima antifungalnog potencijala etarskih ulja.

Inhibitorno delovanje različitih izolata *Bacillus* sp. ispitivano je testovima dvojne kultivacije gajenjem kultura fitopatogenih gljiva u kombinaciji sa odgovarajućim antagonistom na istoj Petrijevoj šolji. Na početku je urađen skrining test u kome je ispitivana osetljivost svih gljiva na sve odabrane *Bacillus* sp. izolate. Pokazano je da su pojedine gljive bile potpuno neosetljive, tj., da na rast micelije nije uticalo prisustvo izrasle bakterije. Najveću rezistentnost na sve izolate *Bacillus* sp. ispoljila je *F. sporotrichioides*, nezavisno od toga da li je izolovana sa koprive ili nane, a nešto manju i *F. solani* izolovana sa listova i herbe rastavića. Pojedine vrste gljiva ispoljile su selektivnu oseljivost na neke od testiranih bakterijskih izolata tj. ispoljile su manju ili veću oseljivost, ili su bile potpuno rezistentne na pojedine izolate.

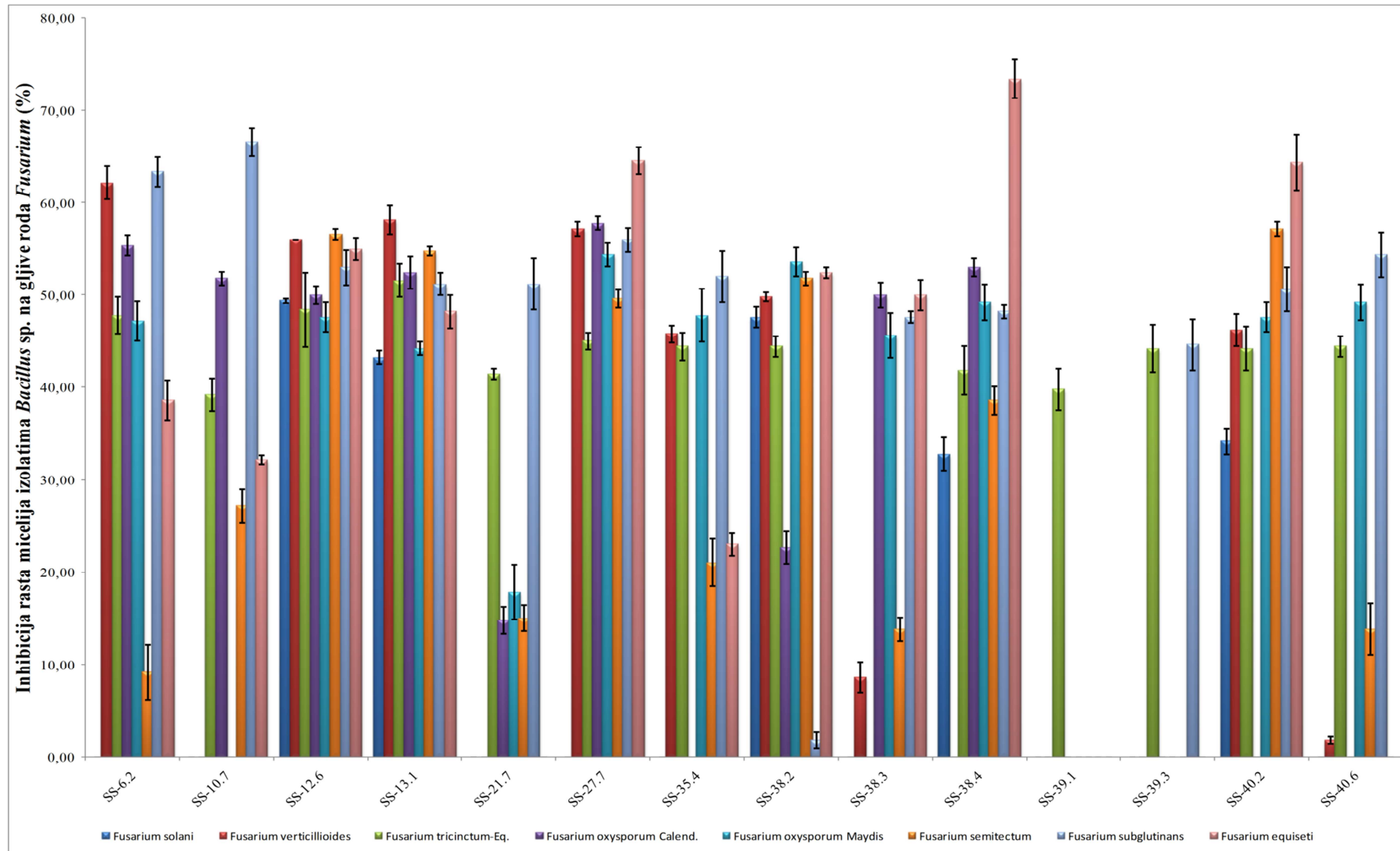
Na osnovu rezultata skrining ispitivanja odabrane su sledeće gljive za dalji rad: *F. solani*, *F. verticillioides*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum* (izolovane sa nevena i kukuruzne svile), *F. semitectum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti*, *A. alternata*, *G. roseum*, *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium* 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*.

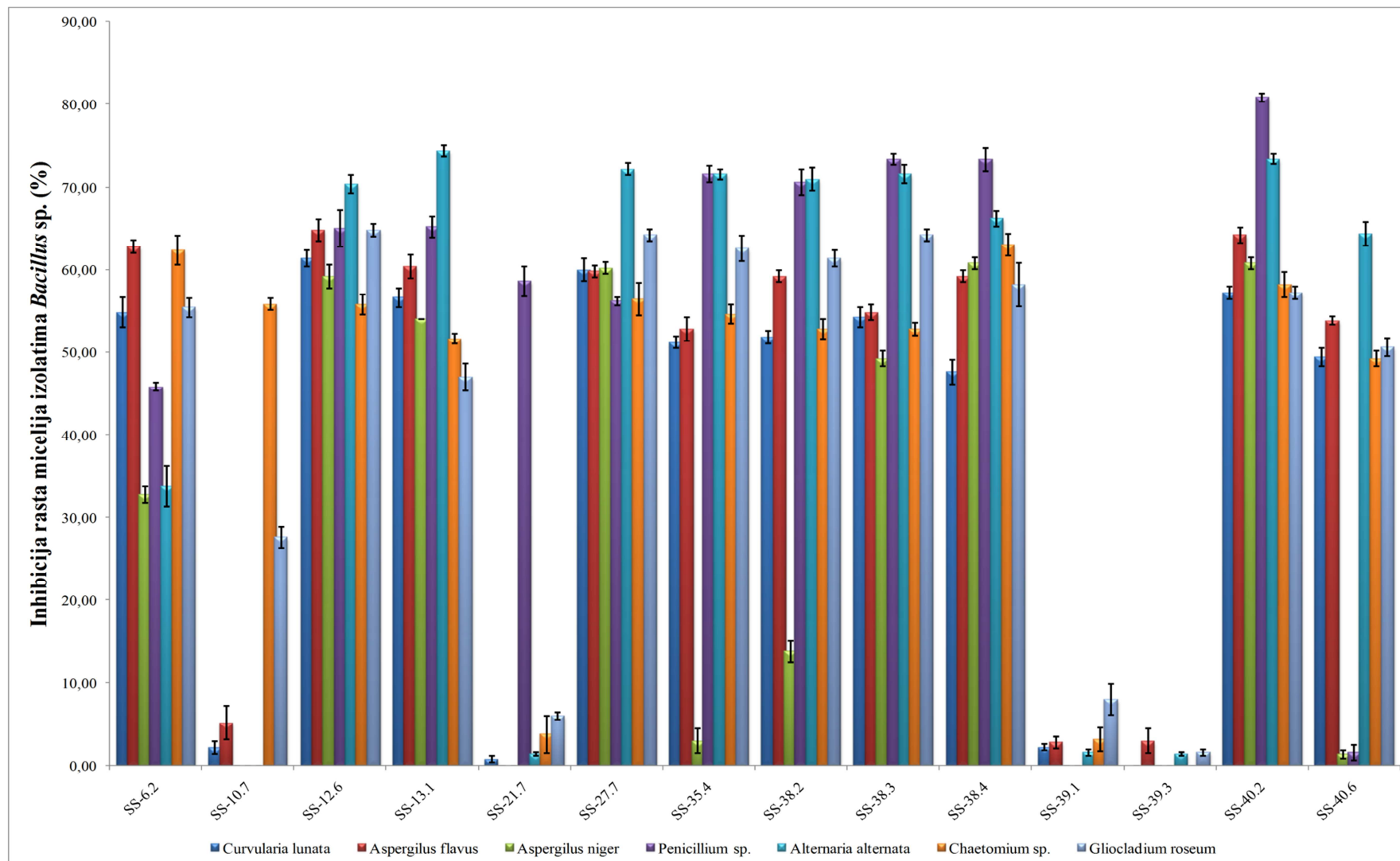
Rezultati ispitivanja antagonističke aktivnosti svih 14 izolata *Bacillus* sp. na rast odabranih fitopatogenih gljiva prikazani su na slikama 49. i 50. Antagonisti su svrstani u odgovarajuću kategoriju inhibicije rasta (GIC).

Testirani *Bacillus* sp. izolati su ispoljili različit stepen inhibicije prema različitim vrstama testiranih gljiva. Izolati SS-39.1 i SS-39.3 u ogledima dvojne kultivacije manifestuju najslabiji antagonistički efekat prema gotovo svim patogenima. Odstupanje je zabeleženo za *F. tricinctum*, izolovan sa rastavića, na koji su ovi izolati ispoljili umerenu aktivnost inhibicijom rasta micelije oko 40% (GIC 2). Izvesnu osetljivost na izolat SS-39.3, ispoljila je i *F. subglutinans* čiji je rast bio inhibiran sa 44.6%, dok je na izolat SS-39.1 potpuno rezistentna (Slika 49).

Izolat SS-21.7 nije ispoljio značajniji antagonizam prema većini testiranih gljiva. Od vrsta roda *Fusarium* značajnije je inhibirao rast *F. subglutinans* (preko 50%), nešto manje *F. tricinctum*. Od predstavnika drugih rodova testiranih gljiva izuzetak je zabeležen samo u slučaju *Penicillium* sp. čiji je rast inhibiran ovim izolatom sa 58.6% (Slika 50).



Slika 49. Efekat izolata *Bacillus* sp. na rast vrsta roda *Fusarium*. Prikazane su srednje vrednosti procenta inhibicije rasta i standardna devijacija.



Slika 50. Efekat izolata *Bacillus* sp. na rast odabranih gljiva. Prikazane su srednje vrednosti procenta inhibicije rasta i standardna devijacija.

Slično, veoma različit efekat na rast ispitivanih gljiva ispoljio je i izolat SS-10.7. Visoku antagonističku aktivnost ispoljio je samo prema *F. subglutinans* i *F. oxysporum* (izolovan sa nevena) inhibicijom rasta od 67%, odnosno 52% (GIC 3), dok je prema ostalim vrstama ovog roda ispoljio blag antagonizam inhibicijom rasta njihovih micelijuma sa oko 30%, ili je efekat potpuno izostao (Slika 49). Od predstavnika drugih rodova gljiva, izolat SS-10.7 je ispoljio značajniji antagonizam samo prema *Chaetomium* sp. inhibicijom rasta micelije od 56% (Slika 50).

Selektivna antagonistička aktivnost utvrđena je i za izolat SS-40.6 koji je od *Fusarium* vrsta umeren antagonizam ispoljio, kao i izolat SS-10.7, prema *F. subglutinans* i *F. oxysporum*. Ovaj izolat nije inhibirao rast micelija *A. niger* i *Penicillium* sp., dok je prema ostalim gljivama ispoljio umeren antagonistički potencijal inhibirajući rast njihovih micelija od 37% do 54%. Najjaču antagonističku aktivnost ispoljio je na rast *A. alternata* sa PIG od 64%.

Ostali ispitivani izolati *Bacillus* sp., SS-6.2, SS-12.6, SS-13.1, SS-27.7, SS-35.4, SS-38.2, SS-38.3, SS-38.4 i SS-40.2 su ispoljili dobru ili jaku antagonističku aktivnost prema fitopatogenim gljivama, inhibirajući rast micelija pojedinih gljiva i preko 70% (GIC 4). Većina ovih izolata ispoljili su, među vrstama svih rodova izuzev *Fusarium*, najsnažniji antagonizam prema *A. alternata* i *Penicillium* sp. inhibicijom rasta preko 70%. Obe vrste gljiva ispoljile su nešto manju osetljivost na izolat SS-6.2 (Slika 50). Najslabiji antagonistički potencijal utvrđen je prema *A. niger* koji je tolerantan na izolate SS-6.2, SS-35.4 i SS-38.2.

Najjaču antagonističku aktivnost, na vrste roda *Fusarium*, ispoljili su izolati SS-12.6, SS-13.1 i SS-27.7 inhibicijom rasta većine testiranih gljiva sa preko 50%. Ostali izolati, SS-6.2, SS-40.2, SS-35.4, SS-38.2 i SS-38.4 ispoljavaju selektivnu antagonističku aktivnost prema *Fusarium* vrstama, od redukcije rasta micelije do 74%, do potpunog izostanka inhibitorne aktivnosti, u zavisnosti od gljive i izolata *Bacillus* sp.

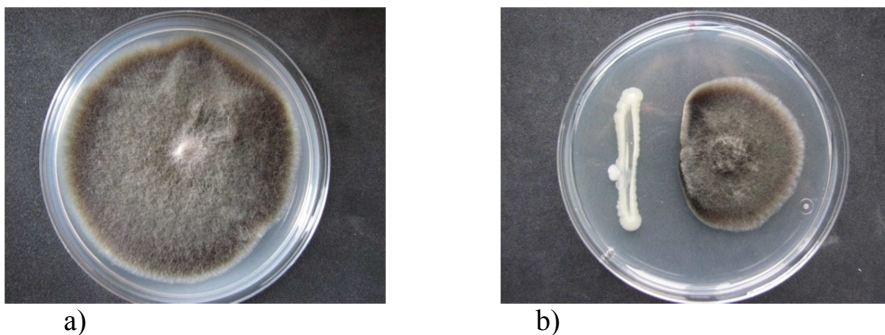
Generalno, može se reći da su najmanju osetljivost na većinu ovih izolata ispoljile *F. solani* i *F. verticillioides*, a najveću *F. subglutinans* i *F. equiseti* (Slika 49).

Interesantni rezultati dobijeni su za *F. oxysporum*, za koju je utvrđeno da su sojevi izolovani iz dve biljne droge (cvetova nevena i kukuruzne svile), različito osetljivi na pojedine *Bacillus* sp. izolate. Naime, soj *F. oxysporum* izolovan sa cvetova nevena potpuno je rezistentan na izolate SS-35.4, SS-40.2 i SS-40.6, dok je rast soja

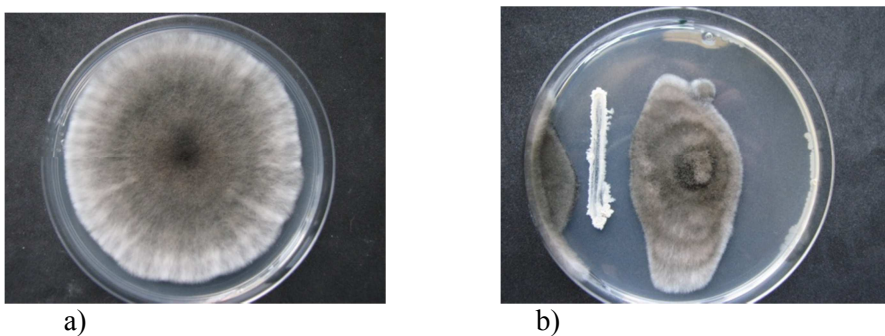
izolovog iz kukuruzne svile inhibiran sa preko 40%, istim sojevima (GIC 2). Ovaj soj je ispoljio i dvostruko veću otpornost na izolat SS-38.2 u odnosu na soj sa cvetova nevena.

Antagonizam pojedinih izolata *Bacillus* sp. na *Fusarium* vrste prikazan je na Slici 49. Uporednom 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.

Posmatranjem micelije svih testiranih gljiva u dualnom testu pod elektronskim mikroskopom primećene su izvesne promene jedino delovanjem izolata SS-38.4 na nekim gljivama. Ovaj izolat inhibirao je klijanje konidija kod *F. equiseti*, dok je kod *F. tricinctum* uočen neobičan oblik mikrokonidija, kao i formiranje hlamidospora koje se inače stvaraju pri nepovoljnim spoljašnjim uslovima. Osim navedenog, uočeno je i smanjenje cele micelije *A. alternata* u interakciji sa izolatom SS-40.2 (Slika 51), kao i *C. lunata* sa izolatom SS-12.6 (Slika 52).



Slika 51. Efekat izolata *Bacillus* sp. SS-40.2 prema *A. alternata*. a) kontrola; b) dualni test



Slika 52. Efekat izolata *Bacillus* sp. SS-12.6 prema *Curvularia lunata*. a) kontrola; b) dualni test

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.

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 sintetisu uz pomoć velikih multienzimskih kompleksa, a ne ribozomalno, ispoljavaju širok antimikrobni spektar i izuzetnu surfaktantsku aktivnost (Magnet-Dana and Peypoux 1994; Vollembroich *et al.* 1997). Iturini i fengicini ispoljavaju jaku antifungalnu aktivnost kroz potpunu inhibiciju rasta širokog spektra biljnih patogena (Klich *et al.*, 1994), dok surfaktini ispoljavaju izvestan sinergistički efekat na antifungalnu aktivnost iturina A (Maget-Dana *et al.*, 1992). Prema Marrone (2002) surfaktini, u manjoj količini (10 ppm), značajno inhibiraju formiranje spora i germinativnih tuba u kombinaciji sa iturinima. Novija istraživanja ukazuju i na antifungalnu aktivnost surfaktina (Vitullo *et al.*, 2012).

Kod svih 14 testiranih izolata *Bacillus* sp. potvrđeno je prisustvo gena uključenih u sintezu lipopeptida iz familije iturina, surfaktina i fengicina, izuzev izolata SS-12.6 i SS-13.1 kod kojih je primećeno odsustvo gena za produkciju fengicina (Stanković *et al.*, 2012). To daje za mogućnost da je produkcija lipopeptida odgovorna za antifungalni efekat izolata, mada se, kao što je rečeno, ne može isključiti učešće drugih mehanizama antagonizma pošto su testirane pune kulture bakterija.

U cilju potvrde hipoteze da su lipopeptidni antibiotici odgovorni za dobru antifungalnu aktivnost izolata *Bacillus* sp., u dalja istraživanja uključili smo ekstrakte lipopeptidnog sastava izolovane iz sojeva SS-12.6 i SS-13.1, čime su eliminisani ostali potencijalni mehanizmi antagonizma. Prema literaturnim podacima, tretman voća lipopeptidnim ekstraktima *B. subtilis* GA1 soja ispoljio je snažan protektivan efekat sličan tretmanu kulturom bakterija, u odnosu na gljive uzročnike truljenja (Toure *et al.*,

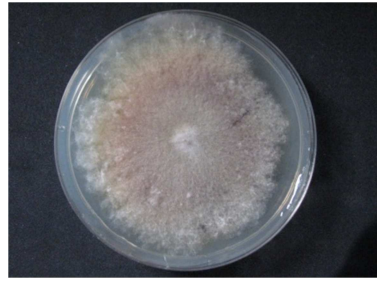
2004). Podjednako dobra efikasnost lipopeptidnog ekstrakta kao i vegetativnih ćelija ukazuje na njegovu ulogu u aktivnosti kompletnog soja kao agensa biokontrole.

Rezultati ispitivanja antifungalnog efekta lipopeptidnih ekstrakata izolata SS-12.6 i SS-13.1 na testirane gljive izolovane sa lekovitog bilja prikazani su u Tabeli 21., uporedo sa antagonističkim potencijalom izolata *Bacillus* sp. iz kojih su izolovani.

Tabela 21. Antifungalni efekat izolata *Bacillus* sp. SS-12.6 i SS-13.1 i njihovih lipopeptidnih ekstrakata (izraženo u % inhibicije rasta)

Gljive	izolat SS-12.6	ekstrakt 12.6	izolat SS-13.1	ekstrakt 13.1
<i>F. solani</i>	50	21	43	0
<i>F. verticillioides</i>	56	54	58	26
<i>F. tricinctum</i> - rastavić	48	1,5	52	34
<i>F. oxysporum</i> - neven	50	58	52	18
<i>F. oxysporum</i> – k.svila	48	42	44	8
<i>F. semitectum</i>	57	53	55	8
<i>F. subglutinans</i>	53	75	51	20
<i>F. equiseti</i>	55	56	48	34
<i>C. lunata</i>	61	46	56	15
<i>A. flavus</i>	65	6	60	0
<i>A. niger</i>	59	33	54	0
<i>Penicillium</i> sp.	65	72	65	71
<i>A. alternata</i>	70	70	74	26
<i>Chaetomium</i> sp.	56	73	52	17
<i>G. roseum</i>	65	9	47	0

Ispitivanjem aktivnosti lipopeptidnog ekstrakta izolovanog iz *Bacillus* sp. SS-12.6 može se uočiti da je veoma efikasan u inhibiciji rasta testiranih gljiva (Tabela 21, Slika 53.). Rast micelija pojedinih gljiva inhibiran je ovim ekstraktom preko 70% (*A. alternata*, *Penicillium* sp., *Chaetomium* sp. i *F. subglutinans*). Kako je stepen inhibicije rasta micelije gljiva *F. verticillioides*, *F. oxysporum* (sa obe biljne droge), *F. semitectum*, *F. equiseti*, *Penicillium* sp. i *A. alternata*, izolatom SS-12.6 i njegovim lipopeptidnim ekstraktom sličan, može se pretpostaviti da je antagonizam ovog izolata prema navedenim fitopatogenim gljivama posledica antifungalne aktivnosti lipopeptida.



Chaetomium sp.



Alternaria alternata



Fusarium oxysporum



Fusarium solani



Penicillium sp.

Slika 53. Antifungalni efekat lipopeptidnog ekstrakta izolata SS-12.6 prema različitim gljivama. Prikazana je kontrola (leva kolona) i antagonizam ekstrakta (desna kolona)

U slučaju *F. oxysporum* (sa nevena), *Penicillium* sp., a posebno *F. subglutinans* i *Chaetomium* sp. lipopeptidni ekstrakt bio je bolji antagonist od pune kulture izolata SS-12.6 iz koga je izolovan (videti u tabeli 21.). Nasuprot ovim nalazima, ovaj ekstrakt bio je znatno slabiji u inhibiciji rasta *F. solani*, a posebno *G. roseum*, *A. flavus* i *F. tricinctum* od pune kulture. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je za visoku inhibitornu aktivnost izolata SS-12.6 na nabrojane gljive odgovoran i neki drugi metabolit ili se ostvaruje kroz neki drugi mehanizam. Primećeno je da lipopeptidni ekstrakt izolata SS-12.6, osim što inhibira rast *F. oxysporum* (sa kukuruzne svile) dovodi i do promene boje micelije (Slika 53).

Nasuprot lipopeptidnom ekstraktu izolata SS-12.6, aktivnost ekstrakta izolata *Bacillus* sp. SS-13.1 na rast istih gljiva bila je znatno slabija. Inhibicija rasta većine gljiva bila je odsutna, izuzev u slučaju *Penicillium* sp. čiji je rast inhibiran sa 71% (Tabela 21.). Na osnovu iznetog, može se pretpostaviti da su drugi metaboliti izolata SS-13.1 odgovorni za njegov izražen antagonizam u punoj kulturi na odabrane fitopatogene gljive, ili neki drugi mehanizam.

Ispitivanjem minimalne inhibitorne koncentracije lipopeptidnih ekstrakata izolata SS-12.6 i SS-13.1 donekle su potvrđeni dobijeni rezultati. MIC vrednosti oba ekstrakta prikazane su u Tabeli 22.

Tabela 22. MIC vrednosti za ekstrakte izolata SS-12.6 i SS-13.1 (µl/ml)

Gljive	Ekstrakt 12.6	Ekstrakt 13.1
<i>F. solani</i>	7,8	250
<i>F. verticillioides</i>	3,9	125
<i>F. tricinctum</i> - rastavić	/	/
<i>F. oxysporum</i> -neven	3,9	62,5
<i>F. oxysporum</i> - k.svila	/	/
<i>F. semitectum</i>	5,5	500
<i>F. subglutinans</i>	1,25	500
<i>F. equiseti</i>	5,5	62,5
<i>C. lunata</i>	2,5	125
<i>A. flavus</i>	>500	>500
<i>A. niger</i>	62,5	>500
<i>Penicillium</i> sp.	>500	>500
<i>A. alternata</i>	20	250
<i>Chaetomium</i> sp.	2,5	250
<i>G. roseum</i>	125	500
<i>F. tricinctum</i> - nana	1,9	>500

U slučaju lipopeptidnog ekstrakta *Bacillus* SS-12.6 izolata dobijene su niske MIC vrednosti izuzev za *G. roseum*, *A. flavus* i *Penicillium* sp. što je u korelaciji sa efektom ekstrakta na iste gljive na Petri šolji (Tabela 22.). Odstupanje od očekivanih i dobijenih rezultata utvrđeno je za MIC vrednost za *Penicillium* sp. Ovaj ekstrakt je znatno inhibirao rast *Penicillium* sp. na PDA podlozi, sa preko 70%, dok je MIC iznosila preko 500 µl/ml.

Kada je u pitanju lipopeptidni ekstrakt SS-13.1, utvrđeni su visoke MIC vrednosti što je u korelaciji sa rezultatima ispitivanja inhibitornog efekta ovog ekstrakta na rast micelija na PDA agaru, koja su ukazala na njegovu slabu antifungalnu aktivnost. Očekivale se jedino mala MIC vrednost za *Penicillium* sp. pošto je ekstrakt inhibirao rast ove plesni sa 71%, što nije potvrđeno mikrodilucionom metodom.

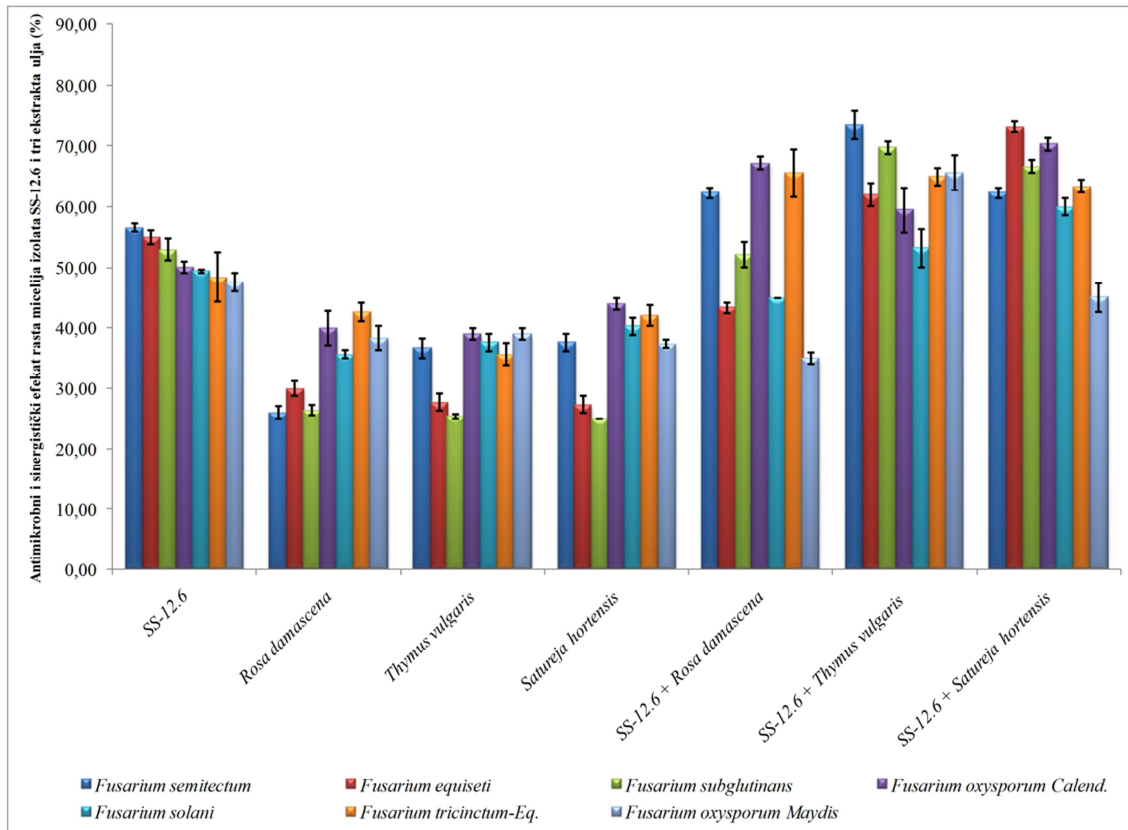
Za detaljnija objašnjenja dobijenih rezultata neophodna su dalja ispitivanja lipopeptidnih ekstrakata *Bacillus* sp. izolata u cilju determinacije aktivnih jedinjenja odgovornih za izrazitu antagonističku aktivnost. Dobijeni rezultati potvrđuju pretpostavku da je za antagonistički potencijal izolata SS-12.6 verovatno odgovoran lipopeptidni ekstrakt. S druge strane, za izolat SS-13.1 potrebna su dalja istraživanja. Iako ovaj izolat poseduje genetički potencijal za sintezu lipopeptida, da li će zaista doći do produkcije zavisi od niza faktora. Naime, ranija istraživanja produkcije lipopeptida u različitim *Bacillus* sojevima su ukazala da iako svi sojevi mogu imati gene za sintezu surfaktina, iturina A i bacilomicina D, u određenom trenutku samo se 1 ili 2 antibiotika sintetišu u visokim koncentracijama i da aktivnost glavnog antibiotika, pod datim uslovima može varirati od soja do soja (Athukorala *et al.*, 2009). Prema ovim autorima, iako se sojevi izlože istim uslovima, svaki soj može različito da reaguje na ekološke signale tj. signale sredine koji indukuju ekspresiju različitih gena za antibiotike u različitim sojevima. Alternativno, produkcija nekih antibiotika može značajnije da kasni u odnosu na druge. U svetlu svega rečenog, za formulaciju proizvoda na bazi *Bacillus* sojeva čini se da je poželjnije koristiti čistu aktivnu supstancu, ili bar ekstrakt. Time se eliminiše faktor „neizvesnosti“ u produkciji antimikrobnog jedinjenja kada se koristi puna kultura antagonističkog soja.

4.6.2. Sinergistički efekat *Bacillus* sp. izolata SS-12.6 i SS-13.1 i odabranih etarskih ulja na rast fitopatogenih ulja

Upotreba *Bacillus* sp. kao agensa biokontrole ima nekoliko prednosti u odnosu na druge mikroorganizme antagoniste, pre svega otpornost na visoke temperature i sušu (Hou *et al.*, 2006). Istraživanjima u ovom radu utvrđen je antagonistički potencijal više *Bacillus* sp. izolata sa različitih lokaliteta i mikrostaništa u odnosu na fitopatogene gljive izolovane sa biljnih droga, kao i mogućnost njihove primene u vidu agenasa biokontrole.

Pri komercijalnim uslovima nijedan pristup biološke kontrole nije ispoljio dosledan nivo kontrole oboljenja u poređenju sa sintetičkim fungicidima. Sa ekonomske tačke gledišta, da bi biološka kontrola bila prihvaćena neophodno je da se poboljša konzistencija i efikasnost u kontroli postžetvenih oboljenja (El Ghaouth, 1997). U tom smislu, pokazano je da kombinacija komplementarnih bioloških pristupa sa aditivnim i/ili sinergističkim efektom može da obezbedi veću konzistenciju i efikasnost u biokontroli postžetvenih oboljenja. Za ovakvu biološku strategiju bi se očekivalo da ispolji veću stabilnost i efikasnost nego kada se koristi jedan agens biokontrole. Eksperimentalno je pokazano, da kombinacija etarskih ulja i izolata *Bacillus* sp. 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 (Arrebola *et al.*, 2009).

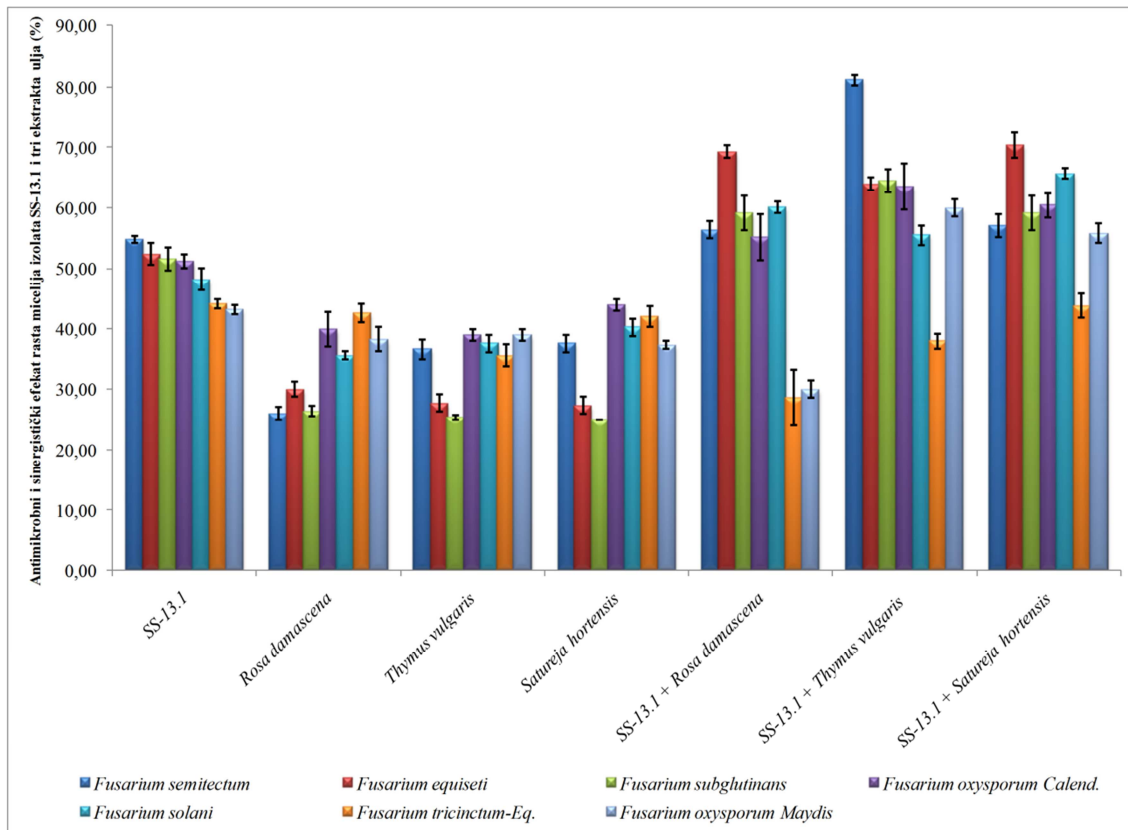
U ovom radu, ispitivali smo potencijalni sinergizam između *Bacillus* sp. izolata SS-12.6 i SS-13.1 i etarskih ulja koja su pokazala izrazit antifungalni potencijal, timijana, čubra i ruže, na vrste roda *Fusarium* koje su ispoljile neznatno veću otpornost na ove izolate od predstavnika drugih rodova gljiva. Rezultati su prikazani na slikama 54. i 55.



Slika 54. Sinergistička aktivnost izolata SS-12.6 i etarskih ulja timijana, čubra i ruže. Prikazane su srednje vrednosti procenta inhibicije rasta vrsta roda *Fusarium* pojedinačnim etarskim uljima i izolatom SS-12.6, njihov sinergistički efekat i standardna devijacija.

Iz rezultata prikazanih na slikama 54. i 55. može se uočiti da su izolati SS-12.6 i SS-13.1 uglavnom jače inhibirali rast većine ispitivanih gljiva u prisustvu etarskih ulja timijana, čubra i ruže, nego kada su ispitivani sami kao antagonisti, uz pojedine izuzetke. Kada je u pitanju izolat SS-12.6, bolja sinergistička aktivnost u odnosu na rast *Fusarium* vrsta utvrđena je za kombinaciju ovog izolata sa etarskim uljima timijana i čubra. Sinergizam je ispoljen na rast svih gljiva osim na *F. oxysporum* izolovan sa kukuruzne svile gde je kombinacija *Bacillus* izolata i ulja čubra ispoljila antagonistički efekat, odnosno inhibicija rasta micelije ove gljive je manja nego primenom samog izolata antagoniste. U kombinaciji sa etarskim uljem ruže, izolat SS-12.6 ispoljio je sinergističku aktivnost na rast *F. semitectum*, *F. oxysporum* (izolovan sa nevena) i *F. tricinctum*, dok je antagonizam utvrđen za rast *F. equiseti*, *F. solani* i *F. oxysporum* (sa kukuruze svile). Kombinacija izolata SS-12.6 i etarskog ulja ruže ispoljila je indiferentan efekat na rast *F. subglutinans*. Na Slici 54. se može se primetiti da su *F. semitectum*, *F. subglutinans* i *F. equiseti* najotpornije na samo etarsko ulje ruže,

najosetljivije na sam izolat SS-12.6, a da su na kombinaciju ulja sa bakterijskim antagonistom ispoljile drugačije reakcije, kao što je navedeno.



Slika 55. Sinergistička aktivnost izolata SS-13.1 i etarskih ulja timijana, čubra i ruže. Prikazane su srednje vrednosti procenta inhibicije rasta vrsta roda *Fusarium* pojedinačnim etarskim uljima i izolatom SS-13.6, njihov sinergistički efekat i standardna devijacija.

Sinergistički efekat na rast najvećeg broja *Fusarium* vrsta utvrđen je i ispitivanjem kombinacije izolata SS-13.1 sa sva tri etarska ulja (Slika 55.). Kombinacijom ovog izolata i etarskih ulja procentualno više je inhibiran rast testiranih gljiva u odnosu na slučaj kada su ispitivani pojedinačno. Odstupanje od iznetog utvrđeno je za *F. tricinctum* na čiji rast je kombinacija bakterijskog izolata i etarskih ulja ruže i timijana ispoljila antagonistički efekat, a sa uljem čubra indiferentan. Antagonizam je zabeležen i prema rastu *F. oxysporum* (sa kukuruzne svile) kada je izložen kombinaciji izolata SS-13.1 i etarskog ulja ruže.

Kombinacija izolata SS-12.6 i SS-13.1 i etarskih ulja čubra i timijana ispoljila je nešto bolji sinergistički efekat na rast vrsta roda *Fusarium*, nego sa etarskim uljem ruže. Takođe, ove kombinacije ispoljavaju uglavnom bolju antifungalnu aktivnost od etarskih

ulja i bakterijskih izolata testiranih pojedinačno. Rast *F. subglutinans*, *F. equiseti* i *F. semitectum*, među najotpornijim vrstama gljiva na sva tri etarska ulja, značajno je inhibiran kombinacijom ulja sa bakterijskim antagonistima SS-12.6 i SS-13.1.

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.

4.6.3. Potencijalna primena ispitivanih etarskih ulja i izolata *Bacillus* sp. u kontroli fitopatogenih gljiva sa lekovitog bilja

Kako su biljne droge osetljiv 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.

Literaturni podaci ukazuju na efikasnost i primenu kako etarskih ulja, tako i izolata različitih vrsta roda *Bacillus* u zaštiti povrtarskih biljaka od fitopatogenih gljiva, bilo da se koriste tretmanom zemljišta u kome će biljka rasti, bilo prskanjem listova i korena biljka (Tomlin, 2006; Arrebola *et al.*, 2009; Abdel-Kader *et al.*, 2011). Uglavnom se, kada su u pitanju izolati *Bacillus* sp., primenjuju suspenzije vegetativnih ćelija i spora pri čemu je mehanizam delovanja zasnovan na kolonizaciji korena biljke bakterijom i kompeticiji sa patogenim organizmima (Tomlin, 2006).

Etarska ulja ispitivana u ovom radu su neselektivna tj. sva ulja su ispoljila inhibitorni efekat na rast svih testiranih fitopatogenih gljiva. Razlika je u minimalnoj koncentraciji kojom pojedinačno ulje inhibiralo rast gljiva, a koja je posledica njegovog hemijskog sastava. Među svim uljima ispitivanim u ovom radu, etarska ulja čubra, origana, timijana i ruže su bila najefikasnija pri najmanjoj koncentraciji. Sva četiri etarska ulja su podjednako efikasna u inhibiciji rasta gotovo svih gljiva, odnosno imaju

najširi spektar dejstva na fitopatogene gljive testirane u ovom radu, Naime, među ova četiri ulja nema statistički značajne razlike u antifungalnoj aktivnosti na gotovo sve testirane gljive, što znači da bi svako ulje postiglo istu efikasnost u tretmanu bilo koje fitopatogene gljive ispitivane u ovom radu (Prilog 3, Tabela 36).

S druge strane, od izolata *Bacillus* sp., visok antagonizam na sve ispitivane fitopatogene gljive ispoljili su izolati SS-12.6 i SS-13.1, kao i SS-27.7, SS-34.4, SS-38.3 i SS-40.2.

Jedan od pristupa u istraživanjima biokontrole je primena kombinacije etarskih ulja i antagoniste, bilo da su u pitanju gljive ili bakterije. Visoka efikasnost u prevenciji kontaminacijed patogenim gljivama povrtarskih biljaka postignuta je integrisanim tretmanom zemlje kombinacijom gljive antagoniste i odabranih etarskih ulja, kao što su kim, timijan, nana i geranijum (Abdel-Kader *et al.*, 2011). S druge strane, efikasnost u prevenciji kontaminacije voća postignuta je njihovim prskanjem kombinacijom antagoniste *B. amyloliquefacijens* i etarskog ulja limunske trave pre skladištenja voća (Arrebola *et al.*, 2009). Prema ovim autorima bakterija produkuje iturin A, fengicin i surfaktin, kao i neke isparljive komponente kojima ostvaruje svoju antagonističku aktivnost kao što je inhibicija klijanja konidija i formiranjem biofilma na površini voća. Ovim istraživanjima je ustanovljeno da monoterpeni etarskog ulja doprinose povećanju formiranja biofilma kod Gram pozitivnih bakterija, te je primena kombinacije bakterije antagoniste i etarskog ulja od velike koristi u kontroli razvoja postžetvenih oboljenja na voću uzrokovanih gljivama, tokom skladištenja i transporta voća, posebno u organskoj proizvodnji.

Ispitivanja u našem radu su ukazala na to da je kombinacija pojedinačnih *Bacillus* sp. izolata SS-12.6 i SS-13.1 i etarskih ulja čubra i timijana pokazala nešto bolji sinergistički efekat, nego sa etarskim uljem ruže, na rast vrsta roda *Fusarium*, *F. subglutinans*, *F. equiseti* i *F. semitectum*, koje su ispoljile veću rezistentnost na najveći broj ispitivanih ulja u odnosu na ostale testirane gljive. Rezultati takođe ukazuju da pomenute kombinacije oba izolata *Bacillus* sp. i etarskih ulja pokazuju uglavnom bolju antifungalnu aktivnost od etarskih ulja i bakterijskih izolata testiranih pojedinačno. Rast *F. subglutinans*, *F. equiseti* i *F. semitectum*, među najotpornijim testiranim gljivama na sva tri etarska ulja, značajno je inhibiran kombinacijom ulja sa bakterijskim antagonistima SS-12.6 i SS-13.1.

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. Kombinovani tretman različitim biološkim agensima otežao bi razvoj rezistentnih patogenih sojeva.

Noviji pravac u primeni *Bacillus* sp. kao biofungicida je primena ne samo njegovih ćelija nego i lipopeptidnih ekstrakata. Formulisan je preparat sa ćelijama i peptidima *Bacillus*-a, kao nosiocima ovog preparata, koji sprečavaju početni proces infekcije patogenim gljivama, germinaciju spora i uništavaju germinativne tube (Marone, 2002). S tim na umu, ispitivanjem inhibitorne aktivnosti lipopeptidnih ekstrakata izolata antagonista SS-12.6 i SS-13.1, za koje smo utvrdili visoku antifungalnu aktivnost, zabeležen je visok antifungalni potencijal lipopeptidnog ekstrakta SS-12.6 na gotovo sve testirane gljive. Daljim ispitivanjem utvrđene su niske MIC vrednosti za ovaj lipopeptidni ekstrakt pa se može pretpostaviti da je on verovatno odgovoran za veoma dobru antifungalnu aktivnost *Bacillus* sp. izolata SS-12.6. To nam daje dobru osnovu za potencijalnu primenu lipopeptidnog ekstrakta izolata SS-12.6 u biokontroli fitopatogenih gljiva na uskladištenoj drogi.

Za potencijalni tretman uskladištene biljne droge, gde se zahteva niska temperatura i vlažnost, više bi odgovarali lipopeptidni ekstrakti *Bacillus* sp. od vegetativnih ćelija zbog mogućnosti da bakterija, pod nepovoljnim uslovima pređe u sporogeni oblik, te na taj način ne ispolji antagonističku aktivnost. Lipopeptidni ekstrakti su uputniji za primenu takođe i zbog već poznatog mehanizma dejstva kojim ostvaruju antagonizam prema fitopatogenim gljivama, dok se za bakterijske izolate ne može pouzdano tvrditi kojim će mehanizmom delovati u *in vivo* uslovima, i koji će se geni za sintezu metabolita sa antimikrobnom aktivnošću, eksprimirati.

Primena kulture ćelija *Bacillus* sp. sa druge, tehnološke, strane je bolji izbor za primenu u polju zbog mogućnosti uključivanja većeg broja mehanizama antagonističkog delovanja što je poželjno zbog većeg broja različitih fitopatogenih gljiva sa kojima dolaze u dodir i kompeticiju. Bakterija antagonist bi obezbedila zaštitu od patogena tokom cele vegetacije, a spore bi im omogućile stabilnost i u periodu skladištenja. Endospore su takođe otpornije na proces sušenja za kreiranje formulacije u

vidu praha (praška) i veoma se lako proizvode sa modernim industrijskim tehnologijama fermentacije.

U smislu biološke kontrole, možda bi se najveća efikasnost postigla primenom *Bacillus* sp. izolata SS-12.6 kroz tretman zemljišta i korena same biljke u kombinaciji sa folijarnom primenom njegovim lipopeptidnim ekstraktom. Takođe, na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu o sinergističkoj aktivnosti izolata SS-12.6 i etarskih ulja čubra, timijana i ruže, mogla bi se očekivati i efikasnost tretmana zemljišta ili same biljke kombinacijom oba biološka agensa.

Kada su u pitanju etarska ulja, pomenuta je njihova efikasnost u dekontaminaciji voća fumigacijom kompletnim uljima, kao i njihovim komponentama. Kako su u našem radu etarska ulja timijana, čubra, origana i ruže, ispoljila najbolji inhibitorni potencijal na sve testirane gljive izolovane sa biljnih droga, buduća istraživanja treba usmeriti u pravcu njihove potencijalne primene u biološkoj kontroli fitopatogenih gljiva sa biljnih droga, procesom fumigacije.

Za potencijalnu primenu kako etarskih ulja tako i ekstrakta izolata *Bacillus* sp. potrebna su dalja ispitivanja uticaja ovakvih preparata na organoleptička svojstva i aktivne principe biljnih droga kao i eventualnog toksičnog efekta na korisnike da bi se dodatno procenila mogućnost njihove upotrebe.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Na odabranim biljnim drogama (nana, kopriva, neven, rastavić i kukuruzna svila) utvrđene su mešovite infekcije gljivama iz različitih rodova, ali većina izolovanih vrsta pripada rodu *Fusarium*. Ukupno je determinisano 12 vrsta roda *Fusarium*: *F. proliferatum*, *F. verticillioides* (= *F. moniliforme*), *F. taphsinum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum* i *F. equiseti*. Na svim odabranim biljnim drogama identifikovani su i predstavnici roda *Alternaria*. Vrste roda *Aspergillus* su izolovane i identifikovane sa svih droga sem iz uzoraka cveta nevena, a vrste roda *Penicillium* izolovane su iz svih biljnih droga, sem koprive. Dodatno, identifikovani su i predstavnici rodova: *Phoma*, *Cephalosporium*, *Nigrospora*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Cercospora*, *Phomopsis*, *Verticillum*, *Dreschlera* (= *Bipolaris*), *Rhizoctonia*, *Septoria*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Stahybotrys*, *Trichotecium*, *Puccinia*, *Botrytis*, *Mucor* i *Rhizopus* sp., u zavisnosti od biljne droge.

2. U odabrana 22 etarska ulja, ispitivana u ovom radu, hemijskom analizom identifikovani su mono- i seskviterpeni, kao i fenilpropani. Među monoterpenima, prema procentualnom udelu, kao dominantni se izdvajaju: a) fenoli (npr. karvakrol i timol), b) ugljovodonici (limonen, α - i β -pinen, p-cimen, γ -terpinen), c) alkoholi (linalol, geraniol, citrenol, terpinen-4-ol, borenol), d) oksidovani alkoholi (1,8-cineol), e) aldehidi (citronelal, geranial, neral), f) ketoni (kamfor, fenhon, tujon, karvon) i acetati (npr. bornil- i linalil acetat). Od seskviterpena identifikovani su: a) ugljovodonici (npr. E ili (β)-kariofilen, hamazulen, farnesen), b) alkoholi (bisabolol) i c) oksidovani alkoholi (bisabolol oksid). Fenilpropanska jedinjenja koja su identifikovana su cimetaldehid, metilhavikol, eugenol i anetol.

3. U okviru istraživanja antifungalne aktivnosti sva testirana etarska ulja su pokazala antifungalnu aktivnost (i fungistatičnu i fungicidnu) na sve fitopatogene gljive izolovane sa biljnih droga.

4. Antifungalni potencijal testiranih etarskih ulja, u *in vitro* uslovima, može se predstaviti sledećim nizom idući od najaktivnijih ka manje aktivnim uljima: ulje čubra >

origana > timijana > ruže > anisa > čajnog drveta > zdravca > lavande > korijandera i bergamota > ljubičice > ruzmarina > bibera > cimeta > bosiljka > dalmatinske žalfije > španske žalfije > eukaliptusa > limuna > narandže > kamilice > vetivera.

5. Etarska ulja čubra, origana i timijana, sa fenolima kao dominantnim komponentama, pokazala su najveći antifungalni potencijal na sve testirane fitopatogene gljive u *in vitro* testu, pri čemu je etarsko ulje čubra nešto efikasnije od ulja origana i timijana. Etarska ulja vetivera i kamilice, sa seskviterpenima kao dominantnim komponentama, su pokazala najslabiju antifunganu aktivnost, kao i etarska ulja eukaliptusa, limuna i narandže, u kojima preovladavaju monoterpenski ugljovodonici.

6. Statističkom analizom dobijenih rezultata uočava se da su pojedina ulja delovala ujednačeno na sve testirane gljive. Izdvaja se grupa od 4 etarska ulja, čubra, origana, timijana i ruže, između kojih nema statistički značajne razlike u antifungalnoj aktivnosti na gotovo sve testirane fitopatogene gljive.

7. Rezultati statističke analize delovanja svih etarskih ulja na pojedinačne gljive ukazuju na to da su među vrstama roda *Fusarium*, *F. subglutinans*, *F. semitectum* i *F. sporotrichioides*, generalno najotpornije gljive na većinu analiziranih etarskih ulja, a od predstavnika drugih rodova to su *Trichoderma viride*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* i *Chaetomium* sp. Najosetljivije gljive na većinu etarskih ulja su *F. oxysporum* izolovan sa kukuruzne svile, kao i *Myrothecium verrucaria* i *Trichotechium roseum*.

8. Prema rezultatima ispitivanja sinergističke aktivnosti odabranih ulja može se reći da su kombinacije etarskih ulja timijana i origana ispoljila bolju antifungalnu aktivnost nego kada su ispitivana pojedinačno. Sinergistička aktivost zabeležena je i za kombinaciju etarskog ulja ruže i lavande, prema vrstama roda *Fusarium* koje su pokazale najveću rezistentnost na oba ulja kada su ispitivana pojedinačno. Kombinacija etarskih ulja origana i lavande ispoljila je sinergističku aktivnost samo u odnosu na dve *Fusarium* vrste.

9. U *in situ* ispitivanjima, najveću efikasnost u redukciji ukupnog broja gljiva u uzorcima biljne droge, ispoljila su ulja timijana, origana i ruže. Manju inhibitornu aktivnost ispoljila su etarska ulja čubra, korijandera, zdravca i lavande.

10. *In vitro* ispitivanja antagonističkog potencijala 14 različitih izolata *Bacillus* sp. su pokazala da testirani izolati ispoljavaju različit stepen inhibicije prema različitim vrstama fitopatogenih 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 ispoljili najslabiju inhibitornu aktivnost na gotovo sve testirane fitopatogene gljive. 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- SS-35.4, SS-38.2, SS-40.6) ispoljili su različite antifungalne potencijale u zavisnosti od testirane gljive.

11. U poređnom analizom dobijenih rezultata uočava se 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. To je upravo suprotno od rezultata dobijenih ispitivanjem etarskih ulja, gde je ova gljiva ispoljila najveću toleratnost na najveći broj testiranih ulja. S druge strane, najmanju osetljivost na većinu *Bacillus* sp. izolata ispoljila je *F. solani*. Od vrsta ostalih rodova najveća osetljivost na većinu ispitanih *Bacillus* sp. izolata utvrđena je za *Penicillium* sp. i *A. alternata*, a najmanja za *A. niger*.

12. Lipopeptidni ekstrakt *Bacillus* sp. SS-12.6 je veoma efikasan u inhibiciji rasta većine testiranih gljiva. Izuzetak su bile *F. tricinctum*, *A. flavus* i *G. roseum*. Lipopeptidni ekstrakt izolata SS-13.1 nije ispoljio značajniji antagonizam na većinu testiranih gljiva, izuzev *Penicillium* sp.

13. Rezultati ispitivanja MIC vrednosti lipopeptidna ekstrakta oba izolata (SS-12.6 i SS-13.1), bila su u korelaciji sa dobjenim vrednostima inhibicije rasta micelije, pa se može pretpostaviti da je za aktivnost *Bacillus* sp. izolata odgovoran njegov lipopeptidni ekstrakt, a za izolat 13.1 neki drugi metabolit ili neki drugi mehanizam antagonizma.

14. 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 SS-12.6 i SS-13.1 uglavnom jače inhibirali rast većine ispitivanih gljiva u prisustvu ovih etarskih ulja, nego kada su ispitivani sami kao antagonisti, uz pojedine izuzetke.

15. Etarska ulja čubra, origana, timijana i ruže, kao i izolat *Bacillus* sp. 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. Potrebna su dalja ispitivanja uticaja ovakvih preparata na organoleptička svojstva i aktivne principe biljnih droga da bi se dodatno procenila mogućnost njihove upotrebe.

6. LITERATURA

Abbas H. (2005) Aflatoxin and Food Safety. CRC Press.

Abbas H., Weaver M., Horn B., Carbone I., Monacell J., Shier T. (2011) Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews*, 30 (2–3), 59–70.

Abid-Esefi S., Ouanes Z., Hassen W., Baudrimont I., Creppy E., Bacha H. (2004) Cytotoxicity inhibition of DNA and protein synthesis and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol. Vitro*, 18, 467-474.

Abbo A., Idris M., Elb M. (2009) The Response of Tea Tree Oil as a Biofungicide Against Early Blight Disease in Tomato Crop (*Solanum lycopersicum*) in Sudan. Conference on International Research on Food Security. *Natural Resource Management and Rural Development*, 1-9.

Abdel-Kader M., El-Mougy N., Lashin S. (2011) Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root pathogens. *Journal of Plant Protection Research*, 51 (3), 306-313.

Abou-Arab A., Soliman Kawther M., Tantawy M., Badea I., Khayria N. (1999) Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. *Food Chemistry*, 67, 357-363.

Abou Donia M. (2008) Microbiological Quality and Aflatoxinogenesis of Egyptian Spices and Medicinal Plants. *Global Veterinaria*, 2 (4), 175-181.

Abo-El-Seoud M., El-Tobgy K. (2010) Production of environmentally safe biocides from essential oils having antimicrobial activity. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43 (4) 324–331.

Adekoge O., Iwahashi H., Obuhi K., Iwahashi Y. (2000) Inhibition of food spoilage yeasts and aflatoxigenic moulds by monoterpenes of the spice. *Aframomum danieli*. *Flav. Fragr. J.*, 15, 147-150.

Aguilar F., Hussain S., Cerutti P. (1993) Aflatoxin B1 induces the transversion of G-T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *PNAS* 90 (18), 8586–90.

Ainsworth C., Sparow K., Sussman A. (1973) *The Fungi, Taxonomic Review with Keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti*. Academic Press, New York and London.

Akila R., Rajendran L., Harish S., Saveetha K., Raguchander T., Samiyappan R. (2011) Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) causing *Fusarium* wilt in banana. *Biological Control*, 57 (3), 175-183.

Alli N., Sardjono A., Yamashita T., Yoshizawa T. (1998) Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenol) in corn from Indonesia. *Food Adit. Contam.*, 15, 377-384.

Alwathnani H., Perveen K. (2012) Biological control of fusarium wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 1100-1105.

Amiel E., Ofir R., Dudai N., Soloway E., Rabinsky T., Rachmilevitch S. (2012) β -Caryophyllene, a Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell Lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (12), 1-8.

Amini M., Safaie N., Salmani M., Shams-Bakhsh M. (2012) Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. *Trakia Journal of Sciences*, 10 (1), 1-8.

Arrebola E., Cazorla M., Romero D., Pérez-García A., de Vicente A (2007) A nonribosomal peptide synthetase gene (mgA) of *Pseudomonas syringa* pv. *syringa* is involved in mangotoxin biosynthesis and is required for full virulence. *Mol Plant-Microbe Interact.*, 20, 500-509.

Arrebola E., Sivakumar D., Bacigalupo R., Korsten L. (2010) Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop protection*, 29 (4), 369-377.

Arslan M., Dervis S. (2010) Antifungal activity of essential oils against three vegetative-compatibility groups of *Verticillium dahliae*. *World J. Microb. Biotechnol.*, 26, 1813-1821.

Atanda O., Akpan, I., Oluwafemi F. (2006) The potential of some essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control*, 18, 601-607.

Athucorala S., Fernando D., Rashid K. (2009) Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Can. J. Microbiol.*, 55, 1021-1032.

Azaz D., Demirci F., Satl F., Kürkcüoğlu M., Hüsnü Can Baser K. (2002) Antimicrobial Activity of Some *Satureja* Essential Oils. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. 57, 817-821.

Aziz H., Youssef A., Moheye Z., Lofty M. (1998) Contamination of some medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Bot. Bull Acad. Sin.* 39, 279-285.

Bajpai V., Kang S. (2012) In Vitro and In Vivo Inhibition of Plant Pathogenic Fungi by Essential Oil and Extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J. Agr. Sci. Tech.*, 14, 845-856.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 446–475.

Bang H., Lee D., Park H., Rhee Y. (2000) Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by transcinamaldehyde. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 64, 1061–1063.

Baričević D., Bertol T., (2000) The biological/pharmacological activity of *Salvia* genus. *Pharmacology*, 143-184.

Bartynska M., Budzikur-Ramza E. (2001) Action of some essential oils on fungi. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences*, 49 (4), 327-331.

Basilico Z., Basilico C. (1999) Inhibitory effects of some spices essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Lett Appl. Microbiol.*, 29, 238-241.

Berić T., Kojić M., Stanković S., Topisirović Lj., Degrassi G., Myers M., Venturi V., Fira Đ (2012) Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technol. Biotechnol.*, 50 (1), 25-31.

Bernotienė G., Nivinskienė O., Butkienė R., Mockutė D. (2007) Essential oil composition variability in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemia*, 18, (4) 38–43.

Berry M (1995) Herbal products. Part 6. Chamomiles. *Pharmaceutical Journal*, 254, 191-193.

Bittner M., Aguilera M., Hernández V., Arbert V., Becerra J., Casanueva M. (2009) Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69 (1), 30-37.

Booth C. (1971a) The genus *Fusarium*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1-237.

Booth C. (1971b) Fungal Culture Media. In: (Eds. J. R. Norris and D. W. Ribbons), *Methods in Microbiology*, IV, 49 - 94. Academic Press, London and New York.

Brar S., Kaur S., Dhillon G., Verma M. (2012) Biopesticides - Road to Agricultural Recovery. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides*, 3 (3), 1-2.

Brien C., Crandal P., Chalova V., Riske S. (2008) Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *Journal of Food Science*, 73 (6), 264-267.

Brown U. (1987) A monograph of the *Erysiphales* (powdery mildews). J. Cramer Berlin- Stuttgart, 1-250. Bruch, C. W. 1972. Objectable micro-organisms in nonsterile drugs and cosmetic. *Drug Cosmet. Ind.*, 111(4), 567-574.

Bryden W., Logrieco A., Abbas H., Porter J., Vesonder R., Richard J., Cole R. (2001) Other significant *Fusarium* mycotoxins, In: Summerell A., Leslie F., Backhouse D., Bryden L., Burgess W. (Eds.), *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. APS Press, St. Paul, MN, 360–392.

Buchenauer H. (2005) Principles in biological control of soil-borne diseases: Colonization, antagonism, plant growth promotion and induced resistance. *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases*, Germany, 20-29.

Bugno A., Almodovar A., Pereira T., Pinto T., Sabino M. (2006) Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 47-51.

Burgess W., Summerell A., Bullock S., Gott K., Backhouse D. (1994) Laboratory Manual for *Fusarium* Research. *Fusarium* Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Sydney, 133.

Burgiel J., Smagłowski M. (2008) Fungistatic properties of tea tree oil. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 529, 13-18.

Calixto B. (2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol.*, 33, 179-189.

Canafoglia M., Comerio R., Fernández Pinto V. (2007) Putative mycotoxin-producing fungi isolated from alpataco (*Prosopis flexuosa*) fruits. *Rev. Iberoam. Micol.*, 24(1), 56–8.

Carmo E., de Oliveira Lima E., de Souza E. (2008a) The potential of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 362-367.

Carmo E., Lima E., de Souza E., de Sousa F. (2008b) Effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 91-97.

Carrillo C., Teruel A., Aranda J., Ortiz A. (2003) Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1611, 91- 97.

Carson C., Hammer K., Riley T. (2006) *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (1), 50-62.

Cavanagh H., Wilkinson J. (2002) Biological activities of Lavender essential oil. *Phytotherapy Research*, 16 (4), 301–308.

Cawoy H., Bettiol W., Fickers P., Ongena M. (2011) *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases, Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management, *Agricultural and Biological Sciences*, 273-302.

Chamorro E., Zambón S., Morales W., Sequeira A., Velasco G. (2012) Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography. In: Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications, Edited by Bekir Salih and Ömür Çelikbıçak.

Chang H., Cheng Y., Wu C., Chang S., Chang T., Su Y. (2008) Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calosedrus macrolepis* var. *Formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresourse tehnology*, 99, 6266-6270.

Cheng S., Liu J., Chang E., Chang S. (2008) Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*, 99, 5145–5149.

Chiou A., Wu W. (2001) Isolation, Identification and Evaluation of Bacterial Antagonists against *Botrytis elliptica* on Lily. *Journal of Phytopathology*, 149 (6), 319–324.

Clausen C., Woodward B., Yang V. (2010) Antifungal essential oil metabolites. The 41st Annual meeting of Internacional Research Group on Wood protection, France.

Combrinck S., Regnier T., Kamatou G. (2011) *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharves fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33, 344-349.

Cox D., Mann M., Markham L. (2001) Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 492–497.

Cox D., Mann M., Markham L., Bell C., Gustafson E., Warmington R., Wyllie G. (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170–175.

Custódio A., Ribeiro V., Silva G., Machado M., Sousa C. (2011) The essential oils component *p*-cymene induces proton leak through Fo-ATP synthase and uncoupling of mitochondrial respiration. *Journal of Experimental Pharmacology*, 3, 69 – 76.

Ćirić A., Soković M., Glamočlija J., Jošić D. (2011) Antifungal activity of indigenous *Pseudomonas* isolates from rhizospheric soils. *Proceedings of 7th Balkan congres of Microbiology* (8th Conress of Serbian microbiologists), Belgrade, Serbia.

da Silva L., Araújo M., dos Santos K., Nunes A. (2011) Evaluation of the synergistic potential of vancomycin combined with other antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 106 (1), 44-50.

Daouk R., Dagher H., Sattout J. (1995) Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *J. Food Protect.*, 58, 1147-1149.

Davidson M. (2001) Chemical preservatives and naturally antimicrobial compounds. *In Food Microbiology. Fundamentals and frontiers*. 2ndEd. (Beuchat M., Montville L., eds. 593-628. ASM Press, Washington DC.

Deabes M., El-Soud A., El-Kassem A. (2011) *In vitro* Inhibition of Growth and Aflatoxin B1 Production of *Aspergillus flavus* Strain (ATCC 16872) by Various Medicinal Plant Essential Oils. *Maced J Med Sci.*, 1-6.

Deans S. (2002) Chapter 13. Antimicrobial activity of eucalyptus oil. In Book: *Eucalyptus, The Genus Eucalyptus*. Edited by John J.W.Coppen.

Deba F., Xuan T., Yasuda M., Tawata S. (2008) Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control* 19, 346–352.

Didry N., Dubreuil L., Pinkas M. (1993) Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie*, 48, 301–304.

Dikbas N., Kotan R., Dadasoglu F., Sahin F. (2008) Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 179-182.

Dorman D., Deans G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied microbiology*, 88, 308-316.

Droby S. (2006) Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables afterharvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *Acta Horticulturae*, 709, 45–51.

Dubey N., Kumar A., Singh P., Shukla R. (2008) Microbial contamination of raw materials: A major reason for the decline of India's share in the global herbal market. *Current Science*, 95 (6), 717-8.

Dweck A. (1994) Natural preservatives. Society of cosmetic scientists symposium: *Chepstow active ingredients*, 1-47.

Džamić A., Soković M., Ristić M., Grujuć-Jovanović S. Vukojević J., Marin P. (2008) Chemical composition and antifungal activity of *Salvia sclarea* (*Lamiaceae*) essential oil. *Arch.Biol.Sci.*, 60 (2), 233-237.

El-Gnauth A. (1997) Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19, 160-162.

Ellis B., Ellis J. (1997) *Microfungi on Land Plants. An Identification Handbook*. The Richmond Publishing Co. Ltd.

El-Mougy N., El-Gamal N., Abdel-Kader M. (2009) Pre-storage application of some essential oils and food preservatives against black mould incidence of garlic cloves during storage. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42 (11), 1059–1068.

El-Seoud M., El-Tobgy K. (2010) Production of environmentally safe biocides from essential oils having antimicrobial activity. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 43 (4), 324-331.

Essono G, Ayodele M, Akoa A, Foko J, Olembo S, Gockwski J. (2007) *Aspergillus* species on cassava chips in storage in rural areas of southern. Cameroon: their relationship with storage duration, moisture content and processing methods. *African Journal of Microbiology*, 001-008.

Etchegaray A., Bueno C., de Melo I., Tsai S., Fiore M., Silva-Stenico M., de Moraes L., Teschke O. (2008) Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of Microbiology*, 190 (6), 611-622.

Faixova Z., Faix S. (2008) Biological effect of Rosemary essential oil. *Folia Veterinaria*, 52 (3-4), 135-139.

Fernando W., Nakkeeran S., Zhang Y., Savchuk S. (2007) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*, 26 (2), 100–107.

Finking R., Marahiel A. (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 453–488.

Fokkema J. (1978) Fungal antagonism in the phyllosphere. *Annals of Applied Biology*, 89 (1), 115.

Gardener B., Fravel D. (2002) Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. *Plant Health Progress*, 510-60.

Gautam A., Bhadauria R. (2009) Fungal Contamination Of few Common Stored herbal Fruit Samples. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*, 8 (1), DOI: 10.5580/638.

Gennaro R. (1990) Remington Pharmaceutical Sciences, 18th Ed 1237, Easton, Mark Publishing Co. In: Final Report on the Safety Assessment of Triacetin. *International Journal of Toxicology* (2003), 22 (2), 1-10.

Gerlach W., Nirenberg H. (1982) The genus *Fusarium* - a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft*, Berlin-Dahlem, 209.

Grahovac M., Inđić D., Lazić S., Vuković S. (2009) Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi. *Pestic. Phytomed.*, 24(4), 245-258.

Gravel V., Martinez C., Antoun H., Tweddell R. (2005) Antagonist Microorganisms with the Ability to Control Pythium Damping-off of Tomato Seeds in Rockwool. *BioControl*, 50 (5), 771-786.

Griffin S., Wyllie S., Markham J., Leach N. (1999) The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.*, 14, 322-332.

Grigorian K., Badalyan G., Sargsyan M., Harutyunian A., Pogosyan N. (2011) Mycobiota of some medicinal plants and their toxigenic potential. *Acta fytotechnica et zootechnica*, Special Number, 14-18.

Handelsman J., Stabb E. (1996) Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell*, 8, 1855-1869.

Hadizadeh I., Peivastegan B., Hamzehzarghani H. (2009) Antifungal Activity of Essential Oils from Some Medicinal Plants of Iran against *Alternaria alternata*. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (5), 744-748.

Hammer K., Carson C., Riley T. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.

Hammer K., Carson C., Riley T. (2003) Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 853-860.

Hanel H., Raether W. (1988) A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses*, 31, 148-154.

Hashem M., Alamri S. (2010) Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17, 167–175.

Hitokoto H., Morozumi S., Wauke T., Saka S., Kurata H. (1978) Fungal contamination and mycotoxin detection of powdered herbal drugs. *Applied and Environmental Microbiology*, 36, 252-256.

Hou X., Boyetchko M., Brkic M., Olson D., Ross A., Hegedus D. (2006) Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 644-653.

Huang Y., Jianglin Z., Ligang Z., Jihua W., Youwen G., Xujun C., Zejian G., Qi W., Weibo J. (2010) Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component *trans*-Anethole. *Molecules*, 15, 7558-7569.

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.

Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet P., Ankit M., Khedid K., El Bachiri A. (2009) Chemical composition of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *Int. J. Agric. Biol.*, 11, 205–208.

Inouye S., Tsuruoka T., Uchida K., Yamaguchi H. (2001) Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiology and Immunology*, 45, 201–208.

Ipek E., Zeytinoglu H., Okay S., Tuylu B., Kurkcuoglu M., Baser C. (2005) Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test, *Food Chem.* 93 , 551—556.

Isman B., Machial M. (2006) Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. In M. Rai and M.C. Carpinella (eds.), Naturally Occurring Bioactive Compounds. *Elsevier, BV*, 29–44.

Jack W., Tagg R., Ray B. (1995) Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.

Jacqueline C., Navas D., Batard E., Miegville F., le Mabecque D., Kergueris F., Bugnon D., Potel G., Caillon J. (2005) *In vitro* and *in vivo* synergistic activities of

linezolid combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 45-51.

Janardhanan D. (2002) Diseases of major medicinal plants. Book. Daya Publishing House.

Jančić R., Stošić D., Mimica-Dukić N., Lakušić B. (1995) Aromatic Plants in Serbia, Decije Novine, Gornji Milanovac.

Jay J., Loessner M., Golden D., in: D.R. Heldman (Ed.) (2005), Modern Food Microbiology, *Springer Science-Business Media*, Inc., New York, 61-210.

Jian-Yu S., Zhu L., Tian Y. (2012) Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil of *Matricaria songarica*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14, 107-110.

Jham G., Dhingra O., Jardim C., Valente V. (2005) Identification of major fungitoxic component of Cinnamon bark oil. *Fitopat. bras.*, 30 (4), 404-408.

Jošić D., Pivić R., Pavlović S., Stojanović S., Aleksić G., Starović M (2011) Antifungal activity of indigenous *Bacillus* sp. isolate Q3 against marshmallow mycobiota. *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad*, 120, 109 - 118.

Kalemba D., Kunicka A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.

Kamei K., Watanabe A. (2005) *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Med. Mycol.*, 43, 95-99.

Karatzas K., Bennit J., Smid J., Kets W. (2000) Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Bacteriology*, 89, 296-301.

Khan S., Riaz T., Hannan A., Mukhtar I. (2006) Fungal contamination of medicinal herbs during commercial storage in Punjab. *Mycopath.*, 4 (1), 21-25.

Khan A., Ahmad A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan A., Manzoor N. (2010) *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Res. Microbiol.* 161(10), 816-23.

Kleinkauf H., von Dohren H. (1990) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* 192, 1-15.

- Klich A., Arthur S., Lax R., Blang M. (1994) Iturin A: a potential new fungicide for soared grains. *Mycopathologia*, 127, 123-127.
- Klokočar-Šmit Z., Šovljanski R., Indić D. (2006) Biopreparati – alternativa u zaštiti plodovitog povrća. *Biljni lekar*, 34 (1), 19-30.
- Kohzaki K., Gomi K., Yamasaki-Kokudo Y., Ozawa R., Takabayashi J., Akimitsu K. (2009) Characterization of a sabinene synthase gene from rough lemon (*Citrus jambhiri*). *Japan. Journal of Plant Physiology*, 166 (15), 1700-1704.
- Konishi K., Iida A., Kaneko M., Tomioka K., Tokuda H., Nishino H., Kumeda Y. (2003) Cancer preventive potential of trichothecenes from *Trichotecthium roseum*. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 11, 2511-2518.
- Koul O., Walia S., Dhaliwal G. (2008) Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.*, 4 (1), 63–84.
- Kneifel W., Czech E., Kopp B. (2002) Microbial contamination of medicinal plants, a review. *Planta Med.*, 68(1), 5-15.
- Kracht M., Rokos H., Ozel M., Kowall M., Pauli G., Vater J. (1999) Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J. Colloid Interface Sci.*, 204, 1-8.
- Krauze-Baranowska M., Mardarowicz M., Wiwart M., Pobłocka L., Dynowska M. (2002) Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. *Z Naturforsch*, 57(5–6), 478–82.
- Kungulovski D., Avramovski O., Atanasova P., Kungulovski I. (2011) Mycotoxigenic molds in spices from Macedonian stores. *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad*. 120, 81-91.
- Lalko J., Lapczynski A., McGinty D., Bhatia S., Letizia S., Api M. (2007) Fragrance material review on β -ionone. *Food and Chemical Toxicology*, 45 (1), 241–247.
- Lee H., Cheng S., Chang S. (2005) Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2047–2053.
- Lee S., Choi G., Jang K., Lim H., Cho K., Kim J. (2007) Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathol. J.*, 23 (2) 97-102.

Lee Y., Kim J., Shin S., Lee S., Park I. (2008) Antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 23-28.

Lević J. (2008) Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd-Zemun.

Lević J., Stojkov S. (2002) Stvaranje fuzariotoksina u uslovima proizvodnje i čuvanja kukuruza. *Agroinovacije*. 3, 153-161.

Li Q., Ning P., Zheng L., Huang J., Li G., Hsiang T. (2010) Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. *Postharvest Biology and Technology*, 58, 157-165.

Liu T., Chu L., Zhou T. (2002) Thymol and acetic acid vapors reduce post-harvest brown rot of apricot and plums. *Hort. Sci.*, 37, 151-156.

Lis-Balchin M., Deans S., Eaglesham S. (1998) Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour Frag. J.*, 13, 98-104.

Lodama K. (2010) Fumonisin production by and biological control of *Fusarium* species associated with cowpea seed. Magister Scientia: Plant Science. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria.

Luongo L. Santori A., Riccioni L., Belisario A. (2011) *Phomopsis* sp. associated with post-harvest fruit rot of kiwifruit in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93 (1), 205-209.

Maget-Dana R., Peypoux F. (1994) Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, 87 (1-3), 151-174.

Maget-Dana R., Ptak M. (1995) Interactions of surfactin with membrane models. *Biophysical Journal*, 68, 1937-1943.

Maget-Dana R., Thimon L., Peypoux F., Ptack M. (1992) Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, 74, 1047-1051.

Mahboubi M., Kazempour N. (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oils. *Iranian Journal of Microbiology*, 3 (4), 194-200.

- Maksimović M., Vidić D., Miloš M., Šolić M., Abadžić S., Siljak-Yakovlev S. (2007) Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 473-478.
- Mandeel A. (2005) Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 159, 291-298.
- Marasas W. (2001) Discovery and occurrence of the fumonisins: A historical perspective. *Environ. Health Perspect.*, 109, 239-243.
- Maria-Rose A., Elnatan B., Maria-Usileide D., Nadja A., Telma-Leda L., Edilberto R. (2004) Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* Lam, Pers. *Arkivoc*, 6, 59-65.
- Marrone P. (2002) An effective biofungicide with novel modes of action. *The Royal Society of Chemistry*, 193-134.
- Mateescu R., Cornea C., Grebenisan I., Sirean O. (2005) Improvement by mutagenesis and electroporation of antifungal properties of different *Bacillus* spp. strains. *Romania Journal of Genetics*, 1 (1), 39-51.
- Matricaria recutita*, Monograph (2008) *Alternative Medicine Review*, 13(1), 58-62.
- Mercier B., Prost J., Prost M. (2009) The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): A Review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22 (4), 331-342.
- Mihajilov-Krstev T., Radnović D., Kitić D., Stojanović-Radić Z., Zlatković B. (2009) Antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against pathogenic microbial strains. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 23 (4), 1492-1496.
- Mishra D., Gupta A., Prajapati C., Singh U. (2011) Combination of fungal and bacterial antagonists for management of root and stem rot disease of soybean. *Pak. J. Bot.*, 43(5), 2569-2574.
- Moghtader M., Salari H., Farahmand A. (2011) Evaluation of the antifungal effect of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. *Journal of Ecology and Natural Environment*, 3(6) 210-214.

- Moorthy K., Prasanna I., Thajuddin N., Arjunan S., Gnanendra T., Hussain Z. (2010) Occurrence of Mycopopulation in Spices and Herbal Drugs. *Internaional Journal of Biodiversity*, 1(Special Issue), 6-14.
- Moss M. (2002) Mycotoxin review – 1. *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist*, 16 (3), 116-119.
- Moyne L., Shelby R., Cleveland E., Tuzun S. (2001) Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 622-629.
- Nabigol A., Morshedi H. (2011) Evaluation of the antifungal activity of the Iranian thyme essential oils on the postharvest pathogens of strawberry fruits. *African Journal of Biotechnology*, 10 (48), 9864-9869.
- Nakatsu T., Lupo A., Chin J., Kang R. (2000) Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21, 571-631.
- Nelson E., Toussoun A., Marasas O. (1983) *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 1-193.
- Nguefack J., Leth V., Dongmo L., Torp J., Zollo A., Nyasse S. (2008) Use of Three Essential Oils as Seed Treatments Against Seed-borne Fungi of Rice (*Oryza sativa* L.). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 4 (5), 554-560.
- Nychas E. (1995) Natural antimicrobial from plants. *New methods of food preservation*, 58-69.
- Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J., Thonart P. (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9 (4), 1084–1090.
- Ongena M., Jacques P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16 (3), 115-125.
- Ostry V. (2008) *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 175-188.
- Ownagh A., Hasani A., Mardani K., Ebrahimzadeh S. (2010) Antifungal Effects of Thyme, Agastache and Satureja Essential Oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. *Veterinary Research Forum*, 2, 99-105.

Oxenham S., Svoboda K. (2005) Altered growth and polyamine catabolism following exposure of the chocolate spot pathogen *Botrytis fabae* to the essential oil of *Ocimum basilicum*. *Mycologia*, 97 (3), 576–579.

Oxenham S., Svoboda K., Walters D. (2005) Antifungal Activity of the Essential Oil of Basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Phytopathology*, 153 (3), 174-180.

Oyero G., Oyefolu B. (2009) Fungal contamination of crude herbal remedies as a possible source of mycotoxin exposure in man. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2 (5), 38-43

Pal K., Gardener B. (2006) Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 10, 1117-42.

Pandey V., Dubey N. (1992) Effect of essential oils from some higher plants against fungi causing damping-off disease. *Biologia Plantarum*, 34, (1-2), 143-147.

Pavlović S. (2008) Mikoze značajnih lekovitih biljaka u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.

Pauli A. (2006) Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Medicinal Research Reviews*, 26, (2), 223–268.

Penčić V. (2008) Fitopatološki rečnik i pojmovnik. Institut za kukuruz, Zemun Polje, Zemun.

Pinto E., Salgueiro R., Cavaleiro C., Palmeira A., Gonçalves M. (2007) *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products*, 26(2),135-141.

Pitt I. (1979) The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces. *Journal of Basic Microbiology*, 21 (8), 629.

Pitt I., Basílico C., Abarca L., López C. (2000) Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38 (1), 41–46.

Plaza P., Torres R., Usall J., Lamarca N., Vinas I. (2004) Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. *Journal of horticultural science and biotechnology*, 79 (6), 935-940.

Protolipac K., Jošić D., Starović M., Pavlović S., Postić D., Popović T., Stojanović S. (2011) The Effect of *Pseudomonas* Isolates on Growth and Pathogenicity

of *Alternaria tenuissima*. Proceedings of 7th Balkan congress of Microbiology (8th Congress of Serbian microbiologists), Belgrade, Serbia.

Raaijmakers M., Vlami M., de Souza T. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 537-547.

Raju G., Maridass M. (2011) Composition, antifungal and cytotoxic activities of essential oils of *Piper barberi* fruits. *International Journal of Biological Technology*, 2 (2), 100-105.

Rasooli I., Abyaneh R. (2004) Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Cont.*, 15, 479-483.

Reddy K., Reddy C., Abbas H., Abel C., Muralidharan K. (2008) Mycotoxygenic fungus, mycotoxins, and management of rice grains. *Toxin Reviews*, 27, 287-317.

Řežáčová V., Kubatova A. (2005) Saprobic microfungi in tea based on *Camellia sinensis* and on other dried herbs. *Czech. Mycol.*, 57 (1-2), 79-89.

Richard L. (2007) Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—an overview. *Int. J. Food Microbiol.* 119 (1-2), 3-10.

Ritter S., Washington E. (2003) Green rewards, Presidential honors recognize innovative syntheses, process improvements, and new products that promote pollution prevention. *Chemical & Engineering News*, 81 (26), 30-35.

Rizzo I., Vedoya G., Maurutto S., Haidukowski M., Varsavsky E. (2004) Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. *Microbiol. Res.*, 159 (2), 113-120.

Rosooli I., Owliab P. (2005) Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66 (24), 2851-2856.

Rosooli I., Rezaei B., Allameh A. (2006) Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils of *Thymus eriocalyx* and *Thymus xporlock*. *Food control*, 17, 359-364.

Rota M., Herreraa A., Martínez R., Sotomayor J., Jordánb M. (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19 (7), 681-687.

Romero D., de Vicente A., Rakotoaly R., Dufour S., Veening J., Arrebola E., Cazorla F., Kuipers O., Paquot M., Pérez-García A. (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.

Rückert C., Bloma J., Chenb X., Revac O., Borrissb R. (2011) Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Biotechnology*, 155 (20), 78–85.

Sabulal B., Dan M., Anil J., Kurup R., Pradeep N., Valsamma V. (2006) Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry*, 67 (22), 2469–2473.

Sasidharan I., Menon A. (2010) Comparative chemical composition and antimicrobial activity of berry and leaf essential oils of *Piper nigrum*. *International Journal of Biological and Medicinal Research*, 1 (4), 215-218.

Satish S., Raghavendra M., Raveesha K. (2009) Antifungal potentiality of some plant extracts against *Fusarium* sp. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(7), 618–625.

Scardavi A. (1966) Synergism among fungicides. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 4, 335–348.

Sharma R., Singh D., Singh R. (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50, 205–221.

Shukla A., Shahi S., Dikshit A., Saksena V. (2000) Plant product as fumigant for the management of stored-product pests. *Proc. Int. Conf. Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, 125-132.

Siciuia O., Olteanu V., Ciuca M., Cirstea D., Cornea C. (2011) Characterization of new *Bacillus* sp., isolates for antifungal properties and biosynthesis of lipopeptides. *Scientific Papers, UASVM Bucharest*, 14, 482-491.

Sikkema J., de Bont J., Poolman B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol. Rev.* 59, 201–222.

Singh D., Sharma R. (2007) Postharvest diseases of fruit and vegetables and their management. In: Prasad, D. (Ed.), Sustainable Pest Management. Daya Publishing House, New Delhi, India.

Singh A., Khare A., Singh A. (2012) Use of Vegetable Oils as Biopesticide in Grain Protection -A Review. *Journal of biofertilizers and Biopesticides*, 3 (1), 1-9.

Sobolewski J., Robak J., Ostrowska A. (2006) Potential of organic preparations in control of *Phytophthora infestans* on tomatoes in field and indoor cultivation. *Progr. Plant Prot.* 46 (2), 704-707.

Soković M. (2001) Antifungal activities of essential oil of selected aromatic and medicinal plants *in vitro* i *in vivo*, Ph.D. Thesis, Faculty of Biology, University of Belgrade, Yugoslavia.

Soliman M., Badeaa I. (2002) Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 40, 16669-1675.

Soylu E., Tok F., Soyly S., Kaya A., Evrendilek G. (2005) Antifungal activities of the essential oils on post-harvest disease agent *Penicillium digitatum*. *Pakistan Journal of Biological Science*, 8 (1), 25-29.

Soylu E., Yigitbas H., Tok F., Soyly S., Kurt S., Baysal Ö., Kaya A. (2005) Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. against foliar and soil-borne fungal pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 112 (3), 229–239.

Soto-Mendivil J., Moreno-Rodríguez F., Estarrón-Espinosa M., García-Fajardo E., Obledo-Vásquez J. (2008) Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Altrernaria citri*. *e-Gnosis*, 4, 1-7.

Stanković N., Ljiljana R., Čomić B., Kocić D., Nikolić D. (2011) Odnos antibakterijske aktivnosti i hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije. *Hem. Ind.*, 65 (5), 583–589.

Stanković S., Mihajlović S., Draganić V., Dimkić I., Vukotić G., Berić T., Fira Đ. (2012) Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp. *Arch. Biol. Sci.*, 64 (4), 1425-1432.

Stein T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.*, 56, 845-857.

Stević T. (2009) Mikrobiološka kontrola lekovitog bilja. Specijalistički rad, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Stević T., Kostić M., Pavlović S., Runjajić-Antić D. (2004) Kontaminacija i zaražavanje lekovitog bilja mikroorganizmima. *Biljni lekar*, 32, 291-307.

Stević T., Pavlović S., Stanković S., Šavikin K. (2012) Pathogenic microorganisms of medicinal herbač drugs. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 64 (1), 49-58, 2012.

Straede A., Corran A., Bundy J., Heinisch J. (2007) The effect of tea tree oil and antifungal agents on a reporter for yeast cell integrity signalling. *Yeas*, 24(4), 321-334.

Sun L., Gyung C., Kyoung J., He Kyoung L., Kwang C., Jin-Cheol K. (2007) Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathology Journal*, 23(2), 97-102.

Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., Bigger S. (2003) Antimicrobial Properties of Basil and Its Possible Application in Food Packaging. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3197-3207.

Survilienė E., Valiuškaitė A., Snieškienė V., Stankevičienė A. (2009) Effect of essential oils on fungi isolated from apples and vegetables. *Sodinikystė ir Daržininkystė. Mokslo Darbai*, 28(3), 227-234.

Škrinjar M., Višić-Vičanović M., Blagojev N., Tatalović Z., Krunić V. (2011) Xerophilic mycopopulation of teas in bulk. *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad*, 121, 103—113.

Šovljanski R., Klokočar-Šmit Z., Inđić D. (2004) Visokorizični insekticidi i fungicidi i alternative u zaštiti povrća. *Tematski zbornik III međunarodne Eko-konferencije Zdravstveno bezbedna hrana*, Novi Sad, 387-392.

Tabanca N., Kirimer N., Demirci B., Demirci F., Baser K. (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4300–4303.

Tadtong S., Wannakhot P., Poolsawat W., Athicomkulchai S., Ruangrunsi N. (2009) Antimicrobial activity of essential oil from *Etlingera punicea* rhizome. *J. Health Res.*, 23 (2), 77-79.

Tasić S., Šavikin Fodulović K., Menković N. (2001) *Vodič kroz svet lekovitog bilja*. Beograd.

Tassaneeyakul W., Razzazi-Fazeli E., Porasuphatana S., Bohm J. (2004) Contamination of aflatoxins in herbal medicinal products in Thailand. *Mycopathologia*, 158, 239-244.

Thubthimthed S., Rerkam U., Suntornatanasat T. (2000) Chemical analysis of vetiver oils of five ecotypes. Abstract of poster papers, ICV-2, Cha-am, Phetchaburi, Thailand, 36.

Thobunluepop P., Udomsilp J., Piyo A., Khaengkhan P. (2009) Screening for The Antifungal Activity of Essential Oils from Bergamot oil (*Citrus hystrix* DC.) and Tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) Against Economically Rice Pathogenic Fungi: A Driving Force of Organic Rice cv. KDML 105 Production. *As. J. Food Ag-Ind., Special Issue*, 374-380.

Tiziana-Barrata M., Damien Dorman J., Deans G., Figueiredo C., Barroso G., Ruberto G. (1998) Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 235-244.

Tomlin C. (2006) The Pesticide Manual British Crop Protection Council. Farnham, UK, 2006.

Touré Y., Ongena M, Jacques P., Guiro A., Thonart P. (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, 1151–1160.

Tournas V., Katsoudas E. (2008) Microbiological Quality of Various Medicinal Herbal Teas and Coffee Substitutes. *Microbiology Insights*, 1, 47–55.

Tripathi P., Dubey N. (2004) Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 235–245.

Trucksess M., Scott P. (2008) Mycotoxins in botanicals and dried fruits: A review. *Food Additives & Contaminants*, Part A, 25 (2), 181-192.

Tzortzakis G. (2007). Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food sci. Emerging Technol.*, 8, 111-116.

Ultee A., Bennik J., Moezelaar R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561–1568.

Ulubelen A., Topcu G., Eris C., Sonmez U., Kartal M., Kurucu S. (1994) Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*, 36, 971–974.

Uribe S., Ramirez T., Pena A. (1985) Effects of β -pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.*, 161, 1195–200.

Vardar-Ünlü G., Candan F., Sökmen A., Daferera D., Polissiou M., Sökmen M., Dönmez E., Tepe B. (2003) Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.*, 51 (1), 63–67.

Vaverkova Š., Holla M., Takel J., Habam M., Vozar I. (2004) Sadržaj i sastav etarskog ulja tri vrste roda *Salvia* gajenih u Slovačkoj. *Medical Plant Report*, 11, 24-28.

Velho R., Medina L., Segalin J., Brandelli A. (2011) Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiologica*, 56 (4), 297-303.

Velluti A., Sanchis V., Ramos J., Egido J., Marin S. (2005) Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, origano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int. J. Food Microb.*, 89, 145-154.

Venema T., Abee J., Haandrikman J., Leenhouts J., Kok W., Konings N., Venema G. (1993) Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1041-1048.

Vitullo D., Di Pietro A., Romano A., Lanzotti V., Lima G. (2012) Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 61(4), 689-699.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez N., Perez-Alvarez J. (2008) Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19 (12), 1130-1138.

Vollembroich D., Pauli G., Özel M., Vater J. (1997) Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 44-49.

Walsh T. (2004) Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Modularity and versatility. *Science*, 303, 1805-1810.

Wang S., Groopman D. (1999) DNA damage by mycotoxins. *Mutat. Res.*, 424, 167-181.

WHO (2005) Quality control methods for medicinal plant materials. World Health Organization. Working document CeAS/05.131/Rev.1.

Wyatt D., in: D.E. Diaz, (Ed.) (2005) *The Mycotoxin Blue Book: Mycotoxin Interactions*, Nottingham University Press, Nottingham, 269-278.

Yaouba A., Tatsadjeu L., Jazet M., Etoa X., Moses M. (2010) Antifungal properties of essential oils nad some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Research.*, 1(1), 001-008.

Yin J., Smith M., Eppley R., Page S., Sphon J. (1998) Effects of fumonisins B₁ on lipid peroxidation in membranes. *Biochem. Biophys. Acta – Biomembr.* 1371, 134-142.

Yigit F., Özcan M., Akgül A. (2000) Inhibitory effect of some spices essential oils on *Penicillium digitatum* causing postharvest rot in citrus. *Grasas y Aceites*, 51 (4), 237-240.

Yen T., Chang S. (2008) Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 99, 232-236.

Yeon-Suk L., Junheon K., Sang-Chul S., Sang-Gil L., Il-Kwon P. (2008) Antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal*, 23 (1), 23-28.

Yu G., Sinclair J., Hartman G., Bertagnoli B. (2002) production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* supressing *Rhizostonia solani*. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 955-963.

Zhang Q., Yang S., Dong Z., Pei L., Ding L., Song A., Gong Y., Liu G., Xue L. (2007) Determination of grain contaminated by *Alternaria alternata* and exposure of its toxins for residents in the high incident area of esophageal cancer. *Life Science Journal*, 4 (4), 25-28.

Zhang S., Wang Y., Meng L., Li J., Zhao X., Cao X., Chen X., Wang A., Li J. (2012) Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (8), 1747-1755.

Zuzarte M., Gonçalves M., Cavaleiro C., Canhoto J., Vale-Silva L., Silva M., Pinto E., Salgueiro L. (2011) Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *J Med Microbiol.*, 60 (5), 612-618.

Živković S. (2011) Uporedna proučavanja izolata *Colletotrichum* spp. prouzrokovaca antraknoze. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom sadu, Poljoprivredni fakultet.

Živković S., Stojanović S, Balaž J., Gavrilović V. (2007) Characteristic of *Phomopsis* sp. Isolates of plum trees origin. *Prot. Nat. Sci. Matica Srpska*, 113, 83-91.

Velho R., Medina L., Segalin J., Brandeli A. (2011) Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiologica*, 56 (4), 297-303.

PRILOG 1
Indeks pojmov

Askus – 1) bezbojno, plodno telo u obliku kese u kome se posle polnog procesa obrazuje osam askospora; 2) ćelija hife poput vreće u kojoj se odvija mejoza i koja sadrži askospore, obično 8

Askospora – spora polno stvorena u askusima

Fitopatogene gljive – gljive prouzrokovali bolesti biljka. Patogeni deluju na biljku enzimima, toksinima ili regulatorima rasta, kako bi obezbedili hranu.

Fruktifikacija – fenofaza obrazovanja plodova kod: biljaka i gljiva (obrazovanje sporonosnih organa)

Fumigacija – proces dezinfekcije gasom (fumigant) prostora, materijala, semena, sadnog materijala, proizvoda. Fumigacija se odvija u zatvorenom prostiru uz posebne mere predostrožnosti

Konidija – bespolna ili aseksualna spora gljive stvorena egzogeno na konidioforu od kojeg se oslobađa u zrelosti. Mogu da bude jedno- i višećelijske. Vrste roda *Fusarium* obrazuju makrokonidije, mezokonidije i mikrokonidije.

Makrokonidije su višećelijske konidije većih razmera. Septirane su sa tri i više septi, a po obliku mogu biti: srpaste, povijene, zašiljene i dr.

Mikrokonidija manja od makro, najčešće neseptirana ili sa 1-3 poprečne pregrade. Obrazuju se pojedinačno i u glavicama na konidioforama

Konidiofor – specijalizovana hifa na kojoj se stvaraju jedna ili više konidija; mogu biti pojedinačni ili u grupama, nerazgranati ili razgranati.

Micelija – vegetativno telo gljiva. Sastoji se od tankih niti-hifa, koje su često razgranate. Obično se razvija u supstratu (supstratna), a nekad na površini (površinska). Micelija može biti jednoćelijska, višećelijska, septirana i bez septi. Na njoj se obrazuju reproduktivni organi gljive: konidiofore, konidije i sl. Ponekad služi i za vegetativno razmnožavanje.

Hifa – ogranak micelije. Vegetativni organ gljiva, septirani ili neseptirani filamenti. Cevast gradivni delovi (niti) skoro svih gljiva (pojedinačne niti somatskog tela skoro svih gljiva zovu se hife), s hitinskim zidovima kod eumikotskih gljiva i celuloznim kod oomiceta.

Hlamidospora - bespolna spora, debelih zidova, stvorena modifikacijom ćelije hife gljive ili ćelije konidije. Ne rasejavaju se; stacionirane su na mestu gde su obrazovane

do klijanja. Bogate su rezervnim materijama. Omogućava održavanje gljiva duži period u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine, npr. u zemljištu i biljnim ostacima.

Peritecije – loptasto ili kruškasto plodno telo (askokarp) nekih rodova koje ima otvor ili poru za oslobađanje askusa

Piknidija – bespolno plodonosno telo, loptastog ili kruškastog oblika u kojem se obrazju piknospore na konidioforima; konidioma mrke boje s ostilom, tankim zidovima, obično su 2-3 ćelije zbijene, al nekada i više

Piknospora – bespolna spora, obrazuju se na fjalidama, ali su smeštene u piknidama.

Spora - specijalizovana reproduktivna struktura gljive, koja se razvija u jedinku bez sjedinjavanja sa drugom sličnom strukturom. Nastaju polnim i bespolnim putem. Mogu biti jedno, dvo- ili višećelijske, različitog oblika, razne boje, mera. Služe za razmnožavanje, raznošenje i prezimljavanje.

Sklerocija – čvrsti, višećelijski vegetativni organi za prezimljavanje gljiva. One su loptaste ili nepravilnog oblika; to je masa hifa sa ili bez prisustva tkiva domaćina, koja normalno nema spore niti na sebi niti u sebi; plodonosno telo i micelija mogu se obrazovati iz sklerocije. Obrazuju se pod nepovoljnim uslovima.

Skrining test – postupak masovnog pretraživanja prisustva ili odsustva ispitivanog svojstva

Sporangije – kesice ili opne oko bespolnih sporangiospora.

Sporangiofore – specifične micelijske hife koje nose jednu ili više egzogenih spora (konidija)

Sporangiospore – endogene, nepokretne, bespolne spore koje se obrazuju u sporangijama. Klijanjem micelija obrazuje hife.

Sporodohija – plodonosna struktura koju obrazuje grupa kratkih konidiofora s konidijama; jastučasta tvorevina s konidioforima ili konidiogenim ćelijama koje prekrivaju njenu gornju površinu, a koje nisu prekrivene podlogom za vreme razvića.

Sporonosno telo – kompleksna struktura gljive koja sadrži konidije, npr. peritecije kod telomorfa i sporodohija kod anomorfa mnogih vrsta *Fusarium*

Talus – vegetativno telo gljiva koje nema diferencirane organe niti sprovodni sistem. Talus može biti jednoćelijski ili višećelijski.

Telomorf – polni ili potpuni stadijum u životnom ciklusu gljive (Penčić, 2008).

PILOG 2

Kompletna kvantitativna i kvalitativna analiza ispitivanih etarskih ulja određena je primenom GC-FID i GC-MS tehnike

Tabela 23. Hemijski sastav etarskih ulja (eu) čubra, origana i timijana (%)

Jedinjenje	RI	eu čubra	eu origana	eu timijana
Triciklen	906	0,05	-	0,14
α -Tujen	911	0,16	-	-
α -Pinen	919	1,19	0,37	0,94
Kamfen	938	0,88	0,16	1,81
β -Pinen	975	0,45	1,08	0,24
Mircen	991	0,86	0,12	1,35
3-Oktanol	996	0,21	0,19	-
α -Felandren	1006	0,24	0,14	0,12
α -Terpinen	1017	1,23	0,43	2,47
<i>p</i> -Cimen	1024	12,20	2,11	23,22
Limonen	1030	0,53	0,63	0,64
1,8-Cineol	1031	0,46	1,03	3,71
Z-Ocimen	1032	0,50	-	-
γ -Terpinen	1055	6,50	2,61	6,98
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	1063	0,18	-	-
Terpinolen	1084	0,10	0,09	0,29
Linalol	1094	1,63	2,54	4,95
<i>cis</i> -Tujon	1103	0,09	-	-
dihidro-Linalol	1129	-	-	0,08
<i>trans</i> -Sabinol	1136	-	0,11	-
Kamfor	1142	0,88	0,73	-
Izoborneol	1155	0,21	-	0,33
Borneol	1163	2,41	1,18	0,57
Terpinen-4-ol	1177	0,74	0,78	0,68
α -Terpineol	1192	0,80	0,57	0,60
γ -Terpineol	1199	0,13	-	0,15
Citroneol	1230	0,18	-	-
Karvakrol, metil eter	1246	0,77	-	-
Geraniol	1259	0,33	-	-
Bornil acetat	1288	0,18	-	-
Timol	1293	9,65	3,71	43,70
Karvakrol	1304	50,00	75,80	2,95
Eugenol	1359	-	0,16	-
Karvakrol acetat	1378	0,08	-	-
α -Kopaen	1378	-	0,08	-
Geranil acetat	1386	-	-	0,26
Metil Eugenol	1407	0,08	-	-
E-Kariofilen	1422	5,17	2,76	3,11
α -Humulen	1457	0,31	0,81	0,11
Ukupno:		99,99	99,85	99,40

RI- retencioni indeks

Tabela 24. Hemijski sastav etarskih ulja (eu) ruže i zdravca (%)

Jedinjenje	RI	eu ruže	eu zdravca
α -Pinen	919	0,06	0,2
Oktanal	1004	0,07	-
Limonen	1030	0,27	-
Linalol	1094	1,16	1,7
<i>cis</i> -Roze oksid	1106	0,22	0,74
Fenetil alkohol	1108	6,05	7,45
<i>trans</i> -Roze oksid	1123	0,10	0,33
Kamfor	1142	-	-
Izopulegol	1143	-	0,26
Menton	1151	0,25	1,82
Izomenton	1163	1,12	3,48
2-Fenil etil format	1176	-	0,32
Terpinen-4-ol	1177	-	-
α -Terpineol	1192	0,18	0,13
Dihidro citronelol	1197	0,10	-
<i>trans</i> -karveol	1219	0,62	-
Citronelol	1230	51,26	39,03
Nerol	1231	0,40	-
Karvon	1246	0,98	-
Geraniol	1259	25,84	11,26
Geranial	1273	0,69	-
Citronelil format	1277	1,34	5,08
Neril format	1283	0,29	0,80
Geranil format	1304	0,66	1,44
Citronelil acetat	1354	0,08	1,4
Eugenol	1359	1,82	-
Neril acetat	1366	-	0,28
α -Kopaen	1378	0,08	0,22
Geranil acetat	1386	0,33	1,84
Fenil etil izobutanoat	1397	-	2,77
E-Kariofilen	1422	0,32	0,86
α -Jonon	1431	0,68	-
<i>cis</i> -Tujopsen	1433	-	0,87
α -Gvajen	1442	0,10	0,26
6,9-Gvajadien	1447	1,39	4,14
α -Humulen	1457	0,07	0,22
allo-Aromadendren	1465	0,06	0,16
Geranil propanoat	1478	0,15	0,4
Germacrene D	1485	0,24	0,55
β -jonon	1496	0,36	-
Viridiflorene	1499	0,22	0,64
γ -Kadinen	1519	-	0,24
δ -Kadinen	1528	0,18	0,5
Citronelil butanoat	1533	0,19	0,65
Geranil butanoat	1563	0,15	4,81
2-Fenil etil tiglata	1589	0,11	0,29
Kedrol	1604	-	1,26
E-Citronelil tiglata	1670	0,17	0,54
Geranil tiglata	1706	0,27	2,30
Ukupno:		99,83	99,24

RI – retencioni indeks

Tabela 25. Hemijski sastav etarskih ulja (eu) lavande, korijandera i bergamota (%)

Jedinjenje	RI	eu lavande	eu korijandera	eu bergamota
Triciklen	906	0,08	0,03	-
α -Tujen	911	-	0,04	-
α -Pinen	919	3,16	7,77	0,75
Kamfen	938	1,00	1,19	0,19
Sabinen	969	-	0,03	0,11
β -Pinen	975	1,19	0,6	3,00
3-Octanon	984	0,2	-	-
Mircen	991	1,49	0,92	0,95
Butil butilat	996	0,04	-	-
Oktanal	1004	-	-	0,04
<i>p</i> -Menta-1(7),8-dien	1006	0,08	-	-
α -Felandren	1005	-	-	0,08
3-Karen	1011	1,36	-	0,04
Heksil acetat	1012	0,46	-	-
α -Terpinen	1017	-	0,09	0,16
<i>p</i> -Cimen	1024	1,77	0,92	0,83
Limonen	1030	0,25	2,81	36,83
1,8-Cineol	1032	0,91	-	-
γ -Terpinen	1055	0,1	4,16	3,06
<i>cis</i> -Linalil oksid	1068	0,06	0,11	-
<i>trans</i> -Linalol oksid	1084	0,14	-	-
Terpinolen	1084	-	0,7	0,14
Linalol	1094	35,45	71,18	12,84
Kamfor	1142	0,65	4,32	-
Izoborneol	1155	0,34	-	-
Borneol	1163	2,56	0,11	-
Terpinen-4-ol	1177	2,06	0,1	0,07
α -Terpineol	1192	0,41	0,19	0,07
<i>n</i> -Heksil butanoat	1193	0,19	-	-
Octil acetat	1211	0,07	-	0,1
Nerol	1231	-	-	0,2
Neral	1242	-	-	0,28
Metil citronelat	1256	0,08	-	0,09
Geraniol	1259	-	1,13	-
Linalol acetat	1259	37,2	-	37,27
Geranial	1273	-	-	0,62
E-Cinamaldehyd	1276	0,07	-	-
E-Anetol	1288	0,27	-	-
liobornil acetat	1288	-	-	0,36
Lavandulil acetat	1293	1,14	-	-
Mirtenil acetat	1328	-	0,09	-
Heksil tiglata	1333	0,05	-	-
Linalil propionat	1340	-	-	0,05
α -Terpinil acetate	1352	-	-	0,19
Neril acetat	1366	2,37	-	0,26
Geranil acetat	1386	0,38	3,23	0,37
E-Kariofilen	1422	3,21	-	0,45
α -Humulen	1457	0,11	-	-
Z- β -Farnesen	1461	0,15	-	-
Germakren D	1485	0,13	-	-
Lavandulil izovalerat	1514	0,1	-	-
γ -Kadinen	1519	0,1	-	-
Eugenil acetat	1532	0,05	-	-
Citronelil butanoat	1533	-	-	0,15
Ukupno:		99,43	99,72	99,55

Ri- retencioni indeks

Tabela 26. Hemijski sastav etarskog ulja ploda/semena anisa

Jedinjenja	RI	%
α -Tujen	911	-
α -Pinen	919	0,38
Kamfen	938	-
β -Pinen	975	-
Mircen	991	-
α -Felandren	1006	0,24
3-Karen	1010	0,09
α -Terpinen	1017	-
<i>p</i> -Cimen	1024	-
Limonen	1030	-
Silvestren	1030	0,35
1,8-Cineol	1031	0,14
γ -Terpinen	1055	-
Linalol	1094	1,05
Terpinen-4-ol	1177	0,13
α -Terpineol	1192	0,13
γ -Terpineol	1199	-
Metil havikol	1200	3,62
Citronelol	1230	-
Z-Anetol	1253	0,43
E-Anetol	1288	91,78
E-Kariofilen	1422	0,23
α -Bergamoten	1438	0,22
Fenikulin	1683	1,20
Benzil benzoat	1768	-
Ukupno:		99,99

RI – Retencioni indeks

Tabela 27. Hemijski sastav etarskog ulja čajnog drveta

Jedinjenje	RI	%
α -Tujen	911	0,51
α -Pinen	919	3,48
Camfen	938	Trag
Sabinen	969	0,20
β -Pinen	975	1,72
Mircen	991	1,50
α -Felandren	1006	0,40
α -Terpinen	1017	7,09
<i>p</i> -Cimen	1024	3,13
Limonen	1030	3,88
1,8-Cineol	1032	1,87
γ -Terpinen	1055	17,78
Terpinolen	1084	4,16
Linalol	1094	0,07
dehidro-Sabinen keton	1117	0,17
trans-Sabinol	1136	0,15
Terpinen-4-ol	1177	40,66
<i>p</i> -Cimen-8-ol	1186	0,08
α -Terpineol	1192	4,49
γ -Terpineol	1199	0,16
α -Kopaen	1378	0,12
α -Gurjunen	1412	0,27
E-Kariofilen	1422	2,69
β -Kopaen	1431	0,05
Aromadendren	1442	0,99
α -Guaien	1447	0,05
α -Humulen	1457	0,14
allo-Aromadendren	1465	0,44
<i>trans</i> -Kadina-1(6),4-dien	1478	0,24
Selinen beta	1490	0,05
δ -Selinen	1496	0,08
Viridifloren	1499	0,71
Biciklogermakren	1519	0,28
α -Muurolen	1505	0,08
δ -Kadinen	1528	0,88
Zonaren	1529	0,15
<i>trans</i> -Kadina-1,4-dien	1537	0,11
Viridiflorol	1594	0,12
Kubeban-11-ol	1597	0,10
1-epi-kubenol	1632	0,12
Kubenol	1647	0,06
Ukupno:		97,69

RI – retencioni indeks

Tabela 28. Hemijski sastav etarskog ulja ljubičice

Jedinjenje	RI	%
α -Pinen	919	0,26
Sabinen	969	0,09
β -Pinen	975	0,66
Mircen	991	0,04
<i>p</i> -Cimen	1024	0,9
Limonen	1030	4,03
1,8-Cineol	1031	0,37
γ -Terpinen	1055	0,60
Linalol	1094	3,86
cis-Roze oksid	1106	0,06
Fenetil alkohol	1108	0,58
Kamfor	1142	0,28
Izomenton	1163	0,28
Borneol	1163	0,11
α -Terpineol	1192	0,15
Citronelol	1230	1,53
Linalol acetat	1259	3,84
Citronelil format	1277	0,38
E-Anetol	1288	0,25
Piperonal	1328	0,86
Feniletil propionat	1355	6,84
Triacetin	1362	53,74
Geranil acetat	1386	0,47
Vanillin	1400	0,83
E-Kariofilen	1422	1,25
α -Jonon	1431	9,38
6,9-Guaiadien	1440	0,71
α -Humulen	1457	0,18
Germacren D	1485	0,17
β -Jonon	1490	4,78
Guaiol	1601	0,56
Bulnezol	1674	0,88
Benzil benzoat	1768	0,11
Ukupno:		99,03

RI – Retencioni indeks

Tabela 29. Hemijski sastav etarskog ulja crnog bibera

Jedinjenje	RI	%
α -Tujen	911	0,67
α -Pinen	919	15,49
Kamfen	938	0,39
Sabinen	969	5,48
β -Pinen	975	14,87
Mircen	991	1,06
α -Felandren	1005	2,84
3-Karen	1012	9,54
α -Terpinen	1017	0,42
<i>p</i> -Cimen	1024	1,47
Limonen	1030	18,75
1,8-Cineol	1032	Trag
γ -Terpinen	1055	0,27
Terpinolen	1084	0,27
Linalol	1094	0,62
<i>trans</i> -Sabinol	1136	0,06
Terpinen-4-ol	1176	0,63
α -Terpineol	1192	0,06
Piperiton	1255	1,00
δ -Elemene	1340	1,12
α -Kubeben	1352	0,15
α -Kopaen	1378	1,86
β -Kubeben	1397	0,13
β -Elemen	1397	0,23
E-Cariofilen	1422	19,44
β -Kopaen	1431	0,10
α -Humulen	1457	0,80
Germacren D	1485	0,11
Biciklogermakren	1499	0,11
α -Muurolen	1505	0,17
β -Bisabolene	1513	0,37
δ -Kadinen	1528	0,53
Kariofylen oksid	1586	0,60
Ukupno:		99,61

RI – Retencioni indeks

Tabela 30. Hemijski sastav etarskog ulja kore cimeta

Jedinjenje	RI	%
α -Pinen	919	0,73
Kamfen	938	trag
Benzaldehid	951	0,22
β -Pinen	975	0,16
α -Terpinen	1017	trag
<i>p</i> -Cimen	1024	1,30
Limonen	1030	1,72
1,8-Cineol	1031	2,22
γ -Terpinen	1055	0,06
Linalol	1094	3,70
α -Terpineol	1192	0,98
γ -Terpineol	1199	0,29
(<i>Z</i>)-Cinamaldehyd	1220	0,21
(<i>E</i>)-Cinamaldehyd	1276	74,04
Bornil acetat	1288	2,13
Eugenol	1359	3,08
E-Kariofilen	1422	2,60
Cinamil acetat	1447	5,55
α -Humulen	1457	0,10
E-Metoksi cinamaldehyd	1535	0,33
Benzil benzoat	1768	0,46
Ukupno:		99,88

RI – Retencioni indeks

Tabela 31. Hemijski sastav etarskog ulja bosiljka

Jedinjenje	RI	%
α -Pinen	919	0,14
Sabinen	969	0,07
β -Pinen	975	0,19
Mircen	991	0,09
Limonen	1030	0,15
1,8-Cineol	1032	3,00
E- β -Ocimen	1044	0,44
γ -Terpinen	1055	1,07
Terpinolen	1084	0,07
Linalol	1094	1,30
endo-Fenhol	1108	0,06
Kamfor	1142	0,18
Mentol	1170	0,17
Terpinen-4-ol	1177	0,17
α -Terpineol	1192	0,23
Metil havikol	1205	88,97
endo-Fenhil acetat	1222	0,09
Izobornil acetat	1288	0,06
Eugenol	1359	0,66
β -Elemen	1394	0,09
Metil Eugenol	1407	0,16
E-Kariofilen	1422	0,50
α -Bergamoten	1438	1,09
α -Humulen	1457	0,04
γ -Kadinen	1519	0,19
(E)-para-metoksi- Cinamaldehyd	1571	0,28
epi- α -kadinol	1645	0,25
Ukupno:		99,18

RI – Retencioni indeks

Tabela 32. Hemijski sastav etarskih ulja (eu) španske i dalmatinske žalfije i ruzmarina (%)

Jedinjenje	RI	eu španske žalfije	eu dalmatinske žalfije	eu ruzmarina
Triciklen	906	0,30	0,51	0,21
α -Tujen	911	0,04	-	0,12
α -Pinen	919	17,14	6,65	10,30
α -Fenhen	935	-	0,17	0,08
Kamfen	938	4,62	7,11	4,44
Sabinen	969	0,24	0,67	0,05
β -Pinen	975	2,46	1,79	7,86
Mircen	991	0,91	Trag	0,92
α -Felandren	1006	-	-	0,13
3-Karen	1010	-	-	0,11
α -Terpinen	1017	0,08	-	0,13
<i>p</i> -Cymen	1024	0,34	0,78	1,00
Limonen	1030	13,88	3,28	2,68
Silvestren	1030	-	-	-
1,8-Cineol	1031	10,56	13,95	45,34
Z-Ocimen	1032	trag	-	-
γ -Terpinen	1055	0,16	0,09	0,78
Terpinolen	1084	-	-	0,19
Linalol	1094	0,63	1,00	0,56
<i>cis</i> -Tujon	1103	-	28,54	-
<i>trans</i> -tujon	1112	-	2,54	-
Dehidro-sabinen	1117	-	0,12	-
keton				
<i>p</i> -Ment-3-en-1-ol	1131	0,11	0,07	-
<i>trans</i> -Sabinol	1136	0,26	0,17	-
Kamfor	1142	26,64	-	13,00
Izoborneol	1155	-	0,23	0,84
Borneol	1164	7,14	3,52	2,54
Terpinen-4-ol	1177	0,10	0,71	0,48
α -Terpineol	1192	2,31	1,34	1,68
γ -Terpineol	1199	0,66	0,38	0,30
Linalol acetat	1259	3,09	-	-
Bornil acetat	1288	4,94	2,20	1,08
Timol	1293	-	-	-
<i>trans</i> -Sabinil acetat	1293	0,60	-	-
α -Terpinil acetat	1351	0,40	-	-
Karvakrol acetat	1378	-	-	0,12
Metil Eugenol	1407	-	-	0,18
Longifolen	1407	0,08	-	-
E-Kariofilen	1422	0,21	2,31	4,48
α -Humulene	1457	0,06	0,08	0,24
δ -Kadinen	1528	-	-	0,06
Kariofilen oksid	1586	-	0,36	-
Ukupno:		97,96	78,57	99,84

RI – retencioni indeks

Tabela 33. Hemijski sastav etarskih (eu) ulja limuna, narandže i eukaliptusa (%)

Jedinjenje	RI	eu limuna	eu narandže	eu eukaliptusa
α -Tujen	911	0,42	0,06	-
α -Pinen	919	2,13	0,62	2,14
Kamfen	938	0,06	-	-
Sabinen	969	2,25	0,22	-
β -Pinen	975	13,86	0,46	0,39
Mircen	991	1,41	1,36	0,47
α -Felandren	1007	-	0,07	0,37
3-Karen	1012	-	0,05	-
α -Terpinen	1017	0,12	-	0,10
<i>p</i> -Cimen	1024	1,42	0,47	0,22
Limonen	1030	65,86	90,88	89,92
1,8-Cineol	1032	-	-	-
Z-Ocimen	1035	-	-	0,18
E- β -Ocimen	1045	0,07	Trag	0,06
γ -Terpinen	1055	6,19	1,00	2,54
Terpinolen	1084	0,22	0,05	0,26
Linalol	1094	0,51	0,66	0,09
<i>cis</i> -Limonen oksid	1131	-	0,12	-
<i>trans</i> -Limonen oksid	1134	-	0,05	-
<i>trans</i> -Sabinol	1136	-	-	0,14
Kamfor	1142	-	-	-
Borneol	1164	-	-	-
Terpinen-4-ol	1177	-	-	0,30
α -Terpineol	1192	0,58	0,16	0,81
γ -Terpineol	1199	0,15	-	-
n-Dekanal	1207	-	0,18	-
Citronelol	1230	-	0,15	-
Kumin aldehyd	1242	-	-	-
Neral	1243	1,33	0,09	-
Linalol acetat	1258	0,25	1,64	-
Geranial	1273	2,29	0,16	-
Timol	1293	-	-	-
Karvakrol	1305	-	-	-
α -Terpinil acetat	1352	-	0,12	-
Citronelil acetat	1354	-	0,15	-
Eugenol	1359	-	-	-
Neril acetat	1366	-	0,21	-
α -Kopaen	1378	-	-	-
Geranil acetat	1386	-	0,46	-
Dodekanal	1411	-	0,05	-
E-Kariofilen	1422	0,87	0,48	-
Ukupno:		99,99	99,92	99,99

RI- retencioni indeks

Tabela 34. Hemijski sastav etarskog ulja kamilice

Jedinjenje	RI	%
p-Cimen	1024	Trag
E-Ocimen	1044	0,09
γ -Terpinen	1055	0,05
Artemisia keton	1055	0,27
Artemisia alkohol	1078	0,07
Dekanoična kiselina	1367	0,40
Farnesen	1461	18,52
dehidro-Seskvicineol	1473	0,14
Germakren D	1485	1,22
β -Selinen	1490	0,15
Biciklogermakren	1499	0,89
E,E- α -Farnesol	1513	0,73
β -Bisabolen	1513	-
α -dehidro-Himahalen	1519	0,46
δ -Kadinen	1528	0,22
Citronelil butanoat	1533	-
Spatulenol	1581	0,81
Cariofylene oksid	1586	-
Bisabolol oksid II	1660	5,06
Bisabolol	1689	21,11
Hamazulen	1735	2,20
α -Bisabolol oksid A	1752	37,98
Z-Spiroeter	1887	4,72
E-Spiroeter	1890	0,55
Ukupno:		95,64

RI – Retencioni indeks

Tabela 35. Hemijski sastav etarskog ulja vetivera

Jedinjenje	RI	%
α -Ilangen	1373	0,14
2-epi- β -Funebren	1413	0,12
Prezizaen	1447	0,23
Kusimen	1454	0,62
α -Amorfen	1485	1,78
<i>cis</i> -Eudesma-6,11-dien	1490	0,59
β -Vetispiren	1495	1,72
Hedikariol	1553	0,79
β -Vetivenen	1557	2,21
Kusimon	1604	1,10
Junenol	1621	3,57
10-epi- γ -Eudezmol	1625	3,01
α -Kadinol	1655	0,71
Valerianol	1658	3,12
7-epi- α -Eudezmol	1663	1,71
epi-Zizanon	1672	1,02
Eudesm-7(11)-en-4-ol	1703	0,88
Guaiol acetat	1719	1,45
Vetiselinenol	1728	4,52
Kusimol	1748	18,22
E-Izovalencenol	1794	14,67
Notkaton	1809	0,47
β -Vetivon	1823	4,13
α -Vetivon	1847	5,42
Ukupno:		72,20

RI – Retencioni indeks

PRILOG 3.

Statistička analiza inhibitornog efekta svih etarskih ulja na rast pojedinačnih ispitivanih gljiva. Prikazane su srednje vrednosti MIC i standardna greška. Vrednosti prikazane istim slovima nisu statistički značajne ($p < 0,05$) po Dankanovom testu višestrukog opsega.

Tabela 36. Statistička analiza inhibitornog efekta svih etarskih ulja na rast pojedinačnih ispitivanih gljiva.

<i>Fusarium solani</i>				<i>Fusarium verticillioides</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Amyris balsamifera</i>	14,28	0,28	a	<i>Vetiveria zizanoides</i>	12,72	0,29	a
<i>Vetiveria zizanoides</i>	12,72	0,29	b	<i>Citrus aurantium</i>	12,15	0,00	b
<i>Citrus aurantium</i>	12,07	0,24	c	<i>Amyris balsamifera</i>	11,13	0,26	c
<i>Matricaria recutita</i>	11,48	0,52	d	<i>Matricaria recutita</i>	10,29	0,09	d
<i>Eucalyptus globulus</i>	9,70	0,00	e	<i>Eucalyptus globulus</i>	8,92	0,48	e
<i>Citrus limon</i>	7,66	0,43	f	<i>Citrus limon</i>	8,00	0,43	f
<i>Ocimum basilicum</i>	7,65	0,38	f	<i>Salvia lavandulifolia</i>	7,52	0,00	g
<i>Salvia lavandulifolia</i>	7,33	0,19	f	<i>Ocimum basilicum</i>	6,80	0,00	h
<i>Viola odorata</i>	4,58	0,19	g	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	5,30	0,00	i
<i>Salvia officinalis</i>	4,51	0,09	g	<i>Salvia officinalis</i>	4,60	0,00	j
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	4,35	0,11	gh	<i>Piper nigrum</i>	3,98	0,19	k
<i>Piper nigrum</i>	3,90	0,00	h	<i>Viola odorata</i>	3,54	0,19	k
<i>Pelargonium graveolens</i>	2,28	0,00	i	<i>Pelargonium graveolens</i>	2,19	0,09	l
<i>Citrus aurantium</i>	1,83	0,09	ij	<i>Citrus aurantium</i>	2,18	0,00	l
<i>Lavandula angustifolia</i>	1,75	0,09	ij	<i>Coriandrum sativum</i>	2,13	0,00	l
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,48	0,10	jk	<i>Lavandula angustifolia</i>	1,33	0,05	m
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,14	0,00	k	<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,23	0,00	m
<i>Coriandrum sativum</i>	0,98	0,05	k	<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,86	0,13	mn
<i>Illicium verum</i>	0,93	0,10	k	<i>Illicium verum</i>	0,70	0,11	n
<i>Rosa damascena</i>	0,29	0,00	l	<i>Thymus vulgaris</i>	0,14	0,00	o
<i>Thymus vulgaris</i>	0,16	0,02	l	<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	o
<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	l	<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	o
<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	l	<i>Rosa damascena</i>	0,14	0,00	o
<i>Fusarium tricinctum-Eq.</i>				<i>Fusarium oxysporum Calend.</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Matricaria recutita</i>	18,70	1,04	a	<i>Salvia lavandulifolia</i>	14,10	0,00	a
<i>Vetiveria zizanoides</i>	17,60	0,51	b	<i>Citrus aurantium</i>	13,28	0,20	b
<i>Amyris balsamifera</i>	17,50	0,00	b	<i>Vetiveria zizanoides</i>	11,60	0,49	c
<i>Citrus aurantium</i>	14,58	0,22	c	<i>Amyris balsamifera</i>	11,34	0,09	c
<i>Salvia lavandulifolia</i>	14,10	0,00	c	<i>Matricaria recutita</i>	10,97	0,21	c
<i>Citrus limon</i>	10,44	0,00	d	<i>Citrus limon</i>	9,57	0,53	d
<i>Salvia officinalis</i>	10,30	0,68	d	<i>Salvia officinalis</i>	7,73	0,37	e
<i>Eucalyptus globulus</i>	8,73	0,00	e	<i>Ocimum basilicum</i>	6,97	0,42	f
<i>Ocimum basilicum</i>	7,65	0,00	f	<i>Eucalyptus globulus</i>	5,82	0,26	g
<i>Rosmarinus officinalis</i>	5,41	0,20	g	<i>Rosmarinus officinalis</i>	3,36	0,08	h
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	4,66	0,26	gh	<i>Piper nigrum</i>	3,35	0,10	h
<i>Piper nigrum</i>	4,37	0,19	hi	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	3,18	0,00	hi
<i>Viola odorata</i>	3,64	0,00	ij	<i>Citrus aurantium</i>	2,70	0,09	ij
<i>Coriandrum sativum</i>	2,98	0,13	jk	<i>Viola odorata</i>	2,50	0,19	jk
<i>Lavandula angustifolia</i>	2,85	0,09	jk	<i>Coriandrum sativum</i>	1,96	0,11	kl
<i>Citrus aurantium</i>	2,27	0,21	k	<i>Pelargonium graveolens</i>	1,82	0,00	l
<i>Illicium verum</i>	2,18	0,14	k	<i>Lavandula angustifolia</i>	1,15	0,00	m
<i>Pelargonium graveolens</i>	2,10	0,11	k	<i>Illicium verum</i>	1,10	0,13	m
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,19	0,05	l	<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,96	0,05	m
<i>Thymus vulgaris</i>	0,19	0,02	m	<i>Rosa damascena</i>	0,29	0,00	n
<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	m	<i>Origano vulgare</i>	0,28	0,00	n
<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	m	<i>Thymus vulgaris</i>	0,14	0,00	n
<i>Rosa damascena</i>	0,14	0,00	m	<i>Satureja hortensis</i>	0,07	0,00	n

<i>Fusarium oxysporum</i> Maydis				<i>Fusarium semitectum</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Amyris balsamifera</i>	15,54	0,34	a	<i>Matricaria recutita</i>	23,80	1,04	a
<i>Vetiveria zizanooides</i>	14,40	0,51	b	<i>Vetiveria zizanooides</i>	20,64	0,47	b
<i>Matricaria recutita</i>	11,05	0,00	c	<i>Amyris balsamifera</i>	17,78	0,28	c
<i>Salvia lavandulifolia</i>	10,90	0,38	c	<i>Salvia lavandulifolia</i>	11,47	0,19	d
<i>Citrus aurantium</i>	9,72	0,22	d	<i>Citrus aurantium</i>	9,72	0,00	e
<i>Salvia officinalis</i>	7,18	0,18	e	<i>Eucalyptus globulus</i>	7,76	0,00	f
<i>Citrus limon</i>	6,61	0,21	f	<i>Salvia officinalis</i>	7,36	0,00	fg
<i>Ocimum basilicum</i>	5,95	0,38	g	<i>Citrus limon</i>	6,96	0,27	fg
<i>Eucalyptus globulus</i>	4,85	0,00	h	<i>Ocimum basilicum</i>	6,80	0,00	g
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	3,60	0,11	i	<i>Viola odorata</i>	4,89	0,51	h
<i>Piper nigrum</i>	2,84	0,17	j	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	4,66	0,26	h
<i>Rosmarinus officinalis</i>	2,30	0,10	jk	<i>Lavandula angustifolia</i>	4,60	0,00	h
<i>Pelargonium graveolens</i>	2,28	0,00	jk	<i>Pelargonium graveolens</i>	4,37	0,18	h
<i>Viola odorata</i>	2,08	0,00	k	<i>Coriandrum sativum</i>	4,25	0,00	h
<i>Illicium verum</i>	1,83	0,16	k	<i>Piper nigrum</i>	4,06	0,10	hi
<i>Citrus aurantium</i>	1,74	0,14	kl	<i>Rosmarinus officinalis</i>	3,36	0,08	ij
<i>Lavandula angustifolia</i>	1,24	0,06	lm	<i>Citrus aurantium</i>	3,05	0,14	j
<i>Coriandrum sativum</i>	1,10	0,04	m	<i>Illicium verum</i>	1,74	0,14	k
<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,91	0,00	m	<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,14	0,00	kl
<i>Rosa damascena</i>	0,29	0,00	n	<i>Rosa damascena</i>	0,64	0,04	lm
<i>Thymus vulgaris</i>	0,14	0,00	n	<i>Origano vulgare</i>	0,28	0,00	m
<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	n	<i>Thymus vulgaris</i>	0,19	0,02	m
<i>Origano vulgare</i>	0,07	0,00	n	<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	m
<i>Fusarium subglutinans</i>				<i>Fusarium equiseti</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Vetiveria zizanooides</i>	22,40	0,00	a	<i>Amyris balsamifera</i>	19,60	0,19	a
<i>Matricaria recutita</i>	21,25	0,00	b	<i>Vetiveria zizanooides</i>	14,40	0,00	b
<i>Amyris balsamifera</i>	21,00	0,00	b	<i>Matricaria recutita</i>	13,43	0,50	c
<i>Citrus aurantium</i>	16,20	0,00	c	<i>Citrus aurantium</i>	8,75	0,40	d
<i>Salvia lavandulifolia</i>	13,72	0,38	d	<i>Ocimum basilicum</i>	7,65	0,38	e
<i>Citrus limon</i>	13,05	0,00	e	<i>Salvia lavandulifolia</i>	7,10	0,10	ef
<i>Salvia officinalis</i>	9,38	0,18	f	<i>Eucalyptus globulus</i>	6,79	0,00	fg
<i>Eucalyptus globulus</i>	8,73	0,26	g	<i>Citrus limon</i>	6,26	0,43	g
<i>Lavandula angustifolia</i>	6,81	0,23	h	<i>Salvia officinalis</i>	4,60	0,00	h
<i>Ocimum basilicum</i>	6,12	0,42	i	<i>Rosmarinus officinalis</i>	4,10	0,13	hi
<i>Rosmarinus officinalis</i>	5,41	0,08	j	<i>Coriandrum sativum</i>	4,08	0,17	hi
<i>Piper nigrum</i>	4,99	0,19	j	<i>Citrus aurantium</i>	3,74	0,11	ij
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	4,24	0,00	k	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	3,71	0,00	ij
<i>Citrus aurantium</i>	3,48	0,00	l	<i>Lavandula angustifolia</i>	3,40	0,11	jk
<i>Coriandrum sativum</i>	3,40	0,00	l	<i>Piper nigrum</i>	3,12	0,00	kl
<i>Viola odorata</i>	3,12	0,00	l	<i>Viola odorata</i>	2,60	0,00	l
<i>Thymus vulgaris</i>	2,07	0,28	m	<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,82	0,00	m
<i>Illicium verum</i>	2,00	0,11	m	<i>Illicium verum</i>	1,66	0,21	m
<i>Pelargonium graveolens</i>	2,00	0,11	m	<i>Thymus vulgaris</i>	0,99	0,05	n
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,82	0,00	m	<i>Pelargonium graveolens</i>	0,66	0,09	no
<i>Origano vulgare</i>	1,16	0,00	n	<i>Satureja hortensis</i>	0,62	0,07	no
<i>Satureja hortensis</i>	0,96	0,05	no	<i>Rosa damascena</i>	0,33	0,04	o
<i>Rosa damascena</i>	0,62	0,04	o	<i>Origano vulgare</i>	0,28	0,00	o

<i>Fusarium sporotrichioides</i>				<i>Aspergillus flavus</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Amyris balsamifera</i>	21,00	0,00	a	<i>Amyris balsamifera</i>	24,50	0,00	a
<i>Vetiveria zizanooides</i>	20,80	0,00	a	<i>Matricaria recutita</i>	23,46	0,95	b
<i>Citrus aurantium</i>	14,58	0,00	b	<i>Vetiveria zizanooides</i>	20,00	0,00	c
<i>Salvia lavandulifolia</i>	14,10	0,00	c	<i>Citrus aurantium</i>	15,23	0,40	d
<i>Citrus limon</i>	13,05	0,00	d	<i>Salvia lavandulifolia</i>	14,66	0,38	d
<i>Eucalyptus globulus</i>	10,67	0,26	e	<i>Citrus limon</i>	13,40	0,35	e
<i>Matricaria recutita</i>	10,63	0,13	e	<i>Eucalyptus globulus</i>	8,92	0,48	f
<i>Salvia officinalis</i>	8,10	0,45	f	<i>Piper nigrum</i>	7,18	0,10	g
<i>Ocimum basilicum</i>	7,65	0,00	g	<i>Ocimum basilicum</i>	6,80	0,00	g
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	4,77	0,00	h	<i>Salvia officinalis</i>	5,34	0,18	h
<i>Piper nigrum</i>	3,90	0,00	i	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	5,30	0,00	h
<i>Rosmarinus officinalis</i>	3,53	0,16	j	<i>Coriandrum sativum</i>	5,10	0,00	hi
<i>Coriandrum sativum</i>	2,72	0,11	k	<i>Rosmarinus officinalis</i>	5,08	0,16	hi
<i>Viola odorata</i>	2,08	0,00	l	<i>Lavandula angustifolia</i>	4,60	0,00	hi
<i>Pelargonium graveolens</i>	1,82	0,00	l	<i>Citrus aurantium</i>	4,35	0,00	i
<i>Lavandula angustifolia</i>	1,38	0,00	m	<i>Viola odorata</i>	3,12	0,00	j
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,37	0,00	m	<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,82	0,00	k
<i>Illicium verum</i>	1,22	0,05	m	<i>Pelargonium graveolens</i>	1,55	0,11	k
<i>Citrus aurantium</i>	1,18	0,05	m	<i>Illicium verum</i>	1,22	0,05	k
<i>Thymus vulgaris</i>	0,61	0,14	n	<i>Thymus vulgaris</i>	1,18	0,00	k
<i>Rosa damascena</i>	0,29	0,00	n	<i>Rosa damascena</i>	0,31	0,02	l
<i>Origano vulgare</i>	0,28	0,00	n	<i>Satureja hortensis</i>	0,27	0,00	l
<i>Satureja hortensis</i>	0,27	0,00	n	<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	l
<i>Aspergillus niger</i>				<i>Penicillium sp.</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Citrus limon</i>	12,70	0,65	a	<i>Matricaria recutita</i>	25,16	0,64	a
<i>Citrus aurantium</i>	12,15	0,00	ab	<i>Amyris balsamifera</i>	18,48	0,17	b
<i>Matricaria recutita</i>	11,99	0,39	b	<i>Citrus aurantium</i>	16,20	0,00	c
<i>Vetiveria zizanooides</i>	10,08	0,29	c	<i>Vetiveria zizanooides</i>	14,40	0,00	d
<i>Amyris balsamifera</i>	8,82	0,26	d	<i>Citrus limon</i>	13,05	0,00	e
<i>Salvia lavandulifolia</i>	7,33	0,19	e	<i>Salvia lavandulifolia</i>	10,25	0,09	f
<i>Eucalyptus globulus</i>	6,60	0,12	f	<i>Eucalyptus globulus</i>	7,95	0,48	g
<i>Piper nigrum</i>	6,47	0,10	f	<i>Salvia officinalis</i>	6,99	0,37	h
<i>Ocimum basilicum</i>	5,10	0,38	g	<i>Ocimum basilicum</i>	5,95	0,00	i
<i>Salvia officinalis</i>	4,78	0,18	gh	<i>Rosmarinus officinalis</i>	5,17	0,16	j
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	4,24	0,00	h	<i>Piper nigrum</i>	4,99	0,19	j
<i>Rosmarinus officinalis</i>	3,28	0,00	i	<i>Citrus aurantium</i>	4,61	0,11	jk
<i>Lavandula angustifolia</i>	3,04	0,11	i	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	4,24	0,00	k
<i>Citrus aurantium</i>	2,00	0,08	j	<i>Coriandrum sativum</i>	3,23	0,10	l
<i>Viola odorata</i>	1,66	0,25	jk	<i>Lavandula angustifolia</i>	2,76	0,46	l
<i>Pelargonium graveolens</i>	1,37	0,00	jkl	<i>Viola odorata</i>	1,56	0,00	m
<i>Coriandrum sativum</i>	1,23	0,12	kl	<i>Pelargonium graveolens</i>	1,19	0,05	m
<i>Illicium verum</i>	1,00	0,05	l	<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,05	0,06	m
<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,96	0,05	l	<i>Illicium verum</i>	1,00	0,05	m
<i>Rosa damascena</i>	0,29	0,00	m	<i>Rosa damascena</i>	0,31	0,02	n
<i>Thymus vulgaris</i>	0,28	0,00	m	<i>Origano vulgare</i>	0,28	0,00	n
<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	m	<i>Thymus vulgaris</i>	0,14	0,00	n
<i>Satureja hortensis</i>	0,07	0,00	m	<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	n

<i>Alternaria alternata</i>				<i>Chaetomium sp.</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Matricaria recutita</i>	28,73	0,62	a	<i>Matricaria recutita</i>	26,18	0,42	a
<i>Amyris balsamifera</i>	22,12	0,52	b	<i>Amyris balsamifera</i>	24,22	0,17	b
<i>Citrus aurantium</i>	16,36	0,30	c	<i>Vetiveria zizanooides</i>	17,60	0,00	c
<i>Citrus limon</i>	15,66	0,00	d	<i>Citrus aurantium</i>	12,23	0,30	d
<i>Vetiveria zizanooides</i>	14,32	0,29	e	<i>Salvia lavandulifolia</i>	11,84	0,23	de
<i>Eucalyptus globulus</i>	10,67	0,00	f	<i>Eucalyptus globulus</i>	11,64	0,26	de
<i>Salvia lavandulifolia</i>	9,40	0,00	g	<i>Citrus limon</i>	11,48	0,64	e
<i>Piper nigrum</i>	7,80	0,00	h	<i>Piper nigrum</i>	6,86	0,38	f
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	6,36	0,00	i	<i>Ocimum basilicum</i>	6,80	0,00	f
<i>Ocimum basilicum</i>	6,12	0,42	i	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	6,04	0,13	g
<i>Salvia officinalis</i>	5,70	0,18	i	<i>Salvia officinalis</i>	5,52	0,29	g
<i>Citrus aurantium</i>	4,79	0,00	j	<i>Coriandrum sativum</i>	4,76	0,21	h
<i>Rosmarinus officinalis</i>	3,85	0,36	k	<i>Citrus aurantium</i>	4,18	0,11	hi
<i>Coriandrum sativum</i>	3,66	0,17	kl	<i>Viola odorata</i>	3,64	0,23	ij
<i>Lavandula angustifolia</i>	3,31	0,09	kl	<i>Rosmarinus officinalis</i>	3,44	0,16	j
<i>Viola odorata</i>	3,12	0,23	l	<i>Lavandula angustifolia</i>	3,13	0,34	j
<i>Illicium verum</i>	2,18	0,00	m	<i>Illicium verum</i>	2,18	0,00	k
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,37	0,00	n	<i>Pelargonium graveolens</i>	1,82	0,00	k
<i>Pelargonium graveolens</i>	1,00	0,06	no	<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,00	0,09	l
<i>Thymus vulgaris</i>	0,34	0,06	op	<i>Thymus vulgaris</i>	0,41	0,13	lm
<i>Rosa damascena</i>	0,31	0,02	op	<i>Rosa damascena</i>	0,35	0,06	lm
<i>Origano vulgare</i>	0,28	0,00	o	<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	m
<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	o	<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	m
<i>Gliocladium roseum</i>				<i>Curvularia lunata</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Matricaria recutita</i>	21,25	0,00	a	<i>Amyris balsamifera</i>	21,00	0,00	a
<i>Amyris balsamifera</i>	21,00	0,00	a	<i>Vetiveria zizanooides</i>	17,60	0,88	b
<i>Vetiveria zizanooides</i>	17,92	0,32	b	<i>Matricaria recutita</i>	17,34	0,34	b
<i>Citrus aurantium</i>	12,15	0,00	c	<i>Citrus aurantium</i>	15,23	0,40	c
<i>Eucalyptus globulus</i>	10,09	0,24	d	<i>Citrus limon</i>	11,14	0,11	d
<i>Salvia lavandulifolia</i>	9,40	0,00	e	<i>Eucalyptus globulus</i>	10,48	0,48	d
<i>Salvia officinalis</i>	8,83	0,37	f	<i>Salvia lavandulifolia</i>	7,90	0,38	e
<i>Citrus limon</i>	8,00	0,43	g	<i>Ocimum basilicum</i>	7,65	0,38	ef
<i>Ocimum basilicum</i>	7,65	0,00	g	<i>Piper nigrum</i>	6,86	0,10	fg
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	6,78	0,26	h	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	6,57	0,13	g
<i>Piper nigrum</i>	6,01	0,10	i	<i>Rosmarinus officinalis</i>	4,76	0,10	h
<i>Rosmarinus officinalis</i>	5,58	0,10	i	<i>Salvia officinalis</i>	3,86	0,18	i
<i>Lavandula angustifolia</i>	4,78	0,18	j	<i>Viola odorata</i>	2,91	0,51	j
<i>Citrus aurantium</i>	4,53	0,26	j	<i>Lavandula angustifolia</i>	2,58	0,11	jk
<i>Coriandrum sativum</i>	3,74	0,09	k	<i>Coriandrum sativum</i>	2,13	0,00	jkl
<i>Viola odorata</i>	3,64	0,00	k	<i>Illicium verum</i>	1,92	0,11	klm
<i>Pelargonium graveolens</i>	2,28	0,00	l	<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,37	0,00	lmn
<i>Illicium verum</i>	1,83	0,21	lm	<i>Citrus aurantium</i>	1,09	0,07	mno
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,37	0,00	m	<i>Pelargonium graveolens</i>	0,62	0,07	nop
<i>Thymus vulgaris</i>	0,34	0,06	n	<i>Rosa damascena</i>	0,31	0,02	op
<i>Rosa damascena</i>	0,31	0,02	n	<i>Origano vulgare</i>	0,28	0,00	op
<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	n	<i>Thymus vulgaris</i>	0,17	0,03	p
<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	n	<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	p

<i>Verticillium dahliae</i>				<i>Trichoderma viride</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Matricaria recutita</i>	13,35	0,10	a	<i>Amyris balsamifera</i>	24,50	0,00	a
<i>Vetiveria zizanooides</i>	12,72	0,29	b	<i>Vetiveria zizanooides</i>	20,80	0,00	b
<i>Citrus aurantium</i>	12,15	0,00	c	<i>Matricaria recutita</i>	15,98	0,42	c
<i>Amyris balsamifera</i>	8,82	0,26	d	<i>Citrus aurantium</i>	13,93	0,40	d
<i>Eucalyptus globulus</i>	7,37	0,24	e	<i>Salvia lavandulifolia</i>	13,72	0,38	d
<i>Citrus limon</i>	6,09	0,28	f	<i>Citrus limon</i>	13,40	0,21	d
<i>Salvia lavandulifolia</i>	6,02	0,23	f	<i>Eucalyptus globulus</i>	10,48	0,36	e
<i>Ocimum basilicum</i>	5,10	0,00	g	<i>Piper nigrum</i>	9,67	0,19	f
<i>Piper nigrum</i>	4,06	0,10	h	<i>Salvia officinalis</i>	8,10	0,45	g
<i>Salvia officinalis</i>	3,59	0,09	i	<i>Ocimum basilicum</i>	7,65	0,00	g
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	3,50	0,13	i	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	5,83	0,00	h
<i>Rosmarinus officinalis</i>	3,44	0,16	i	<i>Rosmarinus officinalis</i>	5,19	0,23	i
<i>Viola odorata</i>	2,50	0,19	j	<i>Citrus aurantium</i>	3,66	0,11	j
<i>Lavandula angustifolia</i>	2,30	0,00	jk	<i>Lavandula angustifolia</i>	3,13	0,23	j
<i>Pelargonium graveolens</i>	1,91	0,09	kl	<i>Coriandrum sativum</i>	2,38	0,17	k
<i>Coriandrum sativum</i>	1,79	0,09	l	<i>Viola odorata</i>	2,08	0,00	kl
<i>Illicium verum</i>	1,22	0,05	m	<i>Pelargonium graveolens</i>	1,91	0,09	kl
<i>Citrus aurantium</i>	1,05	0,04	m	<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,82	0,00	kl
<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,91	0,00	m	<i>Illicium verum</i>	1,57	0,11	l
<i>Thymus vulgaris</i>	0,14	0,00	n	<i>Thymus vulgaris</i>	0,34	0,06	m
<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	n	<i>Rosa damascena</i>	0,31	0,02	m
<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	n	<i>Origano vulgare</i>	0,28	0,00	m
<i>Rosa damascena</i>	0,14	0,00	n	<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	m
<i>Trichotechium roseum</i>				<i>Phomopsis sp.</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Amyris balsamifera</i>	14,84	0,34	a	<i>Amyris balsamifera</i>	15,96	0,26	a
<i>Matricaria recutita</i>	14,79	0,31	a	<i>Vetiveria zizanooides</i>	15,04	0,10	b
<i>Vetiveria zizanooides</i>	14,32	0,29	ab	<i>Matricaria recutita</i>	14,79	0,31	b
<i>Citrus aurantium</i>	14,26	0,20	b	<i>Citrus aurantium</i>	9,72	0,00	c
<i>Salvia lavandulifolia</i>	9,02	0,38	c	<i>Salvia lavandulifolia</i>	8,65	0,46	d
<i>Ocimum basilicum</i>	5,95	0,00	d	<i>Citrus limon</i>	6,96	0,24	e
<i>Piper nigrum</i>	5,77	0,29	d	<i>Ocimum basilicum</i>	5,95	0,00	f
<i>Citrus limon</i>	5,74	0,21	d	<i>Piper nigrum</i>	5,46	0,00	fg
<i>Eucalyptus globulus</i>	4,85	0,00	e	<i>Eucalyptus globulus</i>	5,24	0,24	g
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	4,13	0,11	f	<i>Salvia officinalis</i>	4,05	0,23	h
<i>Salvia officinalis</i>	3,50	0,18	g	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2,90	0,29	i
<i>Citrus aurantium</i>	2,79	0,11	h	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	2,76	0,26	ij
<i>Rosmarinus officinalis</i>	2,62	0,10	hi	<i>Pelargonium graveolens</i>	2,37	0,09	jk
<i>Pelargonium graveolens</i>	2,19	0,09	i	<i>Coriandrum sativum</i>	2,21	0,08	k
<i>Viola odorata</i>	1,56	0,23	j	<i>Citrus aurantium</i>	1,92	0,11	kl
<i>Lavandula angustifolia</i>	1,20	0,05	j	<i>Viola odorata</i>	1,56	0,00	lm
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,14	0,00	j	<i>Illicium verum</i>	1,22	0,05	mn
<i>Coriandrum sativum</i>	1,10	0,04	j	<i>Lavandula angustifolia</i>	1,15	0,00	mn
<i>Illicium verum</i>	1,00	0,05	j	<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,91	0,00	n
<i>Rosa damascena</i>	0,19	0,05	k	<i>Thymus vulgaris</i>	0,21	0,07	o
<i>Thymus vulgaris</i>	0,14	0,00	k	<i>Rosa damascena</i>	0,19	0,00	o
<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	k	<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	o
<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	k	<i>Origano vulgare</i>	0,07	0,00	o

<i>Phoma sp.</i>				<i>Myrothecium verrucaria</i>			
Type of oil	Mean	St. error	Sign.	Type of oil	Mean	St. error	Sign.
<i>Amyris balsamifera</i>	16,80	0,00	a	<i>Matricaria recutita</i>	13,35	0,10	a
<i>Vetiveria zizanooides</i>	16,16	0,10	b	<i>Vetiveria zizanooides</i>	10,08	0,29	b
<i>Matricaria recutita</i>	14,79	0,31	c	<i>Amyris balsamifera</i>	8,61	0,21	c
<i>Citrus aurantium</i>	10,37	0,40	d	<i>Citrus aurantium</i>	8,10	0,26	d
<i>Salvia lavandulifolia</i>	7,14	0,23	e	<i>Salvia lavandulifolia</i>	5,60	0,00	e
<i>Citrus limon</i>	6,96	0,24	e	<i>Eucalyptus globulus</i>	5,43	0,24	ef
<i>Piper nigrum</i>	6,24	0,00	f	<i>Citrus limon</i>	5,22	0,00	ef
<i>Ocimum basilicum</i>	5,95	0,38	f	<i>Ocimum basilicum</i>	5,10	0,38	f
<i>Eucalyptus globulus</i>	4,85	0,00	g	<i>Piper nigrum</i>	3,90	0,00	g
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	3,82	0,39	h	<i>Salvia officinalis</i>	3,50	0,11	gh
<i>Salvia officinalis</i>	3,68	0,00	h	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	3,18	0,00	h
<i>Pelargonium graveolens</i>	2,37	0,09	i	<i>Coriandrum sativum</i>	2,38	0,10	i
<i>Viola odorata</i>	2,29	0,39	i	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2,21	0,10	i
<i>Citrus aurantium</i>	2,09	0,09	i	<i>Lavandula angustifolia</i>	2,12	0,18	i
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,89	0,10	i	<i>Pelargonium graveolens</i>	2,00	0,11	ij
<i>Lavandula angustifolia</i>	1,20	0,05	j	<i>Citrus aurantium</i>	1,92	0,11	ij
<i>Coriandrum sativum</i>	1,06	0,00	j	<i>Illicium verum</i>	1,57	0,11	jk
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1,05	0,06	j	<i>Viola odorata</i>	1,46	0,19	k
<i>Illicium verum</i>	0,92	0,07	j	<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,91	0,00	l
<i>Rosa damascena</i>	0,17	0,03	k	<i>Thymus vulgaris</i>	0,17	0,03	m
<i>Thymus vulgaris</i>	0,14	0,00	k	<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	m
<i>Origano vulgare</i>	0,14	0,00	k	<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	m
<i>Satureja hortensis</i>	0,14	0,00	k	<i>Rosa damascena</i>	0,14	0,00	m

BIOGRAFIJA

Tatjana Stević rođena je 12.02.1970.god. u Beogradu gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na Katedri za mikrobiologiju diplomirala je 1996.god. sa prosečnom ocenom 9.54. Diplomski rad pod nazivom „Primena AMES-ovog testa za detekciju bioantimutagenog dejstva ekstrakata žalfije (*Salvia officinalis* L.) odbranjen je sa ocenom 10. Od 1996. god. stipendista je Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije pri Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ i aktivno učestvuje u realizaciji naučnih projekata pomenutog Ministarstva. Iste godine upisala je posle diplomске studije na Katedri za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Magistarska tezu pod nazivom „Bioantimutageni potencijal etarskog ulja i različitih frakcija gajene žalfije (*S. officinalis* L.)“ odbranila je 2000.god. Od marta 2003.godine zaposlena je u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Laboratoriji za mikrobiološku kontrolu gde rukovodi kontrolom mikrobiološke ispravnosti poluproizvoda i gotovih proizvoda Instituta u kome radi. Decembra 2009.god. odbranila je specijalistički rad pod nazivom „Mikrobiološka kontrola lekovitog bilja“. Doktorski rad upisala je 2006.god. na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Kao autor ili koautor objavila je veći broj naučnih i stručnih radova koji su publikovani u međunarodnim ili domaćim časopisima, kao i niz saopštenja. Član je Srpskog društva mikrobiologa. Govori engleski jezik, a služi se ruskim jezikom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Татјана Стевић

број уписа /

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Компаративна анализа агенаса за биолошку контролу патогених гљива
изолованих са лековитих биљака“

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора ____ Татјана Стевић _____

Број уписа _____/_____

Студијски програм _Биологија микроорганизама_____

Наслов рада „Компаративна анализа агенаса за биолошку контролу патогених
гљива изолованих са лековитих биљака“

Ментор _____ Др Тања Берић и Др Катарина Шавикин _____

Потписани ____ Татјана Стевић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Компаративна анализа агенаса за биолошку контролу патогених гљива
изолованих са лековитих биљака“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____
