Utjecaj mliječno-kiselih bakterija na rast Fusarium spp.

Bulović, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:709440

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Maja Bulović
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda
Smjer Bilinogojstvo

Utjecaj mliječno-kiselih bakterija na rast *Fusarium spp.*

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Maja Bulović
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda
Smjer Bilinogojstvo

Utjecaj mliječno-kiselih bakterija na rast *Fusarium spp.*

Završni rad

Povjerenstvo za obranu završnog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
2. prof. dr. sc. Zlata Milaković, član
3. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, član

Osijek, 2017.

Temeljna dokumentacijska kartica

Završni rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Bilinogojstvo

Maja Bulović

Utjecaj mliječno-kiselih bakterija na rast *Fusarium spp.*

Sažetak:
Biološki preparati odnosno biofungicidi sve više predstavljaju bitan način zaštite usjeva od fitopatogena, stoga je i cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi njihovu djelotvornost. Rezultati provedenog *in vitro* istraživanja utvrdila su značajnu redukciju stope micelijskog rasta *Fusarium graminearum* od 77% djelovanjem *Lactobacillus casei* dok je djelovanjem *Lactobacillus brevis* zabilježena značajna redukcija stope rasta *Fusarium verticillioides od 58%.* Iz navedenih rezultat možemo zaključiti kako veliku mogućnost daljnjeg razvoja na ovom području korištenjem djelotvornih izolata mliječno kiselih bakterija pri suzbijanju rasta fitopatogenih gljiva.

Ključne riječi: biofungicidi, *Lactobacillus casei, Lactobacillus brevis, Fusarium graminearum, Fusarium verticillioides*

23 stranica, 2 tablice, 5 grafikona i slika, 28 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BSc Thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agriculture in Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production

Maja Bulović

Influence of lactic acid bacteria on growth of *Fusarium spp*.

Summary:
Biological preparations or biofungicides became increasingly important way in protecting crops against phytopathogens, so the aims of this research was to determine their efficacy. The results of *in vitro* study revealed significant reduction of mycelial growth rate *Fusarium graminearum* of 77% by *Lactobacillus casei*, while *Lactobacillus brevis* recorded a significant reduction of *Fusarium verticillioides* growth rate of 58%. From the above results we can conclude that there is a great potential for further development in this field by using effective isolates of lactic acid bacteria when suppresing growth of phytopathogenic fungi.

Keywords: biofungicides, *Lactobacillus casei, Lactobacillus brevis, Fusarium graminearum, Fusarium verticillioides*

23 pages, 2 tables, 5 figures, 28 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agriculture in Osijek and in digital repository of Faculty of Agriculture in Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

1.2. Mikrobiologija i mikroorganizmi **1**

1.2.1. Morfologija gljiva 2

1.2.2. Ishrana gljiva 3

1.2.3. Razmnožavanje gljiva 4

1.2.4. Klasifikacija gljiva 6

1.2.5. Osobine roda Fusarium 7

1.2.6. Osobine mliječno-kiselih bakterija 9

1.2.7. Antifungalna svojstva mliječno- kiselih bakterija 10

2. MATERIJALI I METODE **11**

3. REZULTATI I RASPRAVA **13**

4. ZAKLJUČAK **16**

5. POPIS LITERATURE **17**

1. UVOD

U svijetu u kojemu je teško proizvesti dovoljno hrane za sve ne smije se dozvoliti da hrana propada. Propadanje hrane već danas uzrokuje velike gubitke za svjetsko gospodarstvo. Procjenjuje se kako je kontaminacija gljivama uzrok bacanja 5 do 10% sve hrane (Munoz, 2010.). Kako u svijetu, problem zaraze gljivama prisutan je i u poljoprivredi Republike Hrvatske.

Gljive mogu uništiti usjeve na polju, uskladištene usjeve ili smanjiti njihovu kvalitetu (Munoz, 2010.). Uz navedeno, neke vrste mogu proizvoditi mikotoksine koji su štetni za ljudsko zdravlje i zdravlje životinja (Munoz, 2010.). Najopasnije gljive za navedene štete su iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium, Fusarium, Alternaria* i *Claviceps* (Munoz, 2010.). Ovaj rad bavit će se suzbijanjem rasta roda *Fusaruim* koje mogu proizvesti preko stotinu sekundarnih metabolita, to jest mikotoksina koji mogu uzrokovati akutna i kronična oboljenja ljudi i životinja (Kanižai - Šarić, 2010.). Kontaminacija gljivama moguća je na usjevima ili pak na skladištenoj hrani, iz tog razloga od nužne je važnosti spriječiti nastanak zaraza kako bi se sanirali gubici u ekonomiji, ali i ljudski te životnjski životi (Kanižai - Šarić, 2010.).

Kroz godine rada i istraživanja znanstvenika dolazi se do zaključka da je u borbi protiv gljivičnih zaraza najvažnije zaustaviti moguću zarazu hrane mikotoksinima na način da se spriječi rast gljiva koje to mogu učiniti. Kao najbolji borac pokazali su se izolati mliječno kiselih bakterija. Ovaj rad za svoj cilj ima u laboratorijskim uvjetima dokazati učinkovitost dvaju izolata mliječno kiselih bakterija *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus brevis* u inhibiciji micelijskog rasta *Fusarium graminearum i Fusarium verticillioides.*

1.2. Mikrobiologija i mikroorganizmi

Mikrobiologija dio je biologije koji se bavi raznim disciplinama proučavajući međusobno međudjelovanje na relaciji čovjek - mikroorganizam te, naravno, mikroorganizam – okoliš (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.). Međudjelovanja na navedenim relacijama su mnogobrojna, a izdvajaju se genetika, metabolizam, razne bolesti, razvoj lijekova, infekcije, imunologija, industrija, poljoprivreda, ekologija, pa sve do genetskog inženjeringa, ali i mnogih drugih odnosa (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.).

Najveći doprinos u razvoju mikrobiologije i proučavanja mikroorganizama imao je mikroskop i njegovo otkriće (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.). Ovim revolucionarnim otkrićem otkrivene su potpuno nove mogućnosti za istraživanja u ovom području (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.). Rad u mikrobiologiji obilježili su najbolji znanstvenici svijeta poput Louisa Pasteura, Josepha Listera ili pak Roberta Kocha (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.). Nagli razvoj mikrobiologije krenuo je početkom 20. stoljeća zbog strahovitog napretka u razvoju genetike i biokemije (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.). Veliki napredak mikrobiologije obilježilo je otkriće DNK-a (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.).

Najpoznatiji predstavnici mikroorganizama su virusi, bakterije, gljive, protozoe i alge, a rasprostranjenost im je iznimno široka (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.). Mikroorganizmi se naseljavaju u svakom dijelu bio sfere. Pronađeni su na područjima poput špilja, naftnih bušotina, vrućih vulkanskih izvora, na dnu oceana, ali i u pustinjama (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.). Mikroorganizmi mogu podnijeti velike temperaturne razlike, a zbog toga ih razvrstavamo na termofile, mezofile i psihrofile (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.). Razvoj informacijskih, računalnih i biotehnoloških znanosti uvelike doprinosi razvoju i širenju istraživanja. Samim time, primjena mikroorganizama u raznim ljudskim djelatnostima sve je šira (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.). Mikroorganizme danas primjenjujemo u različitim granama poput medicine, biokemije, genetskog inženjerstva, ekologije, poljoprivrede i ostalim raznim granama industrije sve zbog modernih tehnologija i njihova razvoja (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.).

Mikroorganizme klasificiramo kako bismo lakše uočili njihove razlike i sličnosti, a to činimo prema morfološkim, fiziološkim, metaboličkim i ekološkim karakteristikama (Prescott i sur., 1996.). Općeprihvaćena klasifikacija mikroorganizama je ona koju su predložili Woese i Fox, a ona obuhvaća sve živa bića u tri domene: *Bacteria, Archaea* i *Eucarya,* dok je svaka domena opisana drugačijom vrstom stanične stijenke (Thalaro K. i Thalaro A., 1996.).

Mikologija je znanstvena disciplina unutar mikrobiologije koja se bavi proučavanjem gljiva. Gljive mogu biti jednostanični organizmi, poput kvasaca i višestanični poput plijesni (Duraković, 2003.).

1.2.1. Morfologija gljiva

Velika većina gljiva pripada porodicama s kojima se svakodnevno susrećemo kao što su plijesni što rastu na kruhu, voću i siru ili na vlažnome tekstilu, kvasci koji se upotrebljavaju

u proizvodnji kolača i piva ili pak jestive i otrovne gljive, sve one su vrste gljiva (Duraković, 2003.).

Gljive su eukarioti, nefotosintetički organizmi čije su stanice obavijene staničnom stijenkom koja je, u pravilu, sastavljena od polisaharida hitina (Duraković, 2003.). Vegetativno tijelo gljive je građeno od produženih, cjevastih stanica koje nazivamo hifama (Duraković, 2003.). Najprimitivnije među gljivama, sluznjače (*Mastigomycotina*), nemaju hife, nego se u njih vegetativno tijelo sastoji od protoplazme u kojoj leže jezgre, također nema ni stanične stijene, tj. tijelo je golo (Kišpatić, 1992.). Kvasci su jednostanične gljive i razmnožavaju se nespolno stvaranjem pupa ili spolno tvorbom spora (Kišpatić, 1992.). Kvasci se uglavnom pojavljuju kao pojedinačne stanice koje su veće od bakterijskih i posjeduju većinu eukariotskih organela (Kišpatić, 1992.). Plijesni dolaze u obliku velikih nakupina hifa koje su odgovorne za patuljasti rast ili paučinast izgled makroskopskih kolonija plijesni (Kišpatić, 1992.).

S obzirom na smještaj vegetativnog tijela s hifama, gljive možemo podijeliti na endoparazitske i ektoparazitske (Kišpatić, 1992.). Kada je gljiva, to jest parazit u tkivu biljke, kažemo da su to endoparazitske gljive. S druge strane, ako je parazit s fruktifikacijskim organima na površini biljke, nazivamo ih ektoparazitskim gljivama (Kišpatić, 1992.).

1.2.2. Ishrana gljiva

Prema načinu ishrane gljive su isključivo heterotrofni organizmi što znači da se hrane organskom tvari. Razgradnjom organske tvari u zrak otpuštaju CO_2, a tlu vraćaju mineralne tvari. Gljive koriste ugljik iz supstrata lučeći enzime koji razgrađuju molekule supstrata u manje molekule koje stanica tada može apsorbirati. Gljive mogu razgraditi gotovo sve prirodne materijale (Janeš, 2009.).

Većina gljiva su saprofiti, što znači da koriste izvore ugljika iz mrtvih biljaka ili životinja te iz tla ili vode (Kišpatić, 1992.). Druga, manja skupina parazitskih gljiva koristi živog domaćina, biljku ili životinju za svoju prehranu, uzrokujući bolesti biljaka (Kišpatić, 1992.). Budući da su se parazitske gljive razvijale postupno iz saprofitskih postoji čitav niz prijelaznih oblika sve do najviše forme parazitizma: obligatnog. Takva vrsta gljiva većinu životnog ciklusa provede kao parazit uzrokujući bolesti, a u nepovoljnim uvjetima prelazi na saprofitski način ishrane (Kišpatić, 1992.). Poseban način ishrane imaju petrofiti: oni žive na živim biljkama, ali se hrane mrtvim stanicama te biljke koje su prethodno ubijene

enzimima ili toksinima gljive, a tek onda u njih prodire sama gljiva (Kišpatić, 1992.). Triptofiti su pak gljive koje enzimima samo oslabe tkivo pa ono odumre od abiotskog faktora (npr. mraz), a tek onda triptofit naseljava to mrtvo tkivo u živoj biljci. Zajednički naziv za pertrofite i triptofite je nekrofiti (Kišpatić, 1992.).

1.2.3. Razmnožavanje gljiva

Nespolno razmnožavanje odvija se na nekoliko načina:

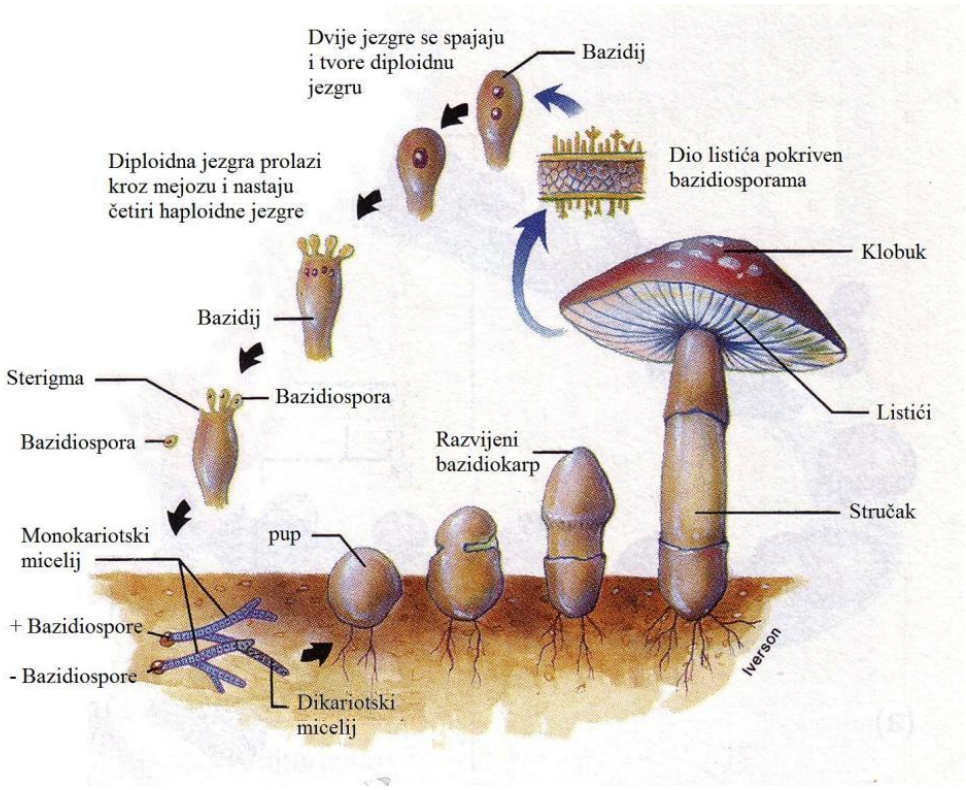
1. roditeljska stanica se može podijeliti u dvije stanice kćeri sužavanjem u središtu i tvorbom nove stanične stijenke
2. somatske vegetativne stanice mogu tvoriti pup radi stvaranja organizama, to je zajedničko kvascima
3. najčešći postupak nespolnog razmnožavanja jest tvorba spora koja se pojavljuje u pojedinačne gljive u tijeku mitoze i kasnijeg staničnog dijeljenja (Durakoviće S. i Durakoviće L., 2003).

Postoji nekoliko tipova nespolnih spora, a Durakoviće (2003.) navodi: artrokonidije ili artrospore, klamidospore, sporangiospore, konidiospore i blastospore. Spore nastale spolnim putem služe za održavanje gljive u nepovoljnim uvjetima (Durakoviće S. i Durakoviće L., 2003.). Prilikom spolnog razmnožavanja dolazi do izmjene genetskog materijala koji rezultira nastankom nove jedinke koja ima manje varijacije oblika i funkcije od svojih roditelja te se na takav način može bolje prilagoditi mijenjajućem okolišu osiguravajući time opstanak vrste (Janeš, 2009.). Neke vrste gljiva jesu samooplodne i tvore spolno kompatibilne gamete na istome miceliju. Ostale vrste zahtijevaju vanjsko križanje između različitih ali spolno skladnih micelija (Durakoviće S. i Durakoviće L., 2003.).

Spolna oplodnja može biti izogamna i oogamna (Kišpatić, 1992.). Kod izogamije dolazi do stapanja morfološki jednakih stanica, za razliku od oogamije, gdje se spajaju dvije različite spolne stanice (Kišpatić, 1992.). Nakon izogamnog spolnog procesa u nižih gljiva razvijaju se zigote: anternodij (muška) i oogonij (ženska spolna stanica) koje stapanjem, daju oosporu kao rezultat oogamije (Kišpatić, 1992.). Najpoznatije spolne spore su: zigospore, askospore i bazidiospore (Janeš, 2009.). Zigospore su otporne diploidne spore koje se formiraju prilikom dodira hifa dviju nasuprotnih sojeva (plus i minus soj) (Janeš, 2009.). Hife se spajaju i stvaraju diploidnu zigotu koja bubri te je zaštićena čvrstom staničnom stijenkom, a

kada okolišni uvjeti dopuste a stanična stijenka popusti zigota proklije u sporangij (Janeš, 2009.).

Drugi tip spolnih stanica jesu askospore. One nastaju spajanjem jezgara dviju stanica koje su morfološki slične ili su pak različite. Te se spore stvaraju u strukturi nalik vrećici, što se naziva askus (Duraković S i Duraković L., 2003.). Bazidiospore se formiraju na vanjskoj strani bazidija (Janeš, 2009.). Spore se spajaju tvoreći rubne stanice s diploidnom jezgrom, svaka od tih stanica postaje bazidija (Slika 1.). U bazidiju se obično nalaze po četiri bazidiospore (Janeš, 2009.). Procesom mejoze nastaju četiri haploidne jezgre koje se istiskuju na vrh bazidija gdje zriju u bazidiospore (Janeš, 2009.).



Slika 1. Nastanak bazidiospora kod mesnatih gljiva (https://www.google.hr/search?q=Nastanak+bazidiospora+kod+mesnatih+gljiva&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwixqJDxkubVAhWEXhQKHRs5CXEQ_AUICigB&biw=1366&bih=651#imgrc=FCZ1w2qS6GziGM)

Spore gljiva su vrlo važne zbog nekoliko razloga. Veličina, oblik, boja i broj spora korisni su pri identifikaciji vrsta gljiva (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Spore su često male i bezbojne i mogu zaostati suspendirane u zraku za dulja razdoblja. Također, rasprostranjuju se tako da se prihvate na tijela kukaca i životinja (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Široka

rasprostranjenost gljiva posljedica je uspješnog sustava razmnožavanja i rasijavanja bez kojeg cijeli biljni i životinjski svijet ne bi bio toliko uspješan kao što je danas (Duraković S, i Duraković L., 2003.).

1.2.4. Klasifikacija gljiva

Gljive se klasificiraju u pet razreda koji se međusobno razlikuju po vrsti spore, po morfologiji i spolnom ciklus (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Razredi gljiva koje razlikujemo su: *Oomycetes, Zigomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes* i *Deuteromycetes* (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Za identifikaciju i klasifikaciju gljiva bitno je nekoliko osobina: način razmnožavanja, tvorba micelija i tvorba staničnih struktura (Duraković S, i Duraković L., 2003.).

Pripadnici razdjela *Oomycota* zajednički se opisuju kao vodene plijesni (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Gljive iz razreda *Oomycetes* su građene od hifa, a po izgledu nalikuju gljivama (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Nespolno se razmnožavaju pomoću zoospora s dva biča koji se razvijaju u zoosporangijima (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Kod parazita prilagođenih suhozemnom načinu života, nespolno razmnožavanje vrši se pomoću sporangija (konidija) (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Spolni način razmnožavanja ovog razreda je oogamija. Spolne stanice su anteridij i oogonij, a njihovom kopulacijom nastaje trajna spora oospore (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Predstavnici iz razreda *Oomycota* su: *Aprolegnia, Acglya, Peronospora hyoscyami, Phytophthora infestans* koja je uzročnik truljenja krumpira i *Plasmopara viticola* uzročnik pahuljaste pljesnivosti grožđa (Duraković S, i Duraković L., 2003.).

Razred *Zygomycetes* karakterizira spolno razmnožavanje putem zigospora, nespolno razmnožavanje uglavnom sporangiosporama ili konidiospora (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Velika većina ovog razreda su saprofiti koji žive na razgrađenom biljnom i životinjskom materijalu u tlu (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Samo mali broj gljiva iz ovog razreda parazitira na biljkama, kukcima, životinjama ili ljudima. Primjeri su *Rhizopus, Mucor, Syncephalastrum* (Duraković S, i Duraković L., 2003.).

U razred *Ascomycetes* spadaju gljive mješinarke (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Mješinarke se spolnim putem razmnožavaju tvorbom askusa i askospora, dok se nespolno razmnožavaju putem više vrsta konidiospora formiranih na vrhu konidiofora (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Primjeri ovog razreda gljiva iznimno su popularni u medicini i

prehrambenoj industriji: *Penicillium*, koje se koriste za proizvodnju antibiotika te *Saccharomyces* za proizvodnju piva i kruha (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Većina vrsta su plijesni ili kvasci (Duraković S, i Duraković L., 2003.).

Razred *Basidiomycetes* čine gljive klobučarke (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Ovom razredu pripadaju gljive koje rastu na drveću, jestive gljive, gljive puhare, hrđe, snijeti i otrovne gljive a najveći ih broj živi kao saprofiti (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Klobučarke se spolno razmnožavaju rastom bazidija i bazidiospora, dok se nespolno razmnožavaju putem konidiospora (Duraković S, i Duraković L., 2003.).

Razred *Deuteromycetes* uključuje gljive kod kojih izostaje spolni način razmnožavanja (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Nespolno se ovaj razred gljiva razmnožava putem različitih vrsta konidiospora (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Neke od predstavnica ovog razreda su komercijalno i medicinski važne (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Među najvažnije gljive ovog razreda ubraja se rod *Penicillium*, iznimno važan u biosintezi antibiotika penicilina i grizeofulvina, predstavnici kojega jednom pripadaju razredu *Ascomycetes*, a drugi put razredu *Deuteromycetes* (Duraković S, i Duraković L., 2003.). U ovaj razred ubraja se većina kvasaca i plijesni, a predstavnici ovog razreda su većinom saprofiti, samo su rijetke vrste paraziti (Duraković S, i Duraković L., 2003.). Najpoznatiji primjeri ovoga razreda su *Coccidioides immitis, Candida albicans* i *Cladosporium* (Duraković S, i Duraković L., 2003.).

1.2.5.Osobine roda Fusarium

Gljive iz roda *Fusarium* pripadaju redu *Hyphales,* razredu *Hyphomycetes,* u pododjelu *Deuteromycotina*. Kada je riječ o spolnom stadiju, u slučaju da je on poznat, on pripada pododjelu *Ascomycotina*, razredu *Pyrenomycetes*, redu *Hypocreales* (Kanižai - Šarić, 2010., prema Ćosić i sur., 2004; Ćosić i sur., 2008.). Gljive roda *Fusarium* koje uzrokuju biljne bolesti obilježava globalna rasprostranjenost, a mogu parazitirati na ogromnom broju kultiviranih, ali i korovnih vrsta bilja. Također, rod *Fusariuma* se kozmopolitski rasprostranjuje u tlu i na organskim supstratima (Kanižai - Šarić, 2010., prema Ćosić i sur., 2004; Ćosić i sur., 2008.).

Gljive iz roda *Fusarium* uzrokuju bolesti koje nazivamo fuzarioze i mogu preživjeti u tlu na raznim biljnim ostacima, i to u obliku klamidospora ili micelija. Temperature koje pogoduju njihovu razvoju su između 14 i 23°C, a poželjno je i vlažno tlo (Vratarić i Sudarić, 2008.).

Simptomu bolesti biljaka koje uzrokuju fuzarioze pojavljuju se u reproduktivnim fazama razvoja biljaka (Grau i sur., 2004.). Gljive ovoga roda imaju veliku mogućnost prilagodbe na različite vremenske uvjete, čak i one ekstremne. Upravo ta mogućnost adaptacije na različite vremenske uvjete omogućava raširenost ovih gljiva u mnogim agroklimatskim regijama svijeta stoga su predstavnici roda *Fusarium* od velike važnosti za ekonomski aspekt poljoprivredne proizvodnje (Booth, 1971.).

Dominantna vrsta na izolirana iz svih dijelova pšenice u period od 1996. - 2002. na području istočne Hrvatske je *Fusarium graminearum* Schw (Ćosić i sur.2004). Isto istraživanje navodi i druge vrste, poput *Fusarium verticillioides Sacc., Fusarium subglutinans, Fusarium avenaceum, Fusarium culmorum, Fusarium poae, Fusarium oxysporium, Fusarium solani, Fusarium sporotrichoides, Microdochium nivale,* ali u manjem postotku. *F. verticilloides* dominira na stabljikama i zrnju kukuruza (Ćosić i sur., 1999. Ćosić i sur., 2004, Cvetnić i sur., 2005.).

F. graminearum uzrokuje trulež korijena, palež klijanaca te palež klasova ječma i pšenice. Od svih bolesti koje uzrokuje *F. graminearum* najveću ekonomsku štetu donosi palež klasova na pšenici, a upravo je ta vrsta identificirana kako najveći uzročnik paleži klasova pšenice i ostalih žitarica malog zrna u cijeloj mediteranskoj regiji. Osim na usjevima pšenice, *F. graminearum* široko je raširen i na kukuruzu, i to u umjerenom i suptropskom području koja uključuju i europska područja uzgoja ove biljke. *F. graminearum* na kukuruzu uzrokuje trulež korijena, palež klijanaca te truljenje stabljike i klipa (Kanižai - Šarić, 2010., prema Vigier i sur., 2001; Logrieco i sur., 2002; Ćosić i sur., 2004). *Fusarium verticillioides* uzrokuje trulež zrna i klipa kukuruza.

Pregledom navedenih istraživanja jasno je kako se u agrikulturi Republike Hrvatske najčešće pojavljuju *F.graminearum* i *F.verticillioides* koje uvelike mogu naštetiti prinosu te kvaliteti zrna, a samim time nanijeti i veliku financijsku štetu poljoprivrednicima, a posljedično i gospodarstvu Republike Hrvatske (Kanižai - Šarić, 2010.). Kao posljedica velikih šteta uzrokovanih bolestima od strane gljiva roda *Fusarium,* mogu biti i poskupljenja finalnih proizvoda poput brašna, kruha i ostalih prehrambenih proizvoda za koje su potrebne žitarice (Kanižai - Šarić, 2010.). Naravno, osim gospodarskog rizika postoji mogućnost i rizika za zdravlje ljudi, jer navedeni patogeni mogu u zrnu akumulirati mikotoksine, koji posljedično mogu negativno utjecati na zdravlje ljudi i životinja u slučaju konzumacije zagađene hrane (Kanižai - Šarić, 2010.).

Kukuruz i pšenica ali i ostale žitarice maloga zrna od velike su važnosti kao izvor prehrane, energije i proteina za sve vrste domaćih životinja (Kanižai - Šarić, 2010., prema Placinta i sur.,1999.). Kako je važnost ovih žitarica izuzetna za naše područje, a iste žitarice su idealne za razvoj bolesti uzrokovanih predstavnicima roda *Fusarium*, od ključne važnosti je poznavanje puteva zaraze (Kanižai - Šarić, 2010.).Također, potrebno je obratiti pažnju i na kontaminaciju mikotoksinima koje metaboliziraju predstavnici ovoga roda, a s ciljem pravodobne antigljivične i antimikotoksikogene prevencije (Kanižai - Šarić, 2010.).

Gljive iz roda *Fusarium* uzrokuju bolest i na agrumima, ona se javlja nakon izmrzavanja, a uzrok joj je, za sad, nepoznata gljiva iz roda *Fusarium* (Cvjetković, 2010.). Kada ova gljiva napadne agrume, ona uzrokuje suhi trulež korijena agruma, dok na kori dolazi do venuća i konačno pucanja kore. Simptome ove bolesti moguće je uočiti i na granama te na deblu ili korijenu (Cvjetković, 2010.).

Sekundarni metboliti gljiva su miktoksini koji uzrokuju različite bolesti kod životinja, ali i ljudi. U najopasnijim slučajevima moguća je i smrt kod bolesnika. Mikotoksini najčešće napadaju uskladištene biljke. Kod takvih biljaka nalaze se najveće koncentracije mikotoksina, koje posljedično uzrokuju bolesti biljaka (Bennet i Klich, 2003.).

Biosintezu sekundarnih metabolita gljiva mogu potaknuti uvjeti u okolišu, to jest fizikalno - kemijski parametri poput temperature, količine kisika, slobodne vode ili pH supstrata (Kanižai - Šarić, 2010.).Također, ona ovisi i o vrsti gljivice, gljivičnom soju te genetskim osobinama gljiva (Kanižai - Šarić, 2010.). Prema posljednjim istraživanjima, do sada je izolirano preko 300 različitih mikotoksina koji su uglavnom stabilne molekule, niske molekularne mase (Kanižai - Šarić, 2010.).

1.2.6. Osobine mliječno-kiselih bakterija

Bakterije su mikroorganizmi koju su najčešće veliki nekoliko mikrometara. Bakterije možemo pronaći na svim mjestima u širokom spektru oblika i vrsta (Fredrickson i sur., 2004.). Kako je za ovaj rad posebno važna vrsta bakterija roda *Lactobacillus,* više će riječi biti specifično o njima te naposljetku o vrstama koje su poslužile u istraživanju *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus brevis.*

Lactobacillus su bakterije koje su dio grupe bakterija mliječne kiseline. Njihova uloga u organizmu je pretvaranje šećera u mliječnu kiselinu (Makarova i sur., 2006.). Neke vrste se koriste u prehrambenoj industriji za fermentaciju u proizvodnji mliječnih proizvoda ili piva, ali i hrane za životinje. Bakterije *Lactobacillus* imaju antibakterijsko i antigljivično djelovanje te su iz tog razloga izuzetno važan faktor u prehrambenoj industriji (Inglin, 2015.). Pravilnom upotrebom, oni mogu produžiti rok trajanja namirnicama te spriječiti nastanak gljivičnih bolesti (Inglin, 2015.).

L. casei je moguće pronaći u ljudskom probavnom sustavu, ustima i crijevima (WHO, FAO, 2002.). *L. casei* ima široki pH raspon te se može prilagoditi širokoj temperaturnoj razlici (WHO, FAO, 2002.). Neki mpredstavnici *L. casei* mogu biti i probiotici koji mogu pomoći pri izlječenju bolesti uzrokovanih bakterijama (WHO, FAO, 2002.). *L. casei* u kombinaciji s ostalim probioticima može djelovati i kao antibiotik, pogotovo u liječenju dijareje (McFarland, 2009.).

L. brevis je štapićasta vrsta bakterija mliječnih kiselina koja stvara CO_2 i mliječne kiseline tijekom fermentacije (Pavlova i sur., 2002.). *L. brevis,* je moguće je pronaći u različitim okruženjima poput fermentirane hrane, ljudskom probavnom sustavu ili izmetu (Pavlova i sur., 2002.). *L. brevis* moguće je pronaći i u zrnima vodenog kefira gdje proizvodi polisaharid *dekstrtran* koji oblikuje zrna (Pavlova i sur., 2002.).

1.2.7. Antifungalna svojstva mliječno- kiselih bakterija

Bakterije mliječne kiseline često se koriste u proizvodnji hrane tako da osiguravaju njenu sigurnost, stabilnost, okus, strukturu, ali i dugotrajnost (Schnürer i Magnusson, 2005.). One se mogu pronaći u raznim prehrambenim proizvodima poput mliječnih ili mesnih proizvoda, ali i u povrću. Često se koriste kao biološki konzervansi (Schnürer i Magnusson, 2005.). Bakterije mliječne kiseline produžuju rok trajanja prehrambenim proizvodima proizvodnjom organskih kiselina (Magnusson i sur., 2003.). Također, provode se i istraživanja o antifungalnom utjecaju ovih bakterija (Laitila i sur., 2002.).

Istraživanje Magnussona i suradnika (2003.) na preko 1200 izolata bakterija mliječnih kiselina i njihova utjecaja kao antigljivičnog preparata, 10% njih pokazalo je aktivnosti koje mogu spriječiti širenje gljiva, dok je 4% izolata pokazalo snažnu aktivnost protiv gljiva. Schnürer i Magnusson (2005.) u svom preglednom radu donose najvažnija istraživanja koja potvrđuju efikasnost bakterija mliječne kiseline u suzbijanju širenja gljiva. U konačnici

zaključuju kako je ovo područje istraživanja još uvijek malo istraženo te da je potrebno provesti još niz istraživanja u svrhu otkrivanja najboljih mogućih rješenja i strategija za korištenje ovih mikroorganizama u suzbijanju širenja gljiva.

Korištenje bioloških konzervansa omogućava produljenje života proizvoda te poboljšava sigurnost proizvoda (Munoz i sur., 2010.). Kao idealni mikroorganizmi za dekontaminaciju ističu se i bakterije mliječnih kiselina koje se i inače koriste u konzerviranju i proizvodnji hrane. Također, navedeni mikroorganizmi imaju i probiotičko djelovanje (Munoz i sur., 2010.). Bakterije mliječne kiseline su mikroorganizmi koji su uglavnom prepoznati kao sigurni za poboljšanje kvalitete hrane, a istovremeno posjeduju nutritivne i terapeutske vrijednosti (Munoz i sur., 2010.). Većina istraživanja o antimikrobnom djelovanju bakterija mliječne kiseline bazirana je na antibakterijskom djelovanju, dok je samo manji dio tih istraživanja za svoj fokus uzeo njihovo antigljivično djelovanje (Munoz i sur., 2010.).

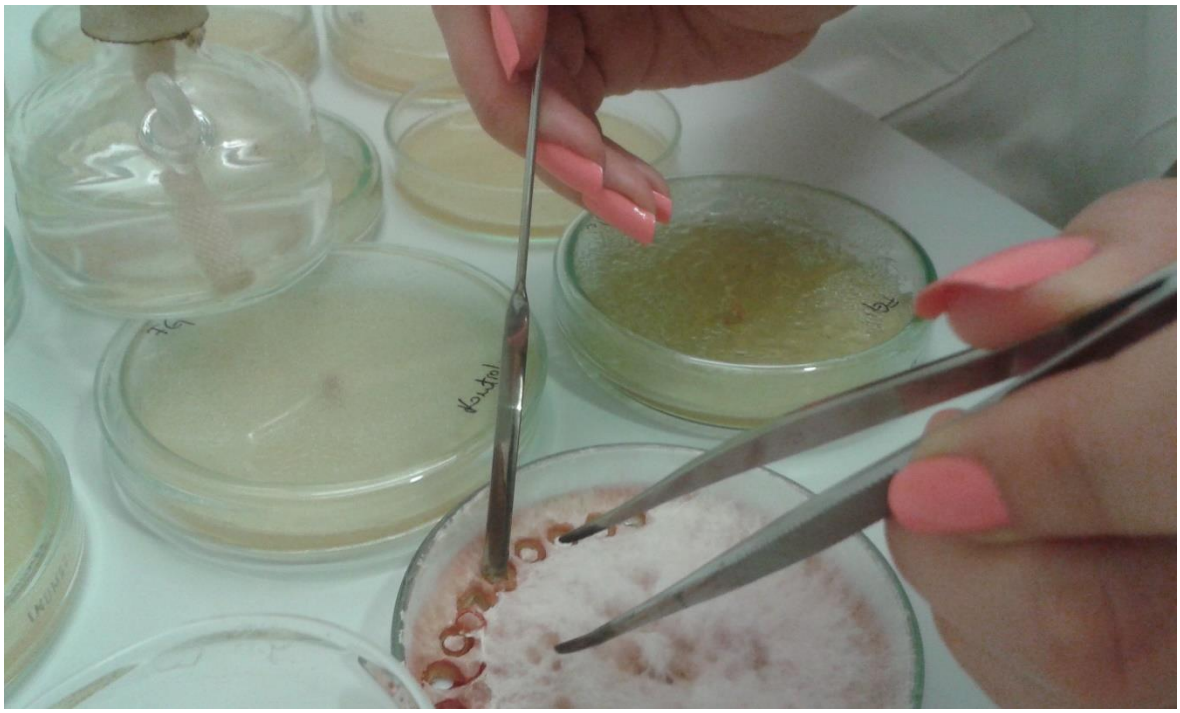
2. MATERIJALI I METODE

U svrhu ovog završnog rada proveden je *in vitro* pokus u kojemu su korištene mliječno-kisele bakterije *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus brevis* koje su umnožene na MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) agaru (Merck, Njemačka) pri temperature od 30ºC±0,2°C (Slika 2).



Slika 2. Nacijepljivanje mliječno-kiselih bakterija (Gabriella Kanižai Šarić, 2016.)

Kulture *Fusarium graminearum* Schwabe 110250 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Nizozemska) i *Fusarium verticilloides* M-1325 (Fusarium Research Center, Department of Plant Pathology, Penn State University, SAD su korištene za dokazivanje antifungalnog djelovanja i umnožene su na PDA (potato dexstrose) agaru (Biolife, Italija) pri temperaturi od 25°C±1°C kroz pet dana. Pokus je proveden metodom dvostruke kulture u dva sloja hranjivog medija (Magnusson i sur. 2003.). Prvotno je na MRS agar nacijepljen ispitivani izolat mliječno-kiselih bakterija a potom je nanešen PDA agar, koji je omogućio stvaranje mikroaerofilnih uvjeta, a na koji je nacijepljen disk promjera 4 mm ispitivanih gljiva (Slika 3.).

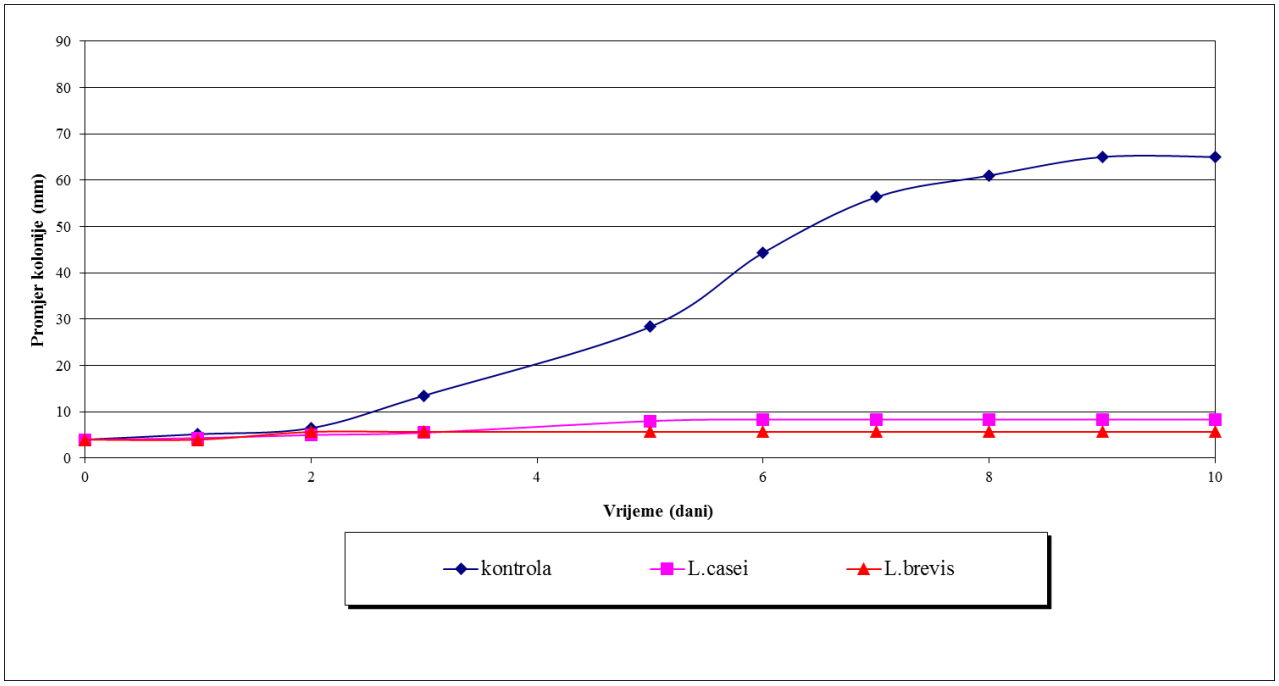


Slika 3. Nacijepljivanje *F. garminearum* (Gabriella Kanižai Šarić, 2016.)

Kontrole nisu nacijepljene s mliječno-kiselim bakterijama. Pokus je proveden u tri ponavljanja na temperaturi od 30ºC±0,2°C. Porast gljiva je praćen svakodnevno kroz 2 tjedna i korišten je za određivanje fungalne stope rasta uz korištenje Microsoft Excel (2013.). Numeričke varijable su analizirane Studentovim t-testom uz korištenje Statistica 13 (Dell Inc. 2016.).

3. REZULTATI I RASPRAVA

In vitro istraživanje koje je provedeno u svrhu završnog rada, je potvrdilo izraženu antifungalnu aktivnost, u pokusu korištenih, mliječno -kiselih bakterija pri čemu je utvrđena manja stopa rasta *F. graminearum* za 77% djelovanjem *L. casei* i 71% djelovanjem *L. brevis* u usporedbi s kontrolom (Grafikon 1.). Djelovanjem i *L. casei i L.* brevis utvrđena je statistički značajna razliku p<0,05 (Tablica 1.) u inhibiciji rasta *F. gramineraum.*



Grafikon 1: *Rast F. graminearum uz L. brevis i L. casei*

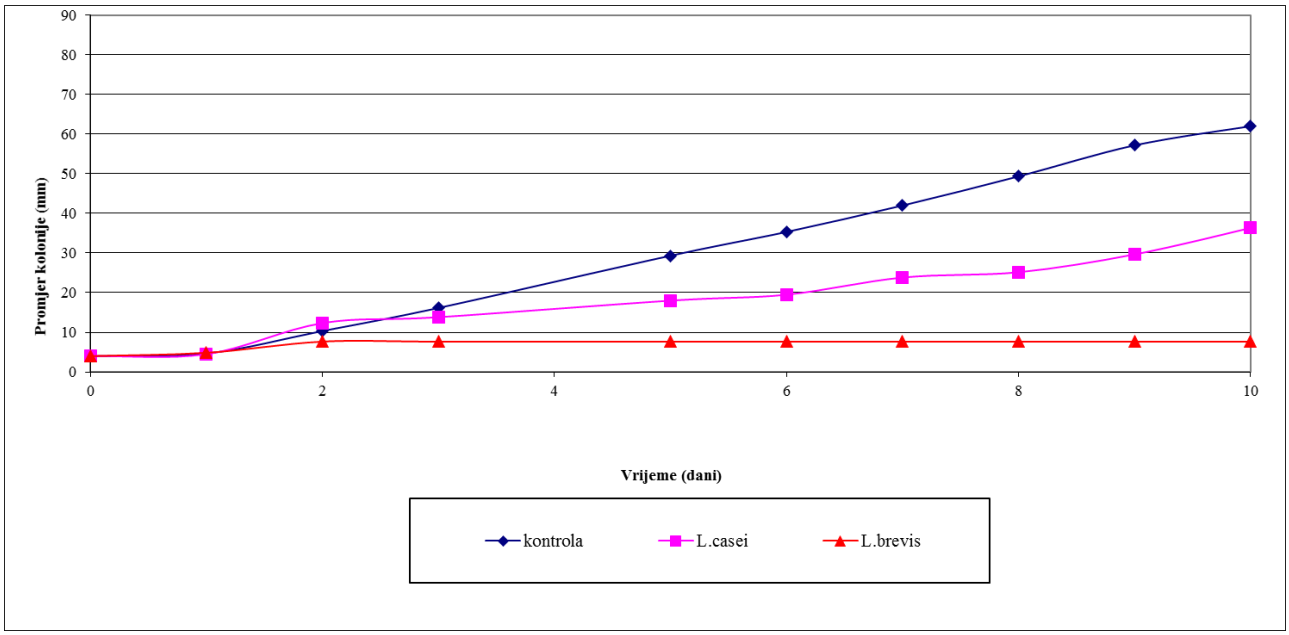
Tablica 1.*:* Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *F. graminearum*

kombinacije antifungalnih tvari	**stopa rasta** (mm/dan)	**P**
Kontrola	3,5	
Lactobacillus casei	0,8	0,003365*
Lactobacillus brevis	1,0	0,002206*

*stopa rasta značajno niža od kontrole, p<0,05

Različita istraživanja potvrdila su antifungalna svojstva mliječno-kiselih bakterija. Munoz i suradnici (2010.) su utvrdili inhibitorno djelovanje *Lactobacillus fermentum* i *Lactoabacillus rhamnosus* u rangu od 10 do 73% na porast *Aspergillus nomius* VSAC 23. Autori zaključuju kako korištenje mliječno-kiselih bakterija s antifungalnim osobinama može povećati nutritivnu vrijednost i produžiti rok trajanja namirnicama. Istraživanje Laref i Guessas (2013.) utvrdilo je da od 54 ispitanih izolata mliječno-kiselih bakterija reizoliranih iz prirodnih izvora samo 16% ima antifungalnu aktivnost, dok ih samo 11% pripada rodu *Lactobacillus*. Antifungaln aktivnost je ispitana na predstavnicima roda *Aspergillus* spp., *Fusarium, Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. i *Stemphylium* spp. Ispitane mliječno-kisele bakterije u istom istraživanju pokazuju fungicidan učinak pri čemu nije zabilježen micelijski rast u tekućoj hranjivoj podlozi niti nakon sedam dana uzgoja.

Djelovanjem *L. brevis* utvrđena je redukcija stope rasta *F. verticillioides* za 58% u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 2.) pri čemu je utvrđena statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$) (Tablica 2.). *L. casei* također inhibira rast *F. verticillioides*, ali nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu.



Grafikon 2: *Rast F. verticillioides uz L. brevis i L. casei*

Tablica 2: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *F. verticillioides*

kombinacije antifungalnih tvari	**stopa rasta** (mm/dan)	**P**
Kontrola	3,1	
Lactobacillus casei	1,9	Ns
Lactobacillus brevis	1,3	0,002498*

*stopa rasta značajno niža od kontrole, $p<0,05$

Ns- not significant

Slične rezultate zabilježeni su u istraživanju Matei i suradnika (2014.) pri čemu je ispitan utjecaj 27 izolata mliječno-kiselih bakterija reizoliranih iz svježeg i fermentiranog povrća i njihov antagonistički učinak na pripadnike roda *Fusarium, Aspergillus* i *Penicillium*. Rezultati su utvrdili snažni antagonistički učinak pojedinih izolata mliječno kisele bakterije na rast *Aspergillus* i *Fusarium* vrsta. Laitila i suradnici (2002.) također su dokazali učinkovitost bakterija mliječne kiseline u suzbijanju gljiva. U ovom slučaju to je *Lactobacillus plantarum* koja se pokazala kao efikasna u suzbijanju problema uzrokovanih gljivama iz roda *Fusarium.* Gomah i Zohri (2014.) u svom su istraživanju dokazali uspješnost *L. rhamnosus* i *Lactobacillus paracasei* u smanjivanju proizvodnje mikotoksina kod tri vrste roda *Fusariuma*, među kojima je i *F. graminearum*. Iako istraživanje nije dokazalo utjecaj navedenih bakterija mliječne kiseline na sam rast gljiva, donijelo je dokaze o suzbijanju štetnih sekundarnih metabolita te još jednom otvorilo mogućnost upotrebi ovih bakterija u prehrambenoj industriji kao bioloških konzervansa (Gomah i Zohri, 2014.).

4. ZAKLJUČAK

Rezultati provedenog istraživanja potvrdili su inhibiciju micelijskog rasta *F. graminearum* i *F. verticillioides* uz djelovanje *L. brevis.* S druge pak strane, *L. casei* je značajno inhibira rast *F. greminearum,* međutim nema zadovoljavajući učinak u inhibiciji *F. verticllioides.* Rezultati ovog *in vitro* istraživanja dokazuju antifungalnu djelotvornost ispitanih izolata mliječno-kiselih bakterija u inhibiciji rasta roda *Fusarium*. Uz pozitivne rezultate istraživanja, potrebno je istaknuti kako su potrebna daljnja istraživanja i rad na ovom području kako bi se sa mogla utvrditi djelotvornoost i drugih izolata mliječno- kiselih bakterija na inhibiciju ne samo roda *Fusarium* već i drugih štetnih fitopatogena u poljoprivrednoj proizvodnji.

5. POPIS LITERATURE

1. Bennet, J.W., Klich, M. (2003.): Mycotoxins, Clinical Reviews, 16(3): 497-516
2. Booth, C., (1971.): The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, London, 237.
3. Cvetnić Z, Pepeljnjak S, Šegvić M. 2005. Toxigenic potential of *Fusarium* species isolated from non-harvested maize. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 56: 275-280.
4. Cvjetković, B., (2010): Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze. Zrinski d.d., Čakovec, 543.
5. Cvetnić Z, Pepeljnjak S, Šegvić M. (2005.): Toxigenic potential of *Fusarium* species isolated from non-harvested maize. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 56: 275-280.
6. Ćosić J, Jurković D, Drezner G. (1999.): *Fusarium* vrste utvrñene na korijenu i vlati pšenice u istočnoj Hrvatskoj. Poljoprivreda 5: 7-12.
7. Ćosić J, Vrandečić K, Svitlica B. (2004.): *Fusarium* vrste izolirane s pšenice i kukuruza u istočnoj Hrvatskoj. Poljoprivreda 10: 9-14.
8. Duraković, S., Duraković, L. (2003.): Mikologija u biotehnologiji, Kugler, Zagreb. 447.
9. Fredrickson JK, Zachara JM, Balkwill DL, Kennedy D, Li SM, Kostandarithes HM, Daly MJ, Romine MF, Brockman FJ (2004). Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state. Applied and Environmental Microbiology. 70 (7): 4230–4241.
10. Grau, C.R., Dorrance, A.E., Bond, J., Russin, J.S., (2004): Fungal diseaes. p. 679-763 Boerma and specth (eds), Soybens: Improvment, production and uses, 3rd ed, agronomy monograph no. 16. ASA; CSSA, SSA, Madison USA.
11. Inglin, Raffael C. (2015): High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. Journal of Microbiological Methods. 114: 26–29.
12. Janeš, K. Rast Trametes versicolor u uvjetima submerznog uzgoja (2009): Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišni studij kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb.
13. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food" (PDF). London, Ontario, Canada. (10.05.2017)

14. Kanižai Šarić G. Utjecaj smjesa antioksidanasa i masnih kiselina na rast Fusarium sp. producenata trihotecena i fumonizina u krmnim smjesama. Doktorska disertacija, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2010.

15. Kišpatić, J. (1992). Gljive. U: Opća fitopatologija. ur: Ivanković, D. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 51-57.

16. Korić, B., (2003): *Fussarium* spp. na sjemenskim i merkantilnim usjevima pšenice u Hrvatskoj u 2002.godini. Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Zreče. 165-169.

17. Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J, Schnürer J. (2003.): Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters 219, 129-135

18. Makarova, K.; Slesarev, A.; Wolf, Y.; Sorokin, A.; Mirkin, B.; Koonin, E.; Pavlov, A.; Pavlova, N. (2006): Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103 (42): 15611–15616.

19. Matei GM, Matei A, Matei S. (2014.): Screening of lactic acid bacterial and fungal strains for their efficiency in biocontrol of mycotoxigenic contaminants of food. Research Journal of Agricultural Science, 46 (2), 182-190.

20. McFarland, LV (2009). Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. Anaerobe. 15 (6): 274–80.

21. Muñoz R, Arena E, Silva J, González SN. (2010.): Inhibition of mycotoxin-producing aspergillus nomius vsc 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. Brazilian Journal of Microbiology 41, 1019-1026.

22. Pavlova, S. I., Kilic, A. O., Kilic, S. S., So, J. S., Nader-Macias, M. E., Simoes, J. A., & Tao, L. (2002.): Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. Journal of applied microbiology, 92(3), 451-459.

23. Pidoux, M. (1989.): The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 5 (2): 223–238.

24. Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. (1996): Microbiology, Wm. C. Brown Publishers.

25. Schnürer J, Magnusson J. (2005.): Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends in Food Science and Technology 16, 70–78.

26. Thalaro K., Thalaro A. (1996.): Foundations in microbiology: Wm. C. Brown Publishers.

27. Vratarić, M. i Sudarić, A. (2008.): Soja-Glycine max (L.) Merr., Poljoprivredni institut, Osijek.

28. Janeš, K. Rast Trametes versicolor u uvjetima submerznog uzgoja. Rujan (2009.): https://www.google.hr/search?q=Nastanak+bazidiospora+kod+mesnatih+gljiva&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwixqJDxkubVAhWEXhQKHRs5CXEQ_AUICigB&biw=1366&bih=651#imgrc=FCZ1w2qS6GziGM: (17.08.2017)