

Antifugalna djelotvorst *Lactobacillus* spp. na zrnu pšenice

Petrović, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:139993>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



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](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Elena Petrović, apsolvant

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

**ANTIFUGALNA DJELOTVORNOST *LACTOBACILLUS* SPP. NA ZRNU
PŠENICE**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Elena Petrović, apsolvant

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

**ANTIFUGALNA DJELOTVORNOST *LACTOBACILLUS* SPP. NA ZRNU
PŠENICE**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Anita Liška, član

Osijek, 2019.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Pšenica i njezin značaj u prehrani ljudi	1
1.2. Značaj gljiva i bakterija	1
1.3. Cilj istraživanja	2
2. Pregled literature	3
2.1. Osobine bakterija mliječne kiseline	3
2.1.1. Osobine bakterija roda <i>Lactobacillus</i> spp.	3
2.1.2. <i>Lactobacillus casei</i>	5
2.1.3. <i>Lactobacillus brevis</i>	6
2.1.4. Antifungalna svojstva bakterija mliječne kiseline	7
2.2. Osobine gljiva	8
2.2.1. Gljive roda <i>Fusarium</i>	8
2.2.2. Bolesti biljaka izazvane <i>Fusarium</i> vrstama	9
2.2.3. <i>Fusarium</i> toksini	13
2.2.4. Gljive roda <i>Alternaria</i>	14
2.2.5. Bolesti biljaka izazvane <i>Alternaria</i> vrstama	15
2.2.6. <i>Alternaria</i> toksini	17
3. Materijal i metode.....	19
3.1. Priprema podloga za uzgoj mliječnih bakterija	19
3.2. Priprema podloga za uzgoj gljiva	21
3.3. Postavljanje <i>in vivo</i> pokusa.....	23
4. Rezultati.....	26
5. Rasprava	28
6. Zaključak	31
7. Popis literature.....	32
8. Sažetak.....	40
9. Summary.....	41
10. Popis tablica.....	42
11. Popis slika.....	43
12. Popis grafikona.....	44
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	45

BASIC DOCUMENTATION CARD 46

Prilog 1. Popis kratica

MRS	De Man, Rogosa, Sharpe
PDA	Eng. Potato Dextrose Agar
° C	Celzijev stupanj
pH	Lat. <i>potentia hydrogenii</i>
WHO	World Health Organization
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
µm	Mikrometar
ATA	Alimentarna toksična aleukija
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
DON	Deoksinivalenol
AOH	Alternariol
AME	Alternariol monometil eter
TEN	Tentotoksin
ALT	Altenuen
TeA	Tenuazonična kiselina
ATX	Altertokrini
IARC	Eng. International Agency for Research on Cancer

1. Uvod

1.1. Pšenica i njezin značaj u prehrani ljudi

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je kultura koja se nalazi u grupi pravih ili strnih žitarica, a pripada redu *Poales*, porodici *Poaceae* (trave), potporodici *Pooideae* (klasaste trave), rodu *Triticum*, koji je po formama najbogatiji rod kod svih žitarica (Kovačević i Rastija, 2014.). Prema pronađenim zapisima i nalazima utvrđeno je kako je pšenica poznata više od 10 000 godina (Gagro, 1997.).

Prema podacima FAO-a (2018.) pšenica, uz rižu i kukuruz, spada u skupinu tri najzastupljenije žitarice na svjetskim površinama te je najznačajniji ratarski usjev. Prosječna proizvodnja pšenice u svijetu kreće se oko 700 milijuna tona godišnje, a uzgaja se na više od 219 milijuna ha (FAO, 2016.). Godine 2019. proizvedeno je 770,8 milijuna tona pšenice (FAO, 2019.). Najveći proizvođači su Kina i Indija (FAO, 2018.). Prema podacima Državnog zavoda za statistiku Republike Hrvatske 2017. godine proizvodnja pšenice u Republici Hrvatskoj iznosila je 682 322 tone, a ekološke pšenice 17 417 tona.

Prerodom strnih žitarica dobivaju se proizvodi koji se koriste u prehrani. Pšenično zrno najviše se koristi za proizvodnju vrlo kvalitetnog kruha i peciva. Prerodom pšeničnog zrna proizvode se tjestenina, gris, kolači i dr. Od svih žitarica pšenica ima najviše kvalitetnih bjelančevina, povoljni sadržaj mineralnih tvari i vitamina (Gagro, 1997.).

1.2. Značaj gljiva i bakterija

Gljive (*Fungi*) su skupina organizama koji uključuju kvasce, plijesni i mesnate gljive (Duraković i Redžepović, 2002.). Gljive, zajedno s bakterijama, sudjeluju u razgradnji organskih tvari u prirodi, a brojne vrste korisnih gljiva i bakterija se koriste u prehrambenoj industriji.

Toksikogene vrste plijesni iz roda *Fusarium* česti su kontaminanti na žitaricama koje mogu biti visoko primamljive za rast plijesni tijekom rasta u polju, uskladištenja i prerade (Stoloff, 1976.). Gljive u pravilu bolje rastu u kiselom pH području. Veliki broj

gljiva može rasti u okolišu s visokom koncentracijom šećera ili soli, mogu rasti i na tvarima s vrlo malim sadržajem vode i mogu iskorištavati složene ugljikohidrate, primjerice lignin, što im omogućuje rast u različitim uvjetima sredine i na različitim supstratima (Duraković i Duraković, 2003.). Toksini koji nastaju kao sekundarni metaboliti plijesni nazivaju se mikotoksinima, a ljudi i životinje unose ih putem hrane, udisanjem ili preko kože (Peraica i sur., 1999.). Većina mikotoksina je kancerogena te uzrokuje razna druga oboljenja. Nadzor fungalnog rasta u ekološkoj poljoprivredi provodi se upotrebom eteričnih ulja, masnih kiselina, bioperarata i dr., a u konvencionalnoj poljoprivredi se koriste i kemijska sredstva. Različitim znanstvenim istraživanjima je utvrđeno kako mliječno-kisele bakterije izlučuju tvari koje imaju antimikrobno djelovanje. Antifungalna svojstva mliječno-kiselih bakterija su posebno interesantna u smislu njihovog fungistatičnog ili fungicidalnog djelovanja.

1.3. Cilj istraživanja

Zaraza pšenice s gljivama *Fusarium* i *Alternaria* predstavlja sve veći problem za proizvođače, ponajviše za one koji se bave ekološkom poljoprivredom gdje su, prema propisima, određena sredstva za zaštitu bilja (kemijska, sintetička sredstva) zabranjena. To dodatno otežava borbu protiv bolesti koje izazivaju ove gljive. Proizvođači se stoga nužno okreću biološkim metodama zaštite. Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi djelotvornost bakterija mliječne kiseline u inhibiciji rasta gljiva roda *Fusarium* i *Alternaria* na zrnu pšenice.

2. Pregled literature

2.1. Osobine bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne bakterije prirodno prisutne na supstratima bogatim hranjivim tvarima poput mlijeka, mesa, razgrađenog biljnog materijala te u ljudskom gastrointestinalnom sustavu (Dukić, 2009.). Obuhvaćaju 20 rodova: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Actinomyces* i *Atopobium* (Pandžić, 2017.). Prema fiziološkim osobinama dijele se na tipične (pri fermentaciji mliječnog šećera proizvode prvenstveno mliječnu kiselinu, fakultativno su anaerobne, ne reduciraju nitrate i sadrže katalazu) i netipične (proizvode malo mliječne kiseline, a više drugih proizvoda fermentacije, aerobne su, sadrže katalazu i reduciraju nitrate) (Pandžić, 2017.).

Blažić i Zavadlav (2012.) ističu kako su bakterije mliječne kiseline industrijski vrlo važni organizmi koje se upotrebljavaju kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda. Također ističu kako se ove bakterije u novije vrijeme primjenjuju kao probiotici i sinbiotici (probiotici u kombinaciji s prebioticima). Bakterije mliječne kiseline nalaze se i na grožđu, u moštu, vinu te pivu (Pandžić, 2017.).

2.1.1. Osobine bakterija roda *Lactobacillus* spp.

Bakterije roda *Lactobacillus* pripadaju skupini štapićastih bakterija, te porodici *Mycobacteriaceae* (Chester, 1901.). Vrste koje pripadaju ovom rodu su: *Lactobacillus debrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus viridiscens*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus xylosus* i *Lactobacillus brevis* (Marković, 1990.). *Lactobacillus* su asporogene, aerobne ili fakultativno anaerobne bakterije. Ovisno o samoj vrsti, mogu rasti u temperaturnom rasponu od 2° do 53° C, dok je optimalna temperatura rasta od 30° do 40° C, pri pH vrijednosti od 3 do 7 (Presečan, 2010.). Ove bakterije spadaju u otporne organizme (podnose visoke koncentracije soli, ugljikohidrata, alkohol i neke organske kiseline), acidofilne su i acidotolerantne

(Marković, 1990.). *Lactobacillus* ima izražene fermentacijske osobine. Potrebnu energiju dobivaju razlaganjem ugljikohidrata, uz stvaranje znatne količine mliječne kiseline i drugih produkata (Pandžić, 2017.).

Razmnožavaju se na specijalnim podlogama koje sadrže mesni ekstrakt, aminokiseline, nukleinske i masne kiseline, vitamine i minerale. Za rast pojedinih bakterija ovog roda dodaju se i ekstrakti biljaka i njihovih plodova. Na podlogama stvaraju sitne, prozirne ili blago zamućene kolonije pravilnih ili valovitih rubova s ispupčenjem u središnjem dijelu, a neke vrste stvaraju i pigment, navodi Marković (1990.).

Rasprostranjene su u širokom arealu područja. Brojne vrste sastavni su dio mikroflore probavnog sustava ljudi i životinja, te se nalaze i na sluznicama usne šupljine i dišnog sustava. Koriste se u proizvodnji sira, mliječno-kiselih napitaka, pojedine vrste sudjeluju i u proizvodnji jogurta, zrenju sira, acidofilnog mlijeka, kefira itd. Pored korisnih osobina neke vrste mogu dovesti do kvarenja mliječnih proizvoda u smislu stvaranja pigmenta, sluzi ili nekih drugih mana sira (Marković, 1990.).

Weinberg i sur. (2002.) u svojem su istraživanju ispitivali utjecaj primjene bakterija *Lactobacillus buchneri* i *L. plantarum* na povećanje stabilnosti pšeničnih i kukuruznih silaža. Tretmani su obuhvaćali kontrolu (bez dodataka bakterija), *L. plantarum*, *L. buchneri* te kombinaciju bakterija *L. plantarum* i *L. buchneri*. Nakon tri mjeseca čuvanja, pšenične silaže tretirane s *L. buchneri* sadržavale su veći udio octene kiseline u odnosu na kontrolu i silaže tretirane s *L. plantarum*. Na silaži tretiranoj s *L. buchneri* nije došlo do razvoja plijesni, dok su gornji slojevi kontrolne silaže i silaže tretirane s *L. plantarum* obrasli s plijesni. Svojim su istraživanjem ukazali na mogućnost primjene bakterija mliječne kiseline u svrhu konzerviranja pšeničnih i kukuruznih silaža. Filya (2003.) je u svojem istraživanju, provedenom u laboratorijskim uvjetima, utvrdio kako je i bakterija *L. buchneri* vrlo učinkovita u zaštiti silaža pšenice, kukuruza i sirka od plijesni.

Dal Bello i sur. (2007.) u svojem su istraživanju, u kojem su ispitivali utjecaj bakterije *L. plantarum* na poboljšanje kvalitete i produljenje roka trajanja pšeničnog kruha, došli do zaključka da se *L. plantarum* može upotrebljavati u te svrhe jer sprječava razvoj plijesni *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum* koje su prirodno prisutne u kruhu.

Lindgren i Dobrogosz (1990.) ustanovili su kako bakterije mliječne kiseline metaboliziraju niz antimikrobnih tvari poput organskih kiselina (mliječne, octene),

bakteriocine, hidrogen peroksid i drugo, što doprinosi njihovom konzervacijskom potencijalu te mogućnosti primjene u hrani i stočnoj hrani.

2.1.2. *Lactobacillus casei*

L. casei (Slika 1.) pripada grupi homofermentativnih bakterija koja razlaže kazein (mliječni protein) i sudjeluje u zrenju sira (Marković, 1990.). *L. casei* ima široki pH raspon te se može prilagoditi širokoj temperaturnoj razlici (WHO; FAO, 2002.). Optimalna temperatura razmnožavanja je oko 30° C, ali može se razmnožavati i pri 10° C (Presečan, 2010.). U mlijeku se sporo razmnožava, stvarajući male količine mliječne kiseline (Marković, 1990.). *L. casei* moguće je pronaći u ljudskom probavnom sustavu, ustima i crijevima. Neki predstavnici *L. casei* mogu biti i probiotici koji mogu pomoći pri liječenju bolesti uzrokovanih bakterijama (WHO; FAO, 2002.).



Slika 1. *Lactobacillus casei* (Izvor: <https://fineartamerica.com/featured/1-lactobacillus-casei-shirota-bacteria-sem-science-photo-library.html?product=greeting-card>)

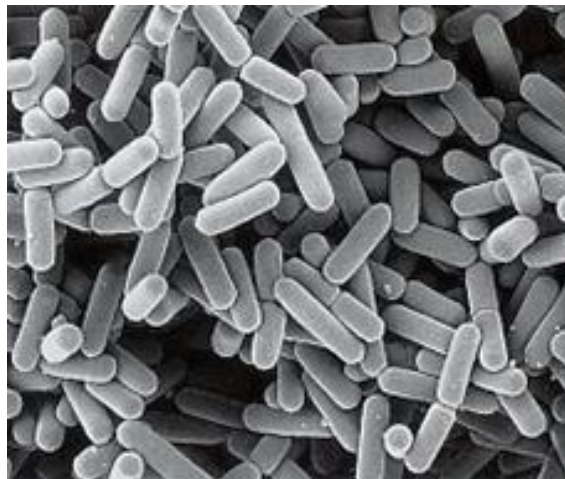
McFarland (2009.) ističe kako *L. casei*, u kombinaciji s ostalim probioticima, može djelovati i kao antibiotik. Tijekom rasta i fermentacije bakterije mliječne kiseline proizvode značajne količine organskih kiselina. Organske kiseline djeluju inhibicijski na rast i razmnožavanje mikroorganizama (Blateka i sur., 1991.; Brkić, 1995.). Proizvodnja

specifičnih inhibicijskih supstanci, kao što su bakteriocini, također je osobina bakterija *L. casei*, a zbog toga imaju dodatno antimikrobno djelovanje (Koninsky, 1982.). Iako bakteriocini imaju antibiotska svojstva, oni se ne klasificiraju kao antibiotici, od kojih su različiti po brojnim karakteristikama. Bakteriocini su mali peptidi koji se sintetiziraju na ribosomima tijekom lag faze rasta, dok su antibiotici sekundarni metaboliti (Chen i Hoover, 2003.). Bakteriocini nemaju boju, okus i miris, a antibiotici imaju (Zacharof i Lovitt, 2012.).

2.1.3. *Lactobacillus brevis*

L. brevis (Slika 2.) je gram pozitivna, štapićasta vrsta bakterija mliječne kiseline koja stvara CO₂ i mliječnu kiselinu tijekom fermentacije. *L. brevis* moguće je pronaći u različitim okruženjima poput fermentirane hrane i u ljudskom probavnom sustavu. Proizvodi bakteriocine laktobacilin i brevicin 37 (Havenaar i sur., 1992.).

Ogunbanwo i sur. (2003.) su u svom istraživanju, u kojem su koristili bakterije *L. plantarum* i *L. brevis*, zaključili da bakteriocini koje proizvode ove bakterije inhibiraju širok spektar bakterija te se mogu primjenjivati kao konzervansi hrane.



Slika 2. *Lactobacillus brevis* (Izvor: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/en/node/2134>)

2.1.4. Antifungalna svojstva bakterija mliječne kiseline

Magnusson i sur. (2003.) proveli su istraživanje na preko 1200 izolata bakterija mliječnih kiselina i njihova utjecaja kao antigljivičnog preparata gdje su utvrdili da je 10 % njih pokazalo 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. Zaključili su kako je ovo područje istraživanja još uvijek nedovoljno istraženo te da je potrebno provesti dodatna istraživanja u svrhu otkrivanja najboljih mogućih rješenja i strategija za korištenje ovih mikroorganizama u suzbijanju širenja gljiva. Do nedavno se većina istraživanja antifungalnog učinka bakterija mliječne kiseline bazirala na njihovim inhibitornim efektima, ali ne i na aktivnim sastojcima, proizvedenim njihovim metabolizmom, kao i drugim razlozima odgovornim za tu inhibitornu aktivnost. Samo je nekoliko istraživanja dokazalo da bakterije mliječne kiseline, osim organskih kiselina, proizvode i antifungalne peptide, odnosno proteine.

Lavermicocca i sur. (2000.) identificirali su antifungalne spojeve fenil-mliječnu kiselinu i 4-hidroksi mliječnu kiselinu iz vrste *Lactobacillus* izolirane iz kiselog tijesta. Corsetti i sur. (1998.) su također iz kiselog tijesta izolirali bakteriju mliječne kiseline, *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1, koja ima inhibitorni učinak na rast plijesni. Dokazali su da je za inhibiciju odgovorno djelovanje različitih organskih kiselina pronađenih u supernatantu dobivenog od navedene bakterije mliječne kiseline.

Ström i sur. (2002.) identificirali su tri antifungalna spoja u supernatantu dobivenog od roda *Lactobacillus*. Njihova istraživanja su pokazala da su na izolirane spojeve najosjetljivije plijesni bile *Fusarium sporotrichioides* i *Aspergillus fumigatus*. Korištenje bioloških konzervansa omogućava produljenje roka trajanja proizvoda te poboljšava sigurnost proizvoda. Kao idealni antifungalni mikroorganizmi ističu se i bakterije mliječnih kiselina koje se i inače koriste u konzerviranju i proizvodnji hrane. Bakterije mliječne kiseline su mikroorganizmi koji su uglavnom prepoznati kao sigurni poboljšivači kvalitete hrane, a istovremeno posjeduju nutritivne i terapijske vrijednosti. 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 antifungalno djelovanje (Munoz i sur., 2010.).

2.2. Osobine gljiva

Gljive su posebna skupina organizama koja obuhvaća više od 250 000 vrsta (Duraković i Redžepović, 2002.). Gljive su eukariotski, nefotosintetski organizmi koji pripadaju carstvu *Fungi* (Duraković i Redžepović, 2002.). Gljive u prirodnim i poljoprivrednim ekosustavima imaju značajnu ulogu jer, zajedno s bakterijama sudjeluju u razgradnji organske tvari u prirodi. Brojne gljive koriste se u prehrambenoj industriji, primjerice za proizvodnju sira s plijesni, za proizvodnju piva, vina, fermentiranih mliječnih proizvoda, antibiotika itd. Pojedine gljive su patogene za ljude i biljke. Metabolizam gljiva ograničen je na heterotrofan, aeroban i fakultativno anaeroban. Veliki broj gljiva može rasti u okolišu s visokom koncentracijom šećera ili soli, mogu rasti i na tvarima s vrlo malim sadržajem vode i mogu iskoristavati složene ugljikohidrate, primjerice lignin, što im omogućuje rast u različitim uvjetima sredine i na različitim supstratima, čak i obojenim zidovima ili obući izrađenoj od prave ili umjetne kože (Duraković i Duraković, 2003.).

2.2.1. Gljive roda *Fusarium*

Rod *Fusarium* pripada u pododjel *Deuteromycotina*, razred *Hyphomycetes*, red *Hyphales*. Rod *Fusarium* sadrži veliki broj vrsta od kojih su neke vrste saprofitne, a neke vrste su fakultativni paraziti te napadaju velik broj korovnih i kultiviranih biljnih vrsta (Kommedahl i sur., 1979., Hill i sur. 1983., Leslie i sur., 1990., Diaz de Ackermann i sur., 1996., Chakaeva, 2000., Kryuchkova i sur. 2002.).

Jedan od razloga zašto je rod *Fusarium* rasprostranjen u svim područjima svijeta je velika sposobnost prilagođavanja različitim agroklimatskim uvjetima i okolišu (Ćosić i sur., 2004.).

2.2.2. Bolesti biljaka izazvane *Fusarium* vrstama

Rod *Fusarium* pripada u globalne fitopatogene koji mogu umanjiti prinose i kvalitetu usjeva, financijski ugroziti poljoprivredne proizvođače i izazvati poskupljenje sirovina i glavnih prehrambenih proizvoda (kruh, brašno) (Kanižai Šarić i sur., 2011.). Rod *Fusarium* obuhvaća različite vrste koje se pojavljuju na žitaricama i čiji se simptomi mogu pojaviti na korijenu, stabljici i klasu. Najviše zastupljene vrste koje se pojavljuju na žitaricama su *F. graminearum* (Slika 3.), *F. culmorum* i *Fusarium avenaceum*, dok u manje zastupljene ubrajamo *Fusarium poae*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium tricinctum* i dr. *F. graminearum* je češći u vlažnijim i toplijim područjima, a *F. culmorum* i *F. avenaceum* su češći u hladnijim područjima (Španić, 2010.).



Slika 3. *Fusarium graminearum* (Izvor: Autor)

Kod najznačajnijih ratarskih vrsta razlikujemo nekoliko tipova bolesti uzrokovanih napadom gljiva iz roda *Fusarium* ovisno o dijelu biljke koji je napadnut te vremenu infekcije. Kod pšenice i ostalih strnih žitarica to su palež klijanaca, trulež korijena i donjeg dijela vlata, ali najveće štete nastaju pri razvoju bolesti na klasu (IARC, 1993.).

Prema Tomasović i sur. (1994.) fuzarijske bolesti pšenice dijele se u tri glavne skupine, a to su: fuzarijska trulež korijena i stabljike, fuzarijoze klasa te snježna plijesan.

Fuzarijska palež klasova (Slika 4.) je gljivična bolest strnih žita, a njezino značenje osobito je poraslo posljednjih desetljeća. Dominantan uzročnik bolesti u Hrvatskoj je *F. graminearum* (Ćosić i sur., 2013.). *F. graminearum* je kao biljni patogen vrlo raširena plijesan u tlu, a pripada najraširenijoj toksikogenoj vrsti toga roda (IARC, 1993.).

Berić (2009.) navodi kako ova gljiva može zaraziti čitav klas ili njegov dio. Zaraženi dijelovi tada gube zelenu boju, postaju slamnato žuti i na njima se javlja narančasta ili ružičasta prevlaka, a kod jakog napada u usjevu pšenice, neposredno nakon cvatnje u mliječnoj zriobi, mogu se uočiti bolesni, bijeli klasovi. Štete se manifestiraju smanjenjem prinosa jer napadnuti klasovi imaju manji broj zrna ili su napadnuta zrna štura i manje klijavosti. Također, navodi kako se drugi vid štete manifestira kao pojava mikotoksina, a optimano vrijeme za zarazu ovom bolešću je cvatnja, uz veću količinu oborina, visoku relativnu vlagu zraka i temperature oko 25° C.

Patogenost ove gljive utvrdili su i Ilić i sur. (2012.) u svojem istraživanju u kojem su, u laboratorijskim uvjetima, ispitivali patogenost 30 izolata koji su predstavljali 14 *Fusarium* vrsta izoliranih s korova i biljnih ostataka u istočnoj Hrvatskoj. Ispitivanja patogenosti proveli su na sadnicama pšenice i kukuruza, a kao najpatogenija vrsta roda *Fusarium* spp. pokazala se upravo *F. graminearum* (izolirana s biljnih vrsta: *Amaranthus retroflexus*, *Abutilon theophrasti* i *Chenopodium album*).

Bijelić (2010.) navodi kako se klasovi pšenice mogu zaraziti s *F. graminearum* od cvatnje do kraja vegetacije te kako smanjenje količine i kvalitete prinosa ovisi o vremenu infekcije, osjetljivosti genotipa pšenice, vrsti i patogenosti gljive koja je napala klas. U svojem je istraživanju Bijelić (2010.) utvrdila kako je postotak zaraženih zrna najveći, a njihova klijavost najmanja kod pšenice koja se zarazila ovom plijesni u ranijim fazama razvoja.



Slika 4. Fuzarijska palež klasa pšenice

(Izvor: <http://www.hemoslavija.co.rs/strucni-saveti/ratarstvo/p%C5%A1enica/451-palez-klasa.html>)

Palež klijanaca (Slika 5.) je posljedica sjetve zaraženog sjemena ili zdravog sjemena u zaraženo tlo. Dolazi do propadanja klijanaca prije nicanja ili neposredno nakon nicanja (Ćosić, 2019.). Ponekad biljke mogu izniknuti i razviti nekoliko listova koji su svjetlo zelene boje i skraćene dužine što je posljedica zaraze korijena i širenja micelija kroz klicino stablo do osnove lišća navode Jurković i sur. (2016.). *Fusarium* vrste kao bolesti klijanaca mogu se raspoznati po plijesni sličnoj miceliju na bazi izbojka. Prijenos bolesti uslijedi preko spora koje se nalaze na sjemenu ili preko zaraženih ostataka biljaka u tlu. Napad na klijancima dovodi do znatnih šteta u nicanju i do izmrzavanja, a napad na klasovima do šturosti zrna, propadanja pojedinih klasića ili čitavih klasova (Tomasović i sur., 1994.).



Slika 5. Palež klijanaca pšenice (Izvor: Jasenka Ćosić)

Ćosić (2019.) navodi kako je trulež korijena i vlati samostalan patološki proces ili progresivna bolest nakon paleži klijanaca te ukoliko do zaraze dođe do busanja biljke mogu propasti, a ako do zaraze dođe kasnije u vegetaciji propadanje biljaka je rijetko. Ista autorica navodi kako, ovisno o intenzitetu bolesti, dolazi do formiranja klasova s manjim brojem slabije nalivenih zrna.

Fuzarioza vlati jednako je proširena i štetna kao i polijeganje pšenice. Kao domaćini poznate su mnoge vrste trava. Napad se očituje na rukavcima na donjem dijelu vlati. Pojave se smeđe, a potom crne nekrotične pjegice. Kod jakog napada inficirana su i donja koljenca i njihova neposredna okolina. Oštećenja vlati i jaka infekcija dovode do ugibanja biljke. Do prenošenja dolazi putem zaraženog sjemena i tla. Napad pospješuje visoka relativna vlažnost zraka pri bazi vlati te uzak plodored (Tomasović i sur., 1994.).

Tomasović i sur. (1994.) navode da se snježna plijesan javlja u rano proljeće nakon otapanja snijega. Snježna plijesan obično zahvaća pšenicu po manjim ili većim oazama, ponajviše na mjestima gdje se tijekom zime formirao dublji snježni pokrivač koji se u proljeće održao tijekom dužeg vremenskog razdoblja. Biljke koje su jače zaražene ugibaju te dolazi do prorijeđivanja usjeva. Povoljni uvjeti za razvoj snježne plijesni su: temperatura od 5° do 10° C, visoka relativna vlažnost tla i zraka. Isti autori navode kako je jedna od najčešćih gljiva koje uzrokuju propadanje usjeva zimi i u proljeće *Fusarium nivale*. Gljiva napada pšenicu, a nerijetko i ječam i raž. Zaražene i odumrle biljke na sebi imaju presvlaku blijedo-ružičaste boje, koja nestaje tijekom sunčanog i vjetrovitog vremena. Bolest se najbolje može uočiti u proljeće kada se snijeg otopi.

Biljke inficirane snježnom plijesni mogu se pronaći i kasnije tijekom vegetacije, nešto su zaostale u rastu, ponekad su trule u području korijena ili zbog jakog napada na klas nose štura zrna (Tomasović i sur., 1994.). Pošto se spore gljiva zadržavaju na površini sjemena, do infekcije ovom gljivom može doći sjetvom zaraženog sjemena. Gljiva prezimljava na ostacima slame i ostalim zaraženim dijelovima biljaka, pa i na taj način može inficirati klijanca. Tijekom klijanja sjemena gljiva, zajedno s klijančima, raste i dolazi do razaranja koleoptile. U proljeće i ljeto spore koje se formiraju na odumrlim ili bolesnim biljkama vjetrom, kapima kiše ili uz pomoć kukaca mogu dospjeti i na klasove; kod ranog napada zrna postaju štura, a kasniji napadi ove gljive ne utječu na prinose sjemena (Tomasović i sur., 1994.).

Preventivne mjere i suzbijanje napada ovom gljivom u ekološkoj poljoprivredi uključuju primjenu plodoreda, tretiranje sjemena s dozvoljenim sredstvima (ovim načinom ne mogu se spriječiti infekcije koje potječu iz tla), održavanje higijene tla, sjetvu zdravog i certificiranog sjemena, sjetvu otpornijih sorti pšenice i dr.

2.2.3. *Fusarium* toksini

Pleadin i sur. (2015.) navode kako su najznačajniji fuzarijski mikotoksini u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica: zearalenon, deoksinivalenol, fumonizini te T-2 toksin. Toksični učinci mikotoksina imaju kao posljedicu narušavanje zdravlja ljudi i životinja, povećane troškove zdravstvene skrbi, smanjenje prinosa kod stoke, zbrinjavanje onečišćene hrane i hrane za životinje te ulaganje u brojna znanstvena istraživanja u cilju smanjenja ozbiljnosti problema vezanih uz onečišćenje ovim tvarima (Hussein i Brasel, 2001.).

Mikotoksin zearalenon (F-2 toksin) izoliran je 1962. godine iz kulture plijesni *Giberella zeae*, koja je spolni stadij plijesni *F. graminearum* (Bennet i Klich, 2003.). Ovaj mikotoksin sintetiziraju različite vrste iz roda *Fusarium* i to: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *Fusarium equiseti* i *Fusarium moniliforme* (Chelkowski, 1998.). Najčešće je detektiran na kukuruzu, ječmu, pšenici, zobi, ali i proizvodima životinjskog podrijetla (Richard 2007.). Stabilan je tijekom skladištenja, mljevenja i prerade, a ne razgrađuje se niti pri visokim temperaturama (Zollner i sur., 2002., Alexander i sur., 2004.).

Glavni proizvođači mikotoksina deoksinivalenola su plijesni *F. graminearum* i *F. culmorum*, a javlja se češće kod žitarica kao što su kukuruz, pšenica i ječam, nego li kod zobi, raži i riže (Doohan i sur., 2003.). Stabilan je tijekom skladištenja, mljevenja, prerade i toplinske obrade hrane. U usporedbi s drugim mikotoksinima smatra se jednim od manje toksičnih (Whitlow i sur., 2006.).

Fumonizini su sekundarni metaboliti koje sintetiziraju plijesni roda *Fusarium*. Jedinstvenih su fizikalnih svojstava među mikotoksinima. Stabilni su na povišenim temperaturama tijekom procesiranja hrane i nisu fotosenzibilni (WHO, 2001.). Kao najčešći izvor fumonizina navode se kukuruz i proizvodi na bazi kukuruza, zatim riža,

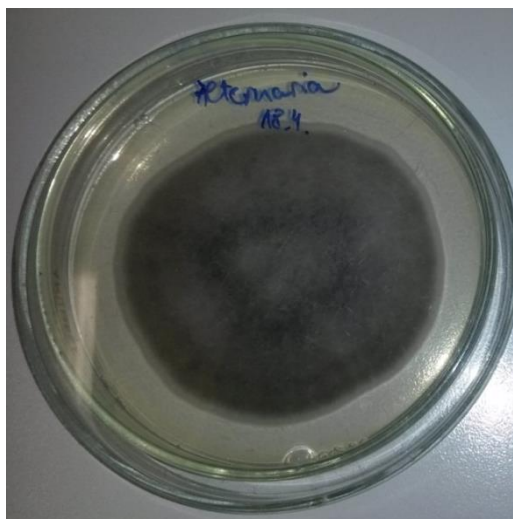
pšenica i ječam, a često ga se može naći i u kombinaciji s drugim mikotoksinima (WHO, 2001.).

T-2 toksin je najtoksičniji predstavnik trihotecenskih mikotoksina tipa A. Sekundarni je produkt metabolizma plijesni roda *Fusarium*, često prisutan u žitaricama i hrani za životinje. Prvi put je izoliran iz plijesni *Fusarium tricinctum*. Nehlapljiv je i termostabilan te ga je teško suzbiti u proizvodnji hrane. Topljiv je u etanolu, etilacetatu, dimetilsulfoksidu, kloroformu i drugim organskim otapalima, a nije topljiv u vodi (Creppy, 2002.).

2.2.4. Gljive roda *Alternaria*

Procjenjuje se da postoji nekoliko stotina vrsta ovog roda (Ivanović i sur., 2004.). Vrste roda *Alternaria* široko su rasprostranjene i obuhvaćaju veliki broj saprofitnih i fitopatogenih vrsta. Prisutne su i u vlažnim i semi-aridnim područjima, gdje mogu inficirati brojne biljne kulture, napadajući listove, stabljike, cvjetove i plodove (Desphande, 2002.).

Gljive ovog roda mogu se naći širom svijeta na različitim materijalima (celuloza, tlo, izumrla biljna tkiva) (Rotem, 1994.). *Alternaria* (Slika 6.) gljive identificirane su na žitaricama, uljaricama, povrću i voću te ukrasnom bilju (Thomma, 2003.). One su dio prirodne mikropopulacije tla, endofiti biljaka i saprofiti, a veliki broj vrsta su i patogeni biljaka. Fitopatogene vrste roda *Alternaria* su izuzetno značajne jer dovode do velikih oštećenja biljaka i značajnog smanjenja prinosa. Na sjemenu pšenice *A. alternata* redovno je prisutna i češće se izolira u odnosu na sve ostale vrste ovog roda i ostale kontaminante pšenice kao što su vrste roda *Fusarium* i *Aspergillus* (Broggi i sur., 2007.). *Alternaria* mogu prouzrokovati kvarenje poljoprivrednih proizvoda tijekom skladištenja, transporta i u procesu prerade (Ostry, 2008.).



Slika 6. *Alternaria alternata* (Izvor: Autor)

2.2.5. Bolesti biljaka izazvane *Alternaria* vrstama

Ove vrste uzrokuju pojavu crne pjegavosti na svim nadzemnim dijelovima strnih žitarica. Najznačajnije od tih vrsta su *A. alternata* i *Alternaria helianthi*. Tamna boja inficiranih dijelova biljnog tkiva (Slika 7.) potječe od crnog pigmenta melanina, koji pruža zaštitu gljivama od nepovoljnih uvjeta vanjske sredine, temperaturnih stresova, UV zračenja (Linac i sur., 1998.).

Zaraženi dijelovi biljaka nekrotiziraju, što dovodi do raspadanja biljnog tkiva i inhibiranja fotosinteze (Laemmlen, 2001.). Uslijed infekcije, na zaraženom tkivu formiraju se crni koncentrični krugovi u kojima se nalaze toksični metaboliti, dok se na oštećenom tkivu formira crna presvlaka (Slika 8.) kao rezultat sporulacije patogena (Thomma, 2003.).



Slika 7. Napad *Alternaria* spp. na klasu (Izvor: <https://www.alamy.com/stock-photo-sooty-mould-cladosporium-sp-or-alternaria-sp-on-wheat-ears-27268053.html>)

Laemmlen (2001.) navodi kako ovi patogeni mikroorganizmi uništavaju izgled i kvalitetu zrna, kao i zdravstvenu sigurnost. Simptomi na zrnu vidljivi su u periodu nakon žetve u vidu crne obojanosti zrna koncentrirane oko klice. U kasnijoj fazi zaraze crna pjegavost se širi na cijelu površinu zrna. Štete koje prouzrokuju ovi patogeni na pšenici i drugim zrnima ne odnose se u tolikoj mjeri na prinos koliko na gubitke koji nastaju poslije žetve. Kod veće zaraze pšenice dolazi do tamnije obojenog brašna, narušenog izgleda tjestenine (iz razloga što se broj crnih točkica u krupici povećava što dovodi do promjene boje tjestenine) i dolazi do narušavanja njezine tehnološke kvalitete zbog razaranja glutena. Također, navodi kako može doći i do prijevremenog sazrijevanja biljaka s obzirom na to da je crna boja klasa često povezana i s bolestima korijena i vlati te kako ove gljive prezimljavaju na zaraženim ostacima usjeva, sjemena i korova u vidu micelija, konidija ili spora.



Slika 8. Simptomi zaraze s *Alternaria* spp. (Izvor: <https://www.alamy.com/stock-photo-sooty-mould-cladosporium-sp-or-alternaria-sp-on-wheat-ears-27268053.html>)

Mogu se širiti insektima, vjetrom, kišom, tijekom vegetacije se u tlu širi micelijem. Infekcija sjemena se odvija putem konidija u fazi cvjetanja i formiranja zrna (Thomma, 2003.). Optimalna temperatura za razvoj micelija je od 18° do 25° C, dok su temperaturni minimum i maksimum 4° odnosno 35° C (Sommer, 1985.). Relativna vlažnost zraka i aktivnost vode također su značajni faktori u razvoju infekcije (Sommer, 1985.).

Alternaria vrste mogu rasti čak i na niskim temperaturama (-3° C) (Sommer, 1985.). Također, žetva tijekom kišnog perioda ili skladištenje u uvjetima visoke vlažnosti pogoduju razvoju bolesti (Bottalico i Logrieco, 1998.).

2.2.6. *Alternaria* toksini

Alternaria toksine biosintetiziraju različite vrste roda *Alternaria*, koji često uzrokuju bolesti biljaka. *Alternaria* vrste proizvode više od 70 sekundarnih metabolita od kojih su samo neki svrstani u mikotoksine zbog štetnog djelovanja na ljude i životinje, kao što su alternariol (AOH), alternariol monometil eter (AME), tentotoksin (TEN), altenuen (ALT) i dr. (Escriva i sur., 2017.).

Vrsta *Alternaria alternata* proizvodi mikotoksine: AOH, AME, TEN, tenuazoničnu kiselinu (TeA), altertokrine (ATX- I i II), altenuen (ALT) i stemfiltoksin III (Scott i sur.,

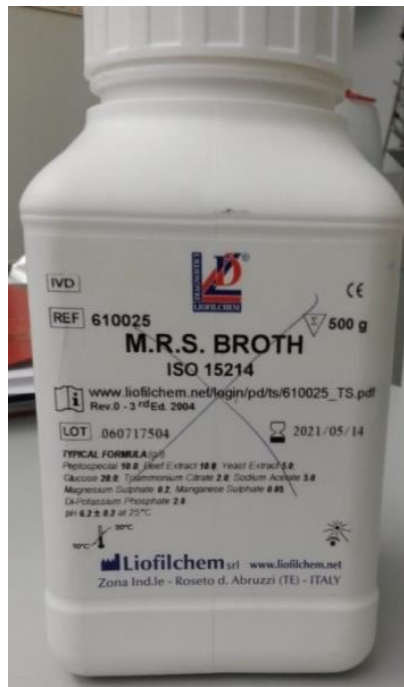
2006.; Ostry, 2008.). Optimalna temperatura za stvaranje mikotoksina je 21° C. AOH i AME mogu dovesti do mutagenih promjena u stanici, također postoje dokazi o njihovoj kancerogenosti (Scott i sur., 2006.). AOH i AME toksini stabilni su u voćnim sokovima i vinu tijekom 20 dana, kao i na 80° C tijekom 20 minuta (Scott i sur., 2006.). Zbog svoje visoke otpornosti mogu predstavljati opasnost za zdravlje ljudi i životinja, ponajviše u proizvodima koji ne zahtjevaju termičku obradu prije jela, kao što su to primjerice žitarice. Trenutno ne postoje propisi za *Alternaria* toksine u hrani i hrani za životinje u Europi (Janić, 2015.).

Komisija CONTAM Panel, za kontaminante u lancu ishrane, izvršila je procjenu izloženosti ljudi od 18 do 65 godina starosti na utjecaj *Alternaria* mikotoksina unošenjem preko hrane. Procijenjena dnevna izloženost stanovništva bila je u opsegu od 1,9 do 39 ng/kg za AOH i 0,8 do 4,7 ng/kg za AME (Kocić Tanackov i Dimić, 2013.).

3. Materijal i metode

3.1. Priprema podloga za uzgoj mliječnih bakterija

U pokusu su korištene mliječno-kisele bakterije *L. casei* i *L. brevis* iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Bakterije su umnožene na MRS (de Man, Rogosa, Sharpe, Merck, Njemačka) tekućoj podlozi (Slika 9., 10., 11.) pri 37 ° C kroz 48 h.



Slika 9. MRS podloga (Izvor: Autor)



Slika 10. Očitavanje pH vrijednosti podloge (Izvor: Autor)



Slika 11. Razlijevanje MRS podloge u epruvete (Izvor: Gabriella Kanižai Šarić)

3.2. Priprema podloga za uzgoj gljiva

Antifungalna djelotvornost je testirana na čistim kulturama: *F. graminearum* Schwabe 110250 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Nizozemska) i *A. alternata* iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Čiste kulture gljiva umnožene su na krumpir-dekstroznom agaru (Biolife, Italija) (Slika 12., 13., 14., 15.) pri temperaturi od $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ tijekom sedam dana.



Slika 12. Krumpir-dekstrozni agar (Izvor: Autor)



Slika 13. Razlijevanje podloga u petrijeve zdjelice (Izvor: Autor)



Slika 14. Nacjepljivanje gljiva (Izvor: Gabriella Kanižai Šarić)



Slika 15. Nacjepljivanje bakterija (Izvor: Autor)

3.3. Postavljanje *in vivo* pokusa

Sve korištene podloge i pribor su sterilizirani vodenom parom pod tlakom u autoklavu (INKO) (Slika 16.) dok je cjelokupni postupak odrađen u aseptičnim uvjetima. Sjeme pšenice sorte Xenos korišteno u pokusu proizvedeno je na ekološkom poljoprivrednom gospodarstvu „OPG Nedjeljko Bošnjak“ i služilo je kao prirodan supstrat za ispitivanje antifungalne djelotvornosti ispitivanih sojeva mliječno-kiselih bakterija.

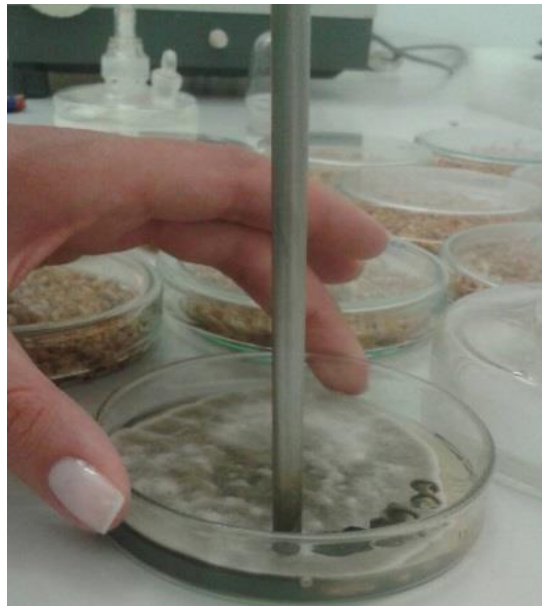


Slika 16. Autoklav (Izvor: Autor)

Zrno pšenice je izvagano u količini od 10 g (Slika 17.) i sterilizirano. Potom je zrno pšenice nakvašeno s ispitivanim sojevima mliječno-kiselih bakterija u trajanju od 8 h na sobnoj temperaturi. Broj bakterija u inokulumu određen je po McFarland standardu i sadržavao je $15 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ stanica. Kontrolne probe su tretirane sa sterilnom vodom. Nakon toga izvršena je inokulacija s micelijskim diskom ispitivanih čistih kultura plijesni (Slika 18.) uzetog s rubova kolonije promjera 4 mm u sredinu petrijeve zdjelice (Slika 19.).



Slika 17. Vaganje sjemena (Izvor: Gabriella Kanižai Šarić)



Slika 18. Bušenje diskova na miceliju (Izvor: Gabriella Kanižai Šarić)



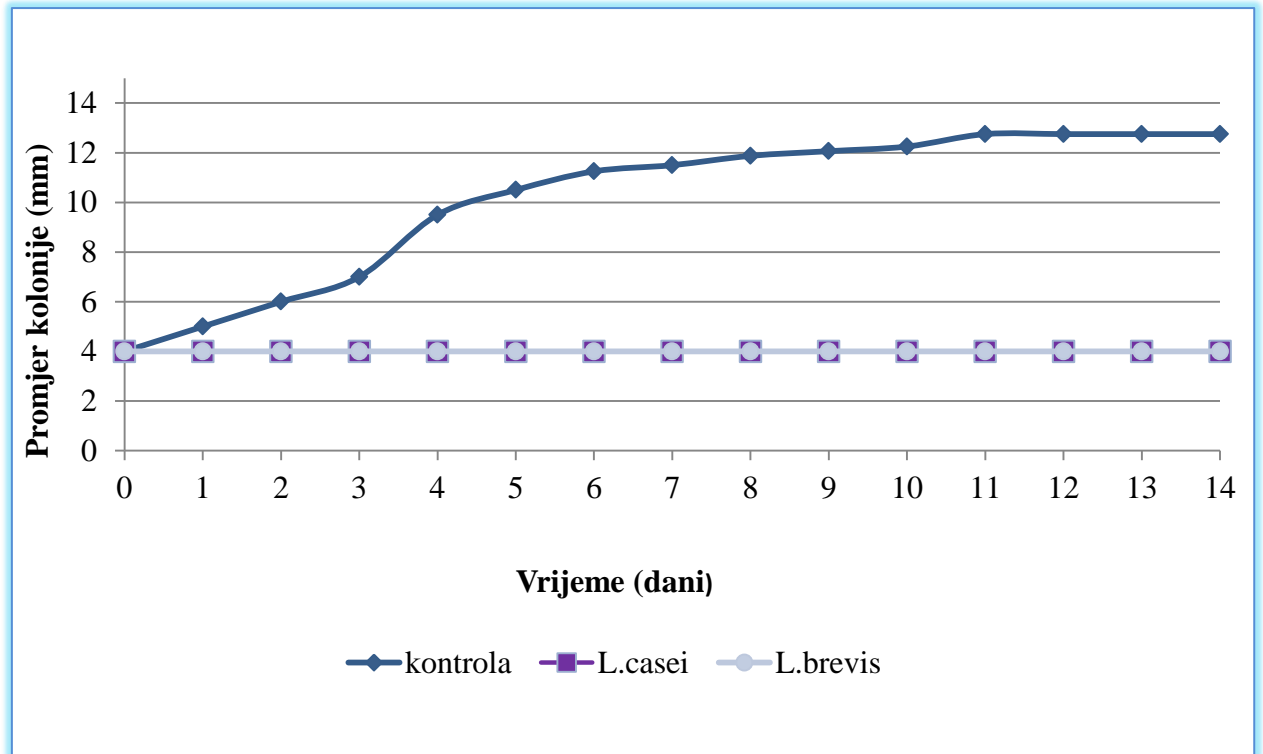
Slika 19. Inokulacija micelijskim diskom (Izvor: Gabriella Kanižai Šarić)

Petrijeve zdjelice inkubirane su u četiri ponavljanja na $30^{\circ}\text{C}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ u laboratorijskom termostatu (Termo Medicinski aparati, BTS-M). Svakodnevno je praćen porast plijesni izmjeravanjem dva promjera kolonije pod pravim kutom u periodu od 14 dana. Fungalni porast je korišten za računanje stope rasta.

Rezultati su statistički analizirani na način da su razlike između stope rasta testiranih izolata mliječno-kiselih bakterija i kontrole testirane Studentovim t-testom. Za statističku analizu podataka korišteni su Microsoft Excel (2013.) i Statistica 13.3 (Dell Inc. 2017.).

4. Rezultati

Grafikon 1. Rast plijesni *Alternaria alternata* uz *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus brevis*

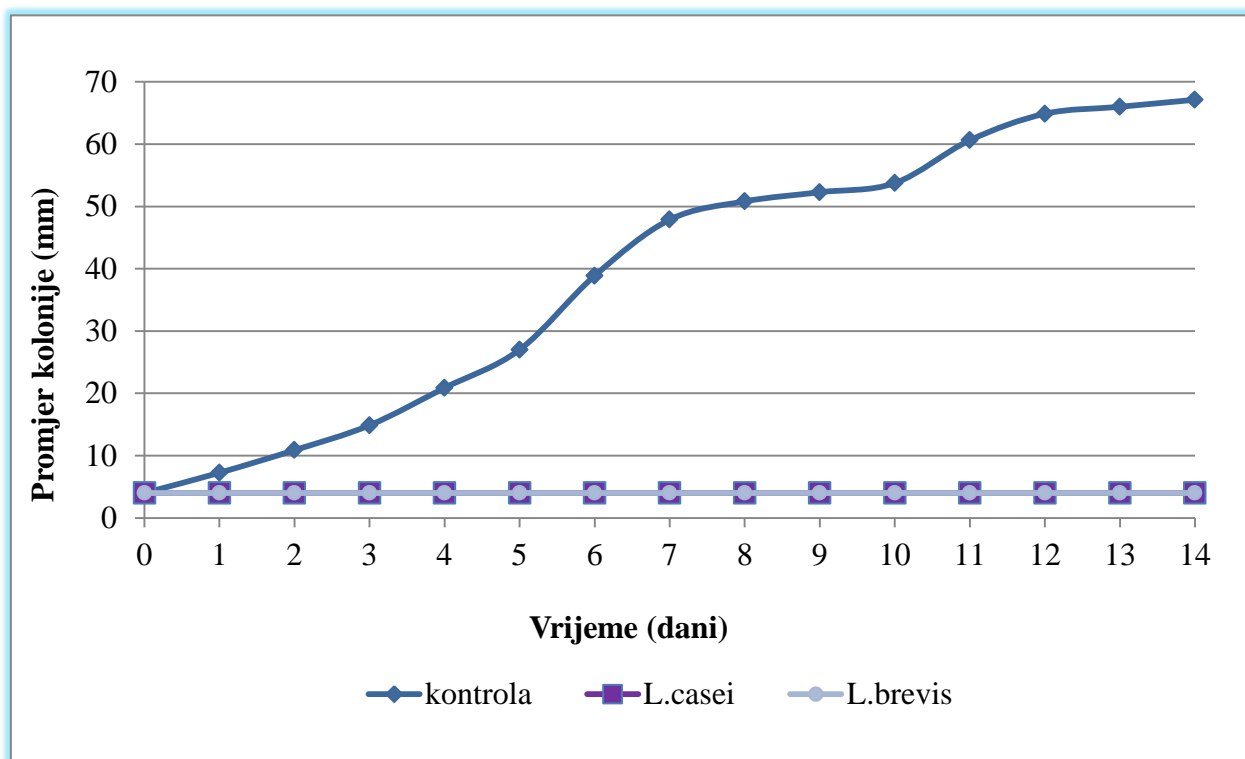


Tablica 1: Utjecaj antifungalnih kombinacija na rast plijesni *Alternaria alternata*

Kombinacije antifungalnih tvari	Stopa rasta (mm/dan)	p
Kontrola	0,75	
<i>Lactobacillus casei</i>	0	0,000005**
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	0,000005**

** stopa rasta značajno niža od kontrole, $p < 0,01$

Grafikon 2. Rast plijesni *Fusarium graminearum* uz *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus casei*



Tablica 2: Utjecaj antifungalnih kombinacija na rast plijesni *Fusarium graminearum*

Kombinacije antifungalnih tvari	Stopa rasta (mm/dan)	p
Kontrola	2,9	
<i>Lactobacillus casei</i>	0	0,000162**
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	0,000162**

** stopa rasta značajno niža od kontrole, $p < 0,01$

5. Rasprava

U ovom istraživanju utvrđena je statistički značajna antifungalna djelotvornost *L. casei* ($p < 0,01$) i *L. brevis* ($p < 0,01$) (Tablica 1.) pri čemu je utvrđena redukcija stope rasta gljive *Alternaria alternata* za 100 % u odnosu na kontrolu (Grafikon 1.). *L. casei* i *L. brevis* jednako uspješno reduciraju rast i *Fusarium graminearum*, za 100 % (Grafikon 2.), što je statistički značajno ($p < 0,01$) u usporedbi s kontrolom (Tablica 2.).

Brojna istraživanja potvrdila su antifungalnu djelotvornost bakterija mliječne kiseline. Kanižai Šarić i sur. (2017.) u svom su istraživanju, u kojem su ispitivali antifungalni učinak bakterija mliječne kiseline na rast plijesni roda *Fusarium*, utvrdili značajnu inhibiciju micelijskog rasta plijesni *F. graminearum* i *F. verticillioides* uz djelovanje bakterija *L. brevis*, te inhibiciju rasta *F. graminearum* uz djelovanje *L. casei* u *in vitro* uvjetima.

Laref i Guessas (2013.) ispitali su antifungalnu djelotvornost na predstavnicima rodova *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. i *Stemphylium* spp. te su rezultati istraživanja pokazali kako ispitivane bakterije mliječne kiseline pokazuju antifungalni učinak pri čemu nije zabilježen micelijski rast gljiva u tekućoj hranjivoj podlozi tijekom i nakon sedam dana uzgoja.

Horackova i sur. (2018.) su u svojem pokusu testirali djelotvornost osam sojeva laktobacila izoliranih iz biljaka i namirnica (tartar umaka, pšeničnog brašna, ječmenog brašna i kiselog tijesta) na redukciju rasta *F. culmorum* i *Penicillium expansum*. Rezultati su pokazali da žive stanice tri soja bakterije *L. plantarum* pokazuju najveću antifungalnu aktivnost.

Eddine i sur. (2018.) proveli su istraživanje s ciljem otkrivanja novih autohtonih sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz mlijeka alžirskih deva, koji imaju antifungalno djelovanje. Izolirane bakterije (LAB 264) pokazale su antifungalnu aktivnost protiv *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* i *Penicillium* spp. Izolati su identificirani kao *L. plantarum*, *Lactococcus paracasei*, *L. brevis*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus pentosus*. Ovi sojevi djelovali su inhibitorno na rast micelija i klijavost spora. Time su dokazali da se ovi sojevi bakterija izolirani iz mlijeka deva mogu primjenjivati za kontrolu kvarenja namirnica i rasta gljivica. Bazukyan i sur. (2018.) također su ispitivali antifungalnu djelotvornost mliječno-kiselih bakterija izoliranih iz mliječnih proizvoda (kiselo vrhnje,

razni sirevi i dr.) te su utvrdili da *L. rhamnosus* MDC 9661 ima inhibicijski učinak na rast *Penicillium aurantioviolaceum* i *Mucor plumbeus*.

Matei i sur. (2015.) ukazuju da najnovija istraživanja potvrđuju učinak bakterija mliječne kiseline koje stvaraju antagonističke spojeve (mliječne, octene, fenil-mliječne, cikličke, dipeptide, reuterin, biosurfaktante) koji mogu kontrolirati patogene gljive. Također, svojim su istraživanjem, u kojem su ispitivali antifungalnu djelotvornost bakterija mliječne kiseline, utvrdili da su inficirane jabuke, koje su tretirane sojevima bakterija mliječne kiseline i izložene suspenziji spora *Penicillium expansum*, stvorile manja mjesta infekcije u usporedbi s netretiranom kontrolom.

Al-Jobory (2018.) ističe kako infekcija s gljivom *Fusarium* spp., koja proizvodi fumonizin, štetno utječe na trgovinu i gospodarstvo te ukazuje na njen štetni učinak na zdravlje ljudi i životinja. U svojem istraživanju ispitao je antifungalnu djelotvornost 25 bakterija mliječne kiseline izoliranih iz uzoraka meda. Istraživanjem je utvrdio da od 25 ispitanih izolata samo njih 5 (*L. casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *Lactobacillus fermentum* i *L. rhamnosus*) pokazuju inhibitorno djelovanje nakon 48 h inkubacije na 30° C, od čega je *L. acidophilus* imao dobru sposobnost smanjenja rasta svih *Fusarium* vrsta.

Đukanović i sur. (2012.) u svojem su istraživanju, u kojem su ispitivali utjecaj gljive *A. alternata* na klijavost sjemena pšenice, zaključili da prisustvo *A. alternata* na sjemenu i klijancima nije utjecalo na smanjenje klijavosti te da prisustvo ove gljive ne remeti osnovne fiziološke procese u sjemenu i klijancima, odnosno da ova vrsta nema patogeni utjecaj na sjeme i klijance pšenice.

Janić Hajnal (2015.) navodi kako se separacijom i čišćenjem zrnene mase žita iz zrnene mase uklanja dio zrna zaraženih gljivama. Također navodi kako najveći postotak zrna zaraženih poljskim gljivama pripada u kategoriju neodvojivih primjesa te se u posljednje vrijeme provode istraživanja o mogućnosti primjene infracrvene spektroskopije ili fluorescentne analize u svrhu razvrstavanja pšenice na prijemu ili izdvajanja tijekom postupka čišćenja zrna. Svojim istraživanjem autorica je utvrdila kako se primjenom postupka ekstrudiranja te primjenom uobičajenih postupaka čišćenja pšenice postiže značajna redukcija prisutnosti svih *Alternaria* toksina u zrnenoj masi pšenice.

Samobor i sur. (2010.) navode kako su biljne bolesti koje se prenose sjemenom značajna prijetnja urodu i kakvoći usjeva, stoga je danas uobičajeno tretiranje sjemena kemijskim sredstvima, koja u ekološkoj poljoprivredi nisu dozvoljena, stoga se kontrola bolesti zasniva na preventivnim mjerama kao što su plodored, uzgoj otpornijih sorata i korištenje kvalitetnog sjemena. Također navode kako je prva registrirana sorta pšenice za ekološku proizvodnju Vesna, a s programom oplemenivanja pšenice za ekološku proizvodnju započelo se prije 15-ak godina.

Uz odgovarajuću sortu za ekološku poljoprivredu bitna je i primjena sredstava za tretiranje samog sjemena, koje može biti izvor zaraze. Sredstva koja se primjenjuju ne smiju imati nepoželjan učinak. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na mogućnost korištenja bakterija mliječne kiseline u suzbijanju rasta fitopatogena koji dovode do značajnih gubitaka prinosa, kao jednu od bioloških metoda zaštite usjeva.

6. Zaključak

Mnogi rodovi gljiva koriste se u prehrambenoj industriji i čovjek od njih ima korist, međutim pojedini rodovi plijesni izazivaju i velike štete, oštećujući pojedine biljne organe i uzrokujući bolesti biljaka, što konačno može dovesti do smanjenja prinosa i prihoda. Gljive roda *Fusarium* i *Alternaria* kontaminiraju ponajviše žitarice: pšenicu, ječam i kukuruz. Do zaraze navedenim gljivama može doći prije ili poslije žetve, prilikom neadekvatnog skladištenja i kao posljedica toga mogu se naći u hrani koju konzumiramo.

Kako ne bi došlo do kontaminacije usjeva sve se češće primjenjuju kemijska sredstva za zaštitu bilja. Međutim, takva sredstva su u ekološkoj poljoprivredi zabranjena zbog negativnih učinaka po okoliš i zdravlje ljudi. Zaštita usjeva u ekološkoj poljoprivredi provodi se primjenom mehaničkih, fizikalnih, bioloških i drugih mjera zaštite.

Iz rezultata provedenog istraživanja utvrđena je značajna inhibicija micelijskog rasta gljiva *F. graminearum* i *A. alternata* uz djelovanje bakterija mliječne kiseline *L.brevis* i *L. casei* te je utvrđeno da bakterije mliječne kiseline imaju visok potencijal za kontrolu rasta plijesni što ukazuje na mogućnost njihove primjene kao jedne od bioloških metoda zaštite usjeva protiv fitopatogena.

7. Popis literature

1. Alexander J., Autrup, H., Bard, D. (2004.): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 89: 1-35.
2. Al-Jobory, H. (2018.): *Lactobacillus acidophilus* Obtained from Local Yemeni Honey as a Biological Weapon against some Fumonisin-Producing *Fusarium* Species. URL: https://www.researchgate.net/publication/330969955_Lactobacillus_acidophilus_Obtained_from_Local_Yemeni_Honey_as_a_Biological_Weapon_against_some_Fumonisin-Producing_Fusarium_Species. Datum pristupa: 14.08.2019.
3. Bazukyan, I., Matevosyan, L., Toplaghalttsyan, A., Trchounian, A. (2018.): Antifungal activity of lactobacilli isolated from Armenian dairy products: an effective strain and its probable nature. *AMB Express*, 8: 87.
4. Berić, J. (2009.): Palež klasa pšenice. URL: <https://www.savjetodavna.hr/2009/05/11/palez-klasa-psenice/>. Datum pristupa: 09.08.2019.
5. Bennet J. W., Klich, M. (2003.): Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 497-516.
6. Bijelić, Z. (2010.): Utjecaj vremena infekcije s *Fusarium graminearum* na ekspresiju simptoma. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
7. Blateka, B., Šušković, J., Matošić, S. (1991.): Antimicrobial activity of lactobacilli and streptococci. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7: 533-536.
8. Blažić, M., Zavadlav, S. (2012.): Funkcionalne starter kulture - značenje i primjena u prehrambenoj industriji. 4. međunarodni stručno-znanstveni skup "Zaštita na radu i zaštita zdravlja", Karlovac, Veleučilište u Karlovcu, 259-264.
9. Bottalico, A., Logrieco, A. (1998.): Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, New York, USA, 65-108.
10. Brkić, B. (1995.): Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet.

11. Broggi, L. E., González, H. H., Resnik, S. L., Pacin, A. (2007.): *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24 (1): 47-51.
12. Chakaeva, S.A. (2000.): Fusariosis of agricultural cereals in Kyrgyzstan. Abstracts, 6th European *Fusarium* Seminar, Berlin, Germany, 74-75.
13. Chelkowski J. (1998.): *Fusarium* and mycotoxins. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, New York, Marcel Dekker, 45-64.
14. Chen H., Hoover, D. G. (2003.): Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 (3): 82-100.
15. Chester, F. D. (1901.): *A manual of determinative bacteriology*, 352.
16. Corsetti A., Gobbetti M., Rossi J., Damiani P. (1998.): Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 253-256.
17. Creppy, E.E. (2002.): Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19–28.
18. Ćosić J, Vrandečić K, Svitlica B. (2004.): *Fusarium* vrste izolirane s pšenice i kukuruza u istočnoj Hrvatskoj. *Poljoprivreda*, 10: 9-14.
19. Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D., Abramović, B., Jajić, I., Jakšić, S. (2012.): Mycopopulation of cereals in Croatia. Occurrence of fungi and mycotoxins in cereals and medicinal plants from Romania-Serbia-Croatia area, EUROBIT, Timisoara, Romania, 88-106.
20. Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2013.): Fuzarijska palež klasova. *Stručni rad. Glasnik zaštite bilja*, 4: 64-67.
21. Ćosić, J. (2019.): Bolesti ratarskih kultura. PDF. URL: [http://www.fazos.unios.hr/upload/documents/BOLESTI%20RATARSKIH%20KULTURA%20\(diplomski%20studij%20Zastita%20bilja,%20II%20semestar\).pdf](http://www.fazos.unios.hr/upload/documents/BOLESTI%20RATARSKIH%20KULTURA%20(diplomski%20studij%20Zastita%20bilja,%20II%20semestar).pdf). Datum pristupa: 13.08.2019.
22. Dal Bello, F., Clarke, C.I., Ryan, L.A.M., Ulmer, H., Schober, T.J., Ström, K., Sjögren, J., van Sinderen, D., Schnürer, J., Arendt, E.K. (2007.): Improvement of the Quality and Shelf Life of Wheat Bread by Fermentation with the Antifungal Strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science*, 45 (3): 309-318.
23. Desphande, S. S., (2002.): *Fungal Toxins. Handbook of food toxicology*, Marcel Dekker, Incorporation, New York, Basel, 387-456.

24. Diaz de Ackermann, M., Kohli, M. M. (1996.): Research on *Fusarium* Head Blight of Wheat in Uruguay. *Fusarium* Head Scab: Global Status and Future Prospects, Proceedings of a Workshop Held at CIMMYT, 13-18.
25. Doohan, F. M., Brennan, J., Cooke, B. M. (2003.): Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 755-768.
26. Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, DZS,
URL: https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2018/01-01-19_01_2018.htm. Datum pristupa: 11.08.2019.
27. Dukić, M. (2009.): Utjecaj liofilizacije i mikroinkapsulacije na funkcionalnost probiotičkih bakterija kao živih lijekova. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
28. Duraković, S., Duraković, L. (2003.): Mikologija u biotehnologiji. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Kugler, Zagreb.
29. Duraković, S., Redžepović, S. (2002.): Uvod u opću mikrobiologiju. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
30. Đukanović, L., Vuga Janjatov, V., Vrhovac, I., Milosavljević, A., Poštić, D., Mitrović, M., Trkulja, N. (2012.): Uticaj *Alternaria alternata* na klijavost semena pšenice. Znanstveni rad. *Zaštita bilja*, Beograd, 63 (4): 192-197.
31. Eddine, S.D., Yasmine, S., Ghazi, F., Bettache, G., Mebrouk, K. (2018.): Antifungal and Antibacterial Activity of some Lactobacilli Isolated from Camel's Milk Biotope in The South of Algeria. *Journal of microbiology, biotechnology and food science*, 8 (3): 7.
32. Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G., Manyes, L. (2017.): *Alternaria* Mycotoxins in Food and Feed: An Overview. Review article. *Journal of Food Quality*. 1-20.
33. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO,
URL: <http://www.fao.org/home/en/>. Datum pristupa: 23.06.2019.
34. Filya, I. (2003.): The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*, 95 (5): 1080-1086.
35. Gagro, M. (1997.): Ratarstvo obiteljskog gospodarstva: žitarice i zrnate mahunarke. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.
36. Havenaar, R., Huis in't Veld, J. H. J. (1992.): Probiotics: A General View. *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, Elsevier Applied Science, London, 1: 151-170.

37. Hill, J.P., Fernandez, J.A., McShane, M.S. (1983.): Fungi Associated with Common Root Rot of Winter Wheat in Colorado and Wyoming. *Plant Disease*, 67: 795-797.
38. Horackova, S., Novakova, T., Sluková, M., Bialasová, K., Kumherova, M., Plockova, M. (2018.): Antifungal Activity of Selected Lactobacilli Intended for Sourdough Production. *Applied Food Biotechnology*, 5 (4): 213-220.
39. Hussein, H.S., Brasel, J.M. (2001.): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167: 101-134.
40. International Agency for Research on Cancer, IARC (1993.): Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some naturally occurring substances. Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Lyon, France, 56: 397–444.
41. Ilić, J., Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2012.): Pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from weeds and plant debris in Eastern Croatia to wheat and maize. *Poljoprivreda, Osijek*, 18(2): 7-11.
42. Ivanović, M., Koprivica, M., Milijašević, S., Dukić, N., Duduk, B. (2004.): Molecular methods in plant disease diagnosis. *Pesticides and Phytomedicine*, 19: 223-231.
43. Janić Hajnal (2015.): Mogućnosti redukcije sadržaja *Alternaria* toksina u pšenici primenom odabranih tehnoloških postupaka. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
44. Janić Hajnal, E., Orčić, D., Torbica, A., Kos, J., Mastilović, J., Škrinjar, M. (2015.): *Alternaria* toxins in wheat from Autonomous Province of Vojvodina, Serbia: A preliminary survey. *Food Additives and Contaminants*.
45. Jurković, D., Ćosić, J., Vrandečić, K. (2016.): Pseudogljive i gljive ratarskih kultura. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
46. Kanižai Šarić, G., Milaković, Z., Krstanović, V. (2011.): Toksičnost *Fusarium* toksina. Pregledni rad. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 6 (3-4): 112-116.
47. Kanižai Šarić, G., Milaković, Z., Majić, I., Bulović, M., Šeput, J. (2017.): Inibicija micelijskog rasta *Fusarium* spp. djelovanjem mliječno-kiselih bakterija. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
48. Kocić Tanackov, S.D., Dimić, G.R. (2013.): Gljive i mikotoksini – kontaminanti hrane. Pregledni rad. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija, 67(4): 639–653.

49. Kommedahl, T., Windels, C.E., Stucker, R.E. (1979.): Occurrence of *Fusarium* Species in Roots and Stalks of Symptomless Corn Plants During the Growing Season. *Phytopathology*, 69: 961-966.
50. Koninsky, J. (1982.): Coucins and other bacteriocins with an established mode of action. *Annual Review of Microbiology*, 36: 125-144.
51. Kovačević, V., Rastija, M. (2014.): *Žitarice*. Udžbenik. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
52. Kryuchkova, L., Dragovoz, I., Yavorska, V., Raichuk, L. (2002.): *Fusarium* species in wheat grains in the Ukraine. *Journal of Applied Genetics*, 43: 177-184.
53. Laemmlen, F. (2001.): *Alternaria* diseases. ANR Publication 8040, University of California. URL: <http://anrcatalog.ucdavis.edu>. Datum pristupa: 13.08.2019.
54. Laref, N., Guessas, B. (2013.): Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria. Research article. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 13: 80-88.
55. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobbetti M. (2000.): Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sour dough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4084-4090.
56. Leslie, J.F., Pearson, C.A.S., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. (1990.): *Fusarium* spp. from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology*, 80: 343-350.
57. Linas, M. D., Morassin, B., Recco, P. (1998.): Actualités sur *Alternaria*: écologie, *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. Journées Nationales de la Société Française D'allergologie et D'immunologie Clinique, 38 (4): 349-355.
58. Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J. (1990.): Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 7 (1-2): 149-163.
59. 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.
60. Marković, B. S. (1990.): *Mikrobiologija II (bakterije, kvasci i plesni)*. Udžbenik. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
61. Matei, S., Matei, A., Matei, G.M., Petruta Cornea, C. (2015.): Utilization of Lactic Acid Bacteria and Extracellular Compounds in Biological Control of Fungal Species. *Research Journal of Agricultural Science*, 47: 3.

62. McFarland, L.V. (2009.): Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe*, 15 (6): 274–280.
63. Muñoz, R., Arena, M.E., Silva, J., González, S.N. (2010.): Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* vsc 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (4): 1019-1026.
64. Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., Onilude, A.A. (2003.): Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F₁ and *Lactobacillus brevis* OG₁. *African Journal of Biotechnology*, 2 (8): 219-227.
65. Oršolić, R. (2013.): Utjecaj temperature i hranjive podloge na razvoj nekih saprofitnih gljiva. Završni rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
66. Ostry, V. (2008.): *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1 (1): 175-188.
67. Pandžić, I. (2017.): Korištenje bakterija mliječne kiseline u poljoprivrednoj proizvodnji. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
68. Peraica, M., Radić, B., Lučić, A., Pavlović, M. (1999.): Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization: the International Journal of Public Health*, 77 (9): 754-766.
69. Pleadin, J., Frece, J., Vasilj, V., Markov, K. (2015.): Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje. Pregledni rad. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 10 (1-2): 6-13.
70. Presečan, S. (2010.): Prebiotički učinak meda i antagonizam probiotičke bakterije *Lactobacillus casei* prema *Listeria monocytogenes* tijekom čuvanja fermentiranih mlijeka. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.
71. Richard, J.L. (2007.): Some major mycotoxins and their mycotoxicoses. An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 3-10.
72. Rotem, J. (1994.): *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. APS press, St. Paul, USA.
73. Samobor, V., Horvat, D., Jošt, M. (2010.): Efikasnost predsjetvenog tretiranja sjemena pšenice u ekološkoj poljoprivredi. *Izvorni znanstveni rad. Sjemenarstvo*, 27: 3-4.

74. Schnürer J, Magnusson J. (2005.): Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 70–78.
75. Scott, P. M., Lawrence, G. A., Lau, B. P. Y. (2006.): Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research*, 22 (2): 142-147.
76. Simmons, E.G. (2007.): *Alternaria*. An identification manual. Utrecht, the Netherlands: CBS Biodiversity Series 6, 1–775.
77. Sommer, N. F. (1985.): Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7 (3), 331-339.
78. Stoloff, L. (1976.): Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. *Advances in Chemistry*, 149: 23-50.
79. Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J. (2002): *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans4-OH-L-Pro) and phenyl lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4322-4327.
80. Svitlica, B., Ćosić, J., Šimić, B., Vrandečić, K., Bunjevac. I., Božić, M. (2011.): Utjecaj uvjeta uzgoja na porast i sporulaciju *Fusarium* vrsta. *Poljoprivreda*, 17 (1): 42-46.
81. Španić, V. (2010.): Varijabilnost genotipova pšenice s obzirom na FHB otpornost i genetsku divergentnost. *Poljoprivredni institut Osijek, Osijek*.
82. Thomma, B. (2003.): *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4 (4): 226-236.
83. Tomasović, S. (1994.): Dostignuća u oplemenjivanju pšenice na otpornost prema *Fusarium* spp. na klasu u svijetu i kod nas. *Sjemenarstvo*, 11 (5): 349-363.
84. Tomasović, S., Vlahović, V., Sesar, B. (1994.): Fuzarioze pšenice sa težištem na zarazu klasa. *Pregledni znanstveni rad. Sjemenarstvo*, 11 (6): 517-546.
85. Volner, Z. (2003.): Opća medicinska mikrobiologija s epidemiologijom i imunologijom za zdravstvene škole. *Školska knjiga, Zagreb*.
86. Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Hen, Y., Azrieli, A., Szakacs, G., Filya, I. (2002.): Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28 (1): 7-11.
87. Zacharof M. P., Lovitt R. W. (2012.): Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *APCBEE Procedia*, 2: 50-56.
88. Zollner, P., Jodlbauer, J., Kleinova, M., Kahlbacher, H., Kuhn T., Hochsteiner, W., Linder, W. (2002.): Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine,

muscle tissue and liver samples of pigs fed with mycotoxin-concentrated oats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24: 2494-250.

89. Whitlow, L. W., Diaz, D. E., Hopkins, B. A., Hagler, W. M. (2006.): Mycotoxins and milk safety: the potential to block transfer to milk. URL: <https://en.engormix.com/mycotoxins/articles/mycotoxins-milk-safety-t33450.htm>.

Datum pristupa: 14.08.2019.

90. World Health Organization, WHO, URL: <https://www.who.int/>. Datum pristupa: 23.06.2019.

8. Sažetak

Alternaria alternata i *Fusarium graminearum* su mikotoksikogene plijesni. Javljaju se kao kontaminanti žitarica na polju i u skladištu, te su jedni od najčešćih uzročnika bolesti kod pšenice. Izazivaju štete u vidu smanjenja prinosa, a ujedno i prihoda, a njihovi produkti, mikotoksini, mogu ostaviti ozbiljne posljedice po zdravlje ljudi i životinja. U cilju suzbijanja kontaminacije zrna pšenice s ovim plijesnima ispitana je antifugalna djelotvornost bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus casei*. Iz rezultata provedenog istraživanja utvrđena je značajna inhibicija micelijskog rasta *F. graminearum* i *A. alternata* uz djelovanje *L. brevis* i *L. casei*. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na mogućnost korištenja bakterija mliječne kiseline u suzbijanju rasta fitopatogena koji dovode do značajnih gubitaka prinosa, kao jednu od bioloških metoda zaštite usjeva.

Ključne riječi: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, antifugalna djelotvornost.

9. Summary

Alternaria alternata and *Fusarium graminearum* are mycotoxigenic mildew. They are often reported as field and storage grain contaminants, and are one of the most common causes of wheat disease. They cause damage in form of yield reduction (causing revenue reduction at the same time). Their products, mycotoxins, can have serious consequences for human and animal health. In order to suppress wheat grain contamination with this mold, antifungal efficacy of lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei* was investigated. Based on results from this study, significant inhibitory myelogenous growth of *F. graminearum* and *A. alternata* with *L.brevis* and *L.casei* was found. The results obtained from this study indicate the possibility of using lactic acid bacteria in suppressing the growth of phytopathogens leading to significant yield losses, such as one of the biological methods of crop protection.

Keywords: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, antifungal efficacy.

10. Popis tablica

Tablica 1. Utjecaj antifungalnih kombinacija na rast plijesni *Alternaria alternata*.....26

Tablica 2. Utjecaj antifungalnih kombinacija na rast plijesni *Fusarium graminearum*.....27

11. Popis slika

Slika 1. <i>Lactobacillus casei</i>	5
Slika 2. <i>Lactobacillus brevis</i>	6
Slika 3. <i>Fusarium graminearum</i>	9
Slika 4. Fuzarijska palež klasova pšenice.....	11
Slika 5. Palež klijanaca pšenice.....	11
Slika 6. <i>Alternaria alternata</i>	15
Slika 7. Napad <i>Alternaria</i> spp. na klasu.....	16
Slika 8. Simptomi zaraze s <i>Alternaria</i> spp.....	17
Slika 9. MRS podloga.....	19
Slika 10. Očitavanje pH vrijednosti podloge.....	20
Slika 11. Razlijevanje MRS podloge u epruvete.....	20
Slika 12. Krumpir dekstrozni agar.....	21
Slika 13. Razlijevanje podloga u petrijeve zdjelice.....	21
Slika 14. Nacjepljivanje gljiva.....	22
Slika 15. Nacjepljivanje bakterija.....	22
Slika 16. Autoklav.....	23
Slika 17. Vaganje sjemena.....	24
Slika 18. Bušenje diskova na miceliju.....	24
Slika 19. Inokulacija micelijskim diskom.....	25

12. Popis grafikona

Grafikon 1. Rast plijesni <i>Alternaria alternata</i> uz <i>Lactobacillus casei</i> i <i>Lactobacillus brevis</i>	26
Grafikon 2. Rast plijesni <i>Fusarium graminearum</i> uz <i>Lactobacillus casei</i> i <i>Lactobacillus brevis</i>	27

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

Diplomski rad

ANTIFUGALNA DJELOTVORNOST BAKTERIJA *Lactobacillus* spp. NA ZRNO PŠENICE

Elena Petrović

Sažetak: *Alternaria alternata* i *Fusarium graminearum* su mikotoksikogene plijesni. Javljaju se kao kontaminanti žitarica na polju i u skladištu, te su jedni od najčešćih uzročnika bolesti kod pšenice. Izazivaju štete u vidu smanjenja prinosa, a ujedno i priroda, a njihovi produkti, mikotoksini, mogu ostaviti ozbiljne posljedice po zdravlje ljudi i životinja. U cilju suzbijanja kontaminacije zrna pšenice s ovim plijesnima ispitana je antifugalna djelotvornost bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus casei*. Iz rezultata provedenog istraživanja utvrđena je značajna inhibicija micelijskog rasta *F. graminearum* i *A. alternata* uz djelovanje *L. brevis* i *L. casei*. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na mogućnost korištenja bakterija mliječne kiseline u suzbijanju rasta fitopatogena koji dovode do značajnih gubitaka prinosa, kao jednu od bioloških metoda zaštite usjeva.

Ključne riječi: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, antifugalna djelotvornost.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić

Broj stranica: 46

Broj slika: 19

Broj grafikona: 2

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 90

Jezik izvornika: Hrvatski

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. izv. prof.dr.sc. Anita Liška, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga 1

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek
University Graduate Studies Ecological agriculture

Graduate thesis

ANTIFUGAL EFFICACY OF *Lactobacillus* spp. ON WHEAT GRAIN

Elena Petrović

Abstract: *Alternaria alternata* and *Fusarium graminearum* are mycotoxicogenic mildew. They are often reported as field and storage grain contaminants, and are one of the most common causes of wheat disease. They cause damage in form of yield reduction (causing revenue reduction at the same time). Their products, mycotoxins, can have serious consequences for human and animal health. In order to suppress wheat grain contamination with this mold, antifungal efficacy of lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei* was investigated. Based on results from this study, significant inhibitory mycelogenous growth of *F.graminearum* and *A. alternata* with *L. brevis* and *L. casei* was found. The results obtained from this study indicate the possibility of using lactic acid bacteria in suppressing the growth of phytopathogens leading to significant yield losses, such as one of the biological methods of crop protection.

Keywords: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, antifungal efficacy.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek

Mentor: izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić

Number of pages: 46

Number of pictures: 19

Number of figures: 2

Number of tables: 2

Number of references: 90

Original in: Croatian

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, chairman
2. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Anita Liška, member

Thesis deposited at: Library of Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek, Vladimira Preloga 1