

Ispitivanje učinkovitosti aktinomiceta na rast *Fusarium* spp.

Martić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:151:167294>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-11**



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

Marija Martić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Ispitivanje učinkovitosti aktinomiceta na rast *Fusarium* spp.

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marija Martić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Ispitivanje učinkovitosti aktinomiceta na rast *Fusarium* spp.

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
2. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, član
3. prof. dr. sc. Irena Rapčan, član

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Bilinogojstvo

Završni rad

Marija Martić

Ispitivanje učinkovitosti aktinomiceta na rast *Fusarium* spp.

Sažetak: Žitarice su osnova prehrane ljudi i životinja. Tijekom uzgoja i skladištenja, osjetljive su na gljivična oboljenja. Gljive iz roda *Fusarium* napadaju biljke uzrokujući razne bolesti te luče mikotoksine koji uzrokuju mikotoksikoze. Aktinomicete roda *Streptomyces* imaju izraženi antifungalni učinak prema biljnim patogenima zbog čega je i ispitana djelotvornost ovoga roda u suzbijanju *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticilloides*. Iz dobivenih rezultata nije uočena inhibicija rasta navedenih fitopatogenih gljiva s ispitanim izolatom roda *Streptomyces*. Poželjni su i daljnji naponi u izolaciji novih vrsta i sojeva aktinomiceta koji će imati poželjno antifungalno djelovanje.

Ključne riječi: *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticilloides*, *Streptomyces*, biološka sredstva

23 stranice, 4 tablice, 4 grafikona, 5 slika, 27 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih radova i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

BSc Thesis

Marija Martić

Study of the efficacy of actinomycetes on the growth of *Fusarium* spp.

Summary: Cereals are the basis of human and animal nutrition. During cultivation and storage, they are sensitive to fungal diseases. Fungi of the genus *Fusarium* attack plants causing various diseases and secrete mycotoxins that cause mycotoxicosis. Actinomycetes of the genus *Streptomyces* have a conspicuous antifungal effect against plant pathogens, which is why we investigate the effectiveness of this genus in the control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticilloides*. From the obtained results, no inhibition of growth of these phytopathogenic fungi was observed with the tested isolate of the genus *Streptomyces*. Further efforts to isolate new species and strains of actinomycetes that will have the desired antifungal activity are also desirable.

Key words: *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticilloides*, *Streptomyces*, biological agents

23 pages, 4 tables, 4 figures, 5 photos, 27 references

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

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ROD FUSARIUM	1
1.1.1. Fuzarijske bolesti.....	2
1.1.2. Mikotoksini	3
1.2. AKTINOMICETE	4
1.2.1. Rod <i>Streptomyces</i>	5
2. MATERIJAL I METODE	7
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	10
3.1. Antifungalno djelovanje <i>Streptomyces</i> sp. na <i>F. graminearum</i> 110250 i FRC R5796	10
3.2. Antifungalno djelovanje <i>Streptomyces</i> sp. na <i>F. verticillioides</i> M7075 i M1325.....	14
4. ZAKLJUČAK.....	20
5. LITERATURA	21

1. UVOD

Povećanjem broja stanovnika na Zemlji, povećava se i potreba za većom proizvodnjom hrane.

Biljke su izvor života na Zemlji te glavni proizvođači hrane - iskorištavanjem sunčeve energije, procesom fotosinteze. Svi ostali živi organizmi, ljudi, životinje, mikroorganizmi, kroz hranidbeni lanac koriste biljke kao primarni izvor hrane. Osnova prehrane ljudi i životinja jesu žitarice. Koriste se za ishranu, ali i kao sirovina za industriju (Znaor, 1996.). Konzumacijom žitarica uravnotežuje se prehrana, osigurava se unošenje niskog udijela masti te niz drugih prednosti, a prvenstveno ukoliko se zrno koristi neoljušteno (Pleadin i sur., 2017.). Prema Statističkim informacijama 2019. Državnog zavoda za statistiku, u Republici Hrvatskoj 2018. godine od ukupno zasijanih 803 902 ha, žitarice su zauzimale najveće površine, 459 703 ha (57,2%). Najzastupljeniji su bili kukuruz (260 706 ha) i pšenica (138 456 ha) (FAOSTAT). Biljne bolesti uzrokuju smanjenu količinu i kvalitetu prinosa (Ćosić i sur., 2006.). Tijekom uzgoja i skladištenja, žitarice su osjetljive na gljivična oboljenja (Ennouari i sur., 2018., cit. Rémésy i sur., 2015.). Pšenica i kukuruz najosjetljiviji su na gljive iz roda *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium* (Cvjetković, 2014.).

U ovom radu dan je osvrt na gljive iz roda *Fusarium* te njihovo suzbijanje pomoću aktinomiceta.

1.1. ROD FUSARIUM

Prema Ćosić i sur. (2006.) gljive roda *Fusarium* pripadaju razredu *Hyphomycetes*, redu *Hyphales*. Fitoparazitne vrste iz ovog roda pripadaju fakultativnim parazitima. Fakultativni paraziti provode dio života na biljkama uzrokujući bolesti, a ukoliko nemaju pogodnog domaćina ili su okolišni uvjeti nepovoljni žive kao saprofiti (Ćosić i sur., 2006.). Ove gljive imaju gospodarski značaj jer napadaju mnoge kultivirane i korovne biljne vrste izazivajući bolesti uzrokujući palež klijanaca, trulež korijena, lukovica, gomolja, stabljike, klipa, palež klasova i uvelost biljaka (Ćosić i sur., 2006.).

1.1.1. Fuzarijske bolesti

Prema Tomasović (1987.) na pšenici se javljaju tri tipa oboljenja pšenice: snježna plijesan, trulež korijena i stabljike te fuzarioze klasa.

Palež klijanaca nastaje uslijed sjetve već zaraženog sjemena ili ukoliko u tlu postoji izvor zaraze. Veliki postotak zaraženog sjemena uopće ne klije. Posljedica ove zaraze je propadanje klijanaca prije ili neposredno nakon nicanja. No ipak može doći do neometanog rasta i razvitka biljaka ukoliko je zaraza slabijeg intenziteta, biljka otpornija, a klimatski uvjeti povoljni za rast pšenice (Ćosić i sur., 2006.).

Izvor zaraze truleži korijena i vlati može biti zaraženo tlo ili putem koljenca uzročnik prodire u vlat. Na korijenčićima se može uočiti crveno-purpurna boja. Biljke mogu u potpunosti uvenuti ako je do zaraze došlo do faze busanja. Ukoliko je do zaraze došlo nakon busanja rjeđe dolazi do propadanja biljaka. Ipak, posljedice su slabo naliveno i šturo zrno (Ćosić i sur., 2006.).

Snježna plijesan je bolest koju uzrokuje *Fusarium nivale* (Tomasović, 1987.). Prve štete se mogu uočiti već u jesen. Dolazi do slabijeg nicanja, klijaneci su uvijeni, a iznikle biljke su slabo razvijene s donjim dijelom prekrivenim bijelo-ružičastim micelijem. No, zarazu je najlakše uočiti u proljeće nakon što se snijeg otopi. Tada su biljke odumrle, polegnute na površinitla te prekrivene bijelo-ružičastom prevlakom. Prevlaka može nestati ukoliko je vjetrovito i sunčano vrijeme. Preživjele biljke zaostaju u rastu i daju slabo nalivena zrna (Ćosić i sur., 2006., Tomasović, 1987.).

Fuzarijska palež klasova (engleski *Fusarium head blight* – FHB) je najznačajnija bolest pšenice i strnih žitarica uzrokovana gljivama iz roda *Fusarium* (Ćosić i sur., 2013.). Najčešće je to *Fusarium graminearum*. Od ostalih vrsta iz ovog roda su česti: *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium nivale*, a rjeđe *Fusarium poae* (Tomasović, 1987., cit. Čizmić, 1986.). Ova bolest ima velike posljedice na kakvoću i prirodu. Biljka se može zaraziti od cvjetanja pa sve do kraja vegetacije (Ćosić i sur., 2006., Ćosić i sur., 2013.). Zaražen može biti cijeli klas, dio klasa ili pojedini klasići. Ukoliko je do zaraze došlo u vrijeme oplodnje, zrna su sitnija, smežurana i slabe klijavosti. Sve kasnijom zarazom, zrno biljaka ima normalniji vanjski izgled, masu, dobru nalivenost te ne gubi klijavost. U mliječnoj zriobi se simptomi lako prepoznaju. Zdrave biljke imaju zelene klasove koji su povijeniji prema tlu zbog težine zrna. Za razliku od njih, bolesni klasovi ili dijelovi klasa su slamnato žute boje i uspravni. Zbog visoke relativne vlage zraka može se

uočiti na bazama pojedinih klasića narančaste ili ružičaste prevlake (Ćosić i sur., 2006., Ćosić i sur. 2008., Ćosić i sur., 2013.).

Uz pšenicu, kukuruz je jedna od kultura koja se uzgaja na velikim površinama. Daje izuzetno velike prinose zrna i zelene mase. Njegova namjena je višestruka: koristi se u ljudskoj prehrani, ishrani stoke, sirovina je u industriji i dr. (Znaor, 1996.). Prema Ćosić i sur. (2008.) kod kukuruza gljive iz roda *Fusarium* uzrokuju palež klijanaca, trulež korijena, trulež stabljike te trulež klipa.

Kod truleži korijena i stabljike, bolest se razvija od faze svilanja i metličanja pa sve do kraja vegetacije. Dolazi do razgradnje parenhimskog staničja u srži. Zbog nekroza korijena te promjena u stabljici, biljka gubi svoju čvrstoću, lomi se i poliježe. Klipovi se na takvoj stabljici slabije razvijaju (Ćosić i sur. 2008.).

Trulež klipa može zahvatiti čitav klip, dijelove klipa ili pojedinačna zrna. Do zaraze može doći preko svile, oštećene komušine, ubušnja gusjenica kukuruznog moljca i drugo, od svilanja pa do kraja vegetacije (Ćosić i sur. 2008.).

1.1.2. Mikotoksini

Gljive iz rodova *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* i *Claviceps* su najčešći uzročnici bolesti i proizvode mikotoksine (Ennouari i sur., 2018., cit. Herebian i sur., 2009.). Mikotoksini predstavljaju sekundarne metabolite koji su štetni za zdravlje ljudi i životinja. Uzrokuju bolesti pod nazivom mikotoksikoze (Kanižai Šarić i sur., 2011., cit. Kosalec i sur., 2004.). Hranidbenim lancem povezana je biljna proizvodnja, stočarska proizvodnja te ishrana ljudi. Ishranom zaraženom hranom, mikotoksini uzrokuju negativne posljedice na zdravlje ljudi i životinja (Cvjetković, 2014.).

Najznačajniji mikotoksini na žitaricama, produkti roda *Fusarium*, su fumonizini, trihoteceni i zearalenon (Kanižai Šarić i sur., 2011., cit. Placinta i sur., 1999.).

Fumonizini su mikotoksini, produkti nekoliko vrsta iz roda *Fusarium*, a prvenstveno su to *Fusarium verticillioides* i *Fusarium proliferatum* (Kanižai Šarić i Tkalec, 2011., cit. Krska i sur., 2007.). Prema istraživanjima, najčešći domaćin je kukuruz (Domijan, 2013., cit. Domijan i sur., 2005.a, Ivić i sur., 2009., Domijan i sur., 2005.b, Sorriano i Draggaci, 2004.). U ispitivanjima različitih životinja uočeno je kako izaziva leukoencefalomalaciju

kopitara, kod svinja endem pluća te je vidljiv nefrotoksičan, hepatotoksičan i kancerogen učinak fumonizina (Domijan, 2013., cit. NTP, 2001.).

Trihotecene proizvode gljive iz rodova *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotris*, *Trichoderma*, *Trichothecium* i drugi (Kanižai Šarić i sur., 2011., cit. Hussein i sur., 2001., Bennett i sur., 2003.). Značajne vrste iz roda *Fusarium* za proizvodnju ovih mikotoksina su *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium pseudograminearum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium acuminatum* i *Fusarium poae* (Kanižai Šarić i sur., 2011., cit. Hussein i sur., 2001.). Uzročnici su oštećenja bubrega, imunološkog, probavnog i živčanog sustava (Kanižai Šarić i Tkalec, 2011., cit. Agag, 2005., Rocha i sur., 2005.).

Zearalenon je sekundarni metabolit gljiva *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium crookwellense* (Kanižai Šarić i sur., 2011., cit. Bennett and Klich, 2003., Glenn, 2007., Fink-Gremmels i Malekinejad, 2007.). Uzrokuje poremećaje u reproduktivnom sustavu, endokrinom sustavu, a većim koncentracijama djeluje imunotoksično na humane T-limfocite (Pepeljnjak i sur., 2008., cit. Zinedine i sur., 2007.).

1.2. AKTINOMICETE

Aktinomicete su aerobne, gram-pozitivne bakterije (Šarčević-Todosijević i sur., 2018., Arifuzzaman i sur., 2010.). Nitastog su oblika (Šarčević-Todosijević i sur., 2018., cit. Madigan et al., 1997.). Prema svojim značajkama nalaze se između bakterija i gljiva (Znaor, 1996.).

Aktinomicete predstavljaju jednu od glavnih populacija koje se nalaze u tlu dajući tlu „miris šumske zemlje“ (Arifuzzaman i sur., 2010., Znaor, 1996., Godena, 2011.). Razgrađuju organsku tvar te teško razgradive spojeve kao što su čekinje, dlake, hitin i drugo (Znaor, 1996.; Godena, 2011.). Takve spojeve ne može razgraditi niti jedna druga vrsta organizama (Znaor, 1996.).

Luče enzime čijim djelovanjem počinje razgradnja celuloze, te djelomično lignina (Znaor, 1996.). Zbog ove sposobnosti, važne su u tvorbi komposta. Mogu se često vidjeti golim okom, kao i gljivice, u vidu sivkasto-bijelih vlakana ili praškaste tvari koja prekriva kompostnu masu (Znaor, 1996.).

Aktinomicete proizvode antibiotike, utječu na štetne učinke u tlu, ne mijenjaju biološko puferiranje tla, kao što to čine kemijske mjere, nemaju negativan utjecaj na okoliš (Aghigi i sur., 2004.). Značajni proizvođači antibiotika su predstavnici roda *Streptomyces* (Arifuzzaman i sur., 2010.).

Broj i vrsta aktinomiceta prisutnih u tlu, pod utjecajem su niz čimbenika kao što su geografska lokacija, temperatura tla, pH vrijednost, tip tla, vlažnost i aeriranost tla, organska tvar i drugih (Arifuzzaman i sur., 2010.). Na kiselim tlima prevladava rod *Streptomyces*, a na alkalnim *Actinoplanes* i *Streptosporangium* (Arifuzzaman i sur., 2010., cit. Davies and Williams, 1970.).

Također, mnogi organizmi, poput aktinomiceta, ali i bakterije, kvasci, plijesni i alge, mogu potpuno ukloniti ili djelomično smanjiti količine mikotoksina u hrani (Pleadin i sur., 2017., cit. Shetty i Jespersen, 2006; Markov i sur., 2010; Patharajan i sur., 2010; Mc Cormick, 2013; Pleadin i sur., 2014). Takvim djelovanjem sprječavaju se štetni učinci na zdravlje živih bića.

1.2.1. Rod *Streptomyces*

Rod *Streptomyces* predstavljaju najistraženiji rod aktinomiceta (Aghigi i sur., 2004.). U ovaj rod pripadaju brojni mikroorganizmi koji imaju važnu ulogu u zdravstvu, veterini, biotehnologiji i ekologiji. Pokazuju obećavajuće karakteristike za poticanje rasta biljaka te biokontrolu biljnih patogena (Colombo i sur., 2019., cit. Barka i sur., 2016.). Biokontrola ima sve veći značaj zbog ograničenja korištenja pojedinih fungicida (Colombo i sur., 2019.). Rod *Streptomyces* proizvodi bioaktivne sekundarne metabolite koji imaju antifungalno, antivirusno, antitumorsko, antihipertenzivno, antibiotsko i imunosupresivno djelovanje (de Lima Procópio i sur., 2012., cit. Khan i sur., 2011., Omura i sur., 2001., Patzer i Braun, 2010.). Takvo djelovanje omogućava život u simbiozi između biljaka i bakterija. Rod *Streptomyces* biljci daje antibiotike koje ju štite od patogena, a biljka bakterijama omogućuje rast i razvoj (de Lima Procópio i sur., 2012.). Raznolikost proizvodnje sekundarnih metabolita te endofitska obilježja, čine rod *Streptomyces* odličnog kandidata za kontrolu i suzbijanje bolesti uzrokovane fitopatogenim gljivama iz roda *Fusarium* (Colombo i sur., 2019., cit. Qin i sur., 2011., Zamoum i sur., 2015.). Kako bi se iskoristile sve raznolikosti ovog roda, potrebno je, u početnim fazama istraživanja, pomno

proučiti čimbenike koji utječu na njega, kao što su starost gljivične kolonije, temperatura, ostali okolišni uvjeti (Colombo i sur., 2019.).

S obzirom na antifungalna svojstva roda *Streptomyces* cilj ovog rada je bio utvrditi takvo djelovanje na najznačajnijim predstavnicima roda *Fusarium*.

2. MATERIJAL I METODE

U pokusu je korištena čista kultura *Streptomyces* sp. iz kolekcije Katedre za mikrobiologije Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Kulture plijesni korištene su: *Fusarium graminearum* 110250 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Nizozemska), *Fusarium graminearum* FRC R-05796 (Fusarium Research Center, Department of Plant Pathology, Penn State University, SAD), *Fusarium verticillioides* M-7075 i *Fusarium verticillioides* FRC M-1325 (Fusarium Research Center, Department of Plant Pathology, Penn State University, SAD) (Slika 1.).



Slika 1. Čiste kulture *Fusarium* spp.

(Izvor: Autor)



Slika 2. Mjerenje pH vrijednosti hranjive podloge

(Izvor: Autor)

Čiste kulture *Fusarium* spp. su nacijepljene (Slika 3.) na krumpir-dekstrozni agar (Biolife, Italija), koji je pripremljen na odgovarajući način (Slika 2.) i inkubiran na temperaturi od 25°C kroz sedam dana.



Slika 3. Nacijepljivanje *Fusarium* spp.

(Izvor: Autor)

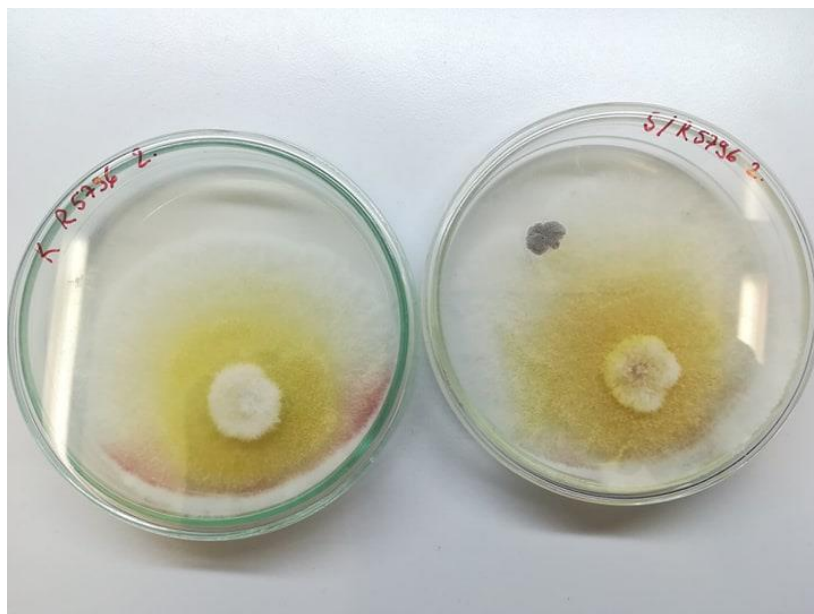
Pokus je postavljen kao dual culture *in vitro* pokus (Slika 4.) odnosno nacijepljene su ispitivane čiste kulture u Petrijevu zdjelicu jedna nasuprot druge. Inokulacija je provedena micelijskim diskom s rubova kolonije čistih kultura (*Streptomyces* nasuprot *Fusarium* spp.) promjera 4 mm.



Slika 4. Nacijepljivanje *F. verticilloides* i *Streptomyces*

(Izvor: Autor)

Tretmani su postavljeni u četiri ponavljanja (Slika 5.), a inkubacija je provedena na $25^{\circ}\text{C}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ u laboratorijskom termostatu (Termo Medicinski aparati, BTS-M). Kontrola nije sadržavala patogene gljive.



Slika 5. Kontrola *F. graminearum* nasuprot tretmana

(Izvor: Autor)

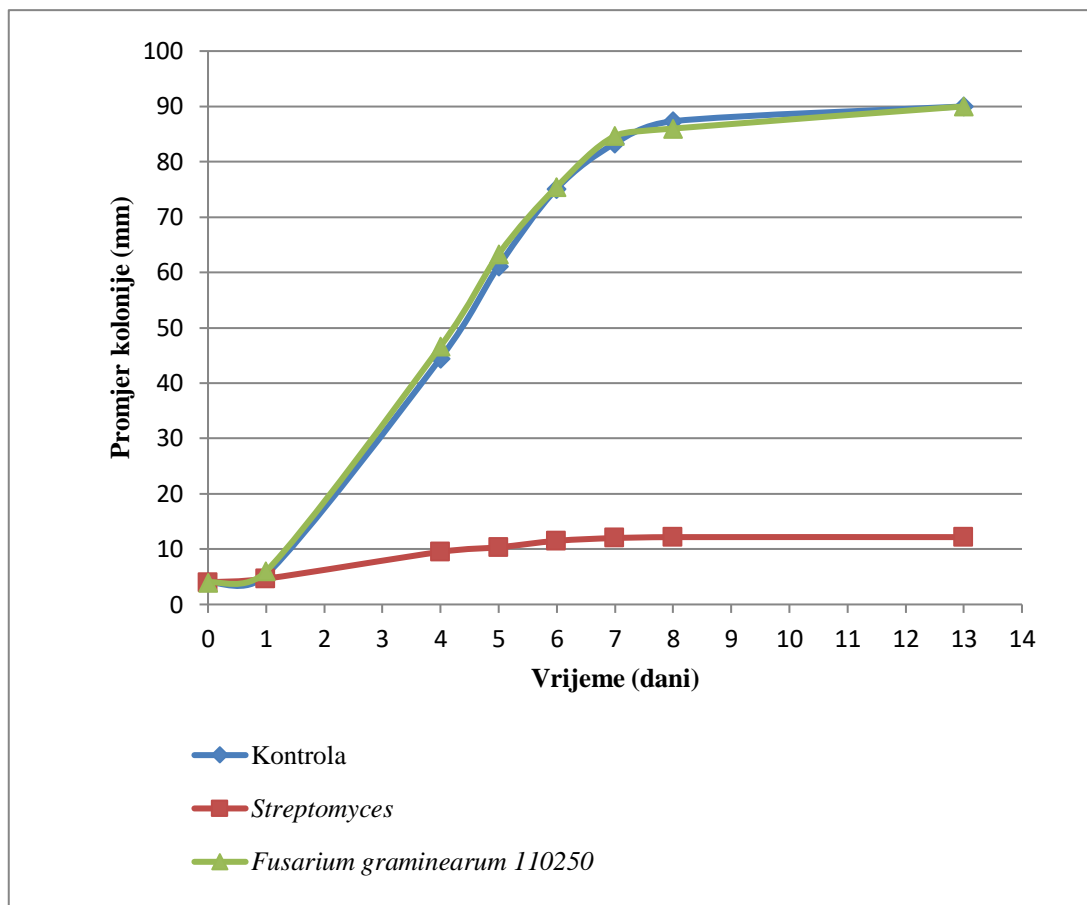
U razdoblju od 13 dana, mjerenjem dva promjera kolonije pod pravim kutom, praćen je micelijski rast plijesni. Dobiveni rezultati su statistički analizirani Studentovim t-testom, a za analizu podataka korišteni su Microsoft Excel (2013.) i Statistica 13.5 (Tibco Software Inc.).

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Antifungalno djelovanje *Streptomyces* sp. na *F. graminearum* 110250 i FRC R5796

Fitopatogene gljive predstavljaju glavni problem u poljoprivredi, naročito u uzgoju ekonomski važnih biljaka. Zbog njihova suzbijanja, intenzivno se koriste kemijska sredstva (Prapagdee i sur., 2008.). Učinkovita su i neprocjenjiva (Aghigi i sur., 2004.). Njihova učestala upotreba dovela je do niza problema, kao što je utjecaj na zdravlje ljudi i životinja, onečišćenje tla, vode i sveukupnoga okoliša te otpornost biljnih patogena. Uviđajući probleme, poljoprivreda se okreće traženju alternativnih metoda koje su ekološki prihvatljive (Prapagdee i sur., 2008.). U novijim istraživanjima, razmatra se korištenje mikroorganizama protiv biljnih patogena ili kao dodataka agrokemikalijama. Biološka kontrola biljnih bolesti je spora, ne daje brzo profit, ali može biti dugotrajna, jeftinija i bezopasna za život. Biokontrolni sustavi ne uklanjaju biljne patogene niti bolesti, nego ih dovode u prirodnu ravnotežu (Aghigi i sur., 2004., cit. Dhingra i Sinclair, 1995.). Jedna od tih metoda je upotreba *Streptomyces* kao biofungicida (Prapagdee i sur., 2008.). Posjeduju svojstva koja su korisna u borbi protiv biljnih patogena. Iz ove bakterije je izolirano preko 50 antibiotika kao što su: streptomycin, neomicin, kloramfenikol, tetraciklin (Aghigi i sur., 2004., cit. Keiser i sur., 2000.).

U ovome istraživanju nije zabilježena statistički opravdano antifungalno djelovanje (Tablica 1. i 2.) ispitivanog roda *Streptomyces* na micelijski rast *F. graminearum* 110250 i *F. graminearum* R5796 (Grafikon 1. i 2.).

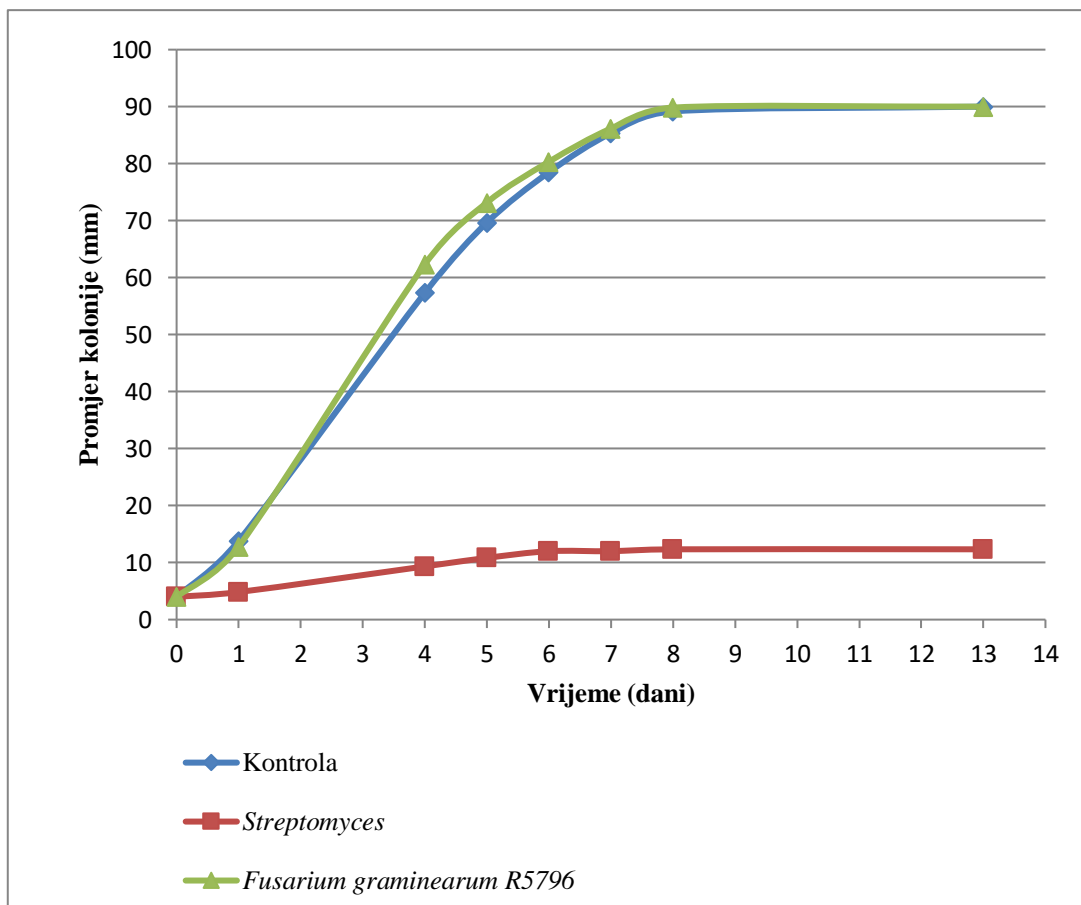


Grafikon 1: Rast *F. graminearum* 110250 uz *Streptomyces* sp.

Tablica 1. Statistički prikaz razlike rasta *F. graminearum* 110250 i kontrole

Tretman	stopa rasta (mm/dan)	P
Kontrola	4,33	
<i>F. graminearum</i> 110250	4,38	ns

ns- not significant



Grafikon 2: Rast *F. graminearum* FRC-R-05796 uz *Streptomyces* sp.

Tablica 2: Statistički prikaz razlike rasta *F. graminearum* R05796 i kontrole

Tretman	stopa rasta (mm/dan)	p
Kontrola	4,69	
<i>F. graminearum</i> R5796	4,79	ns

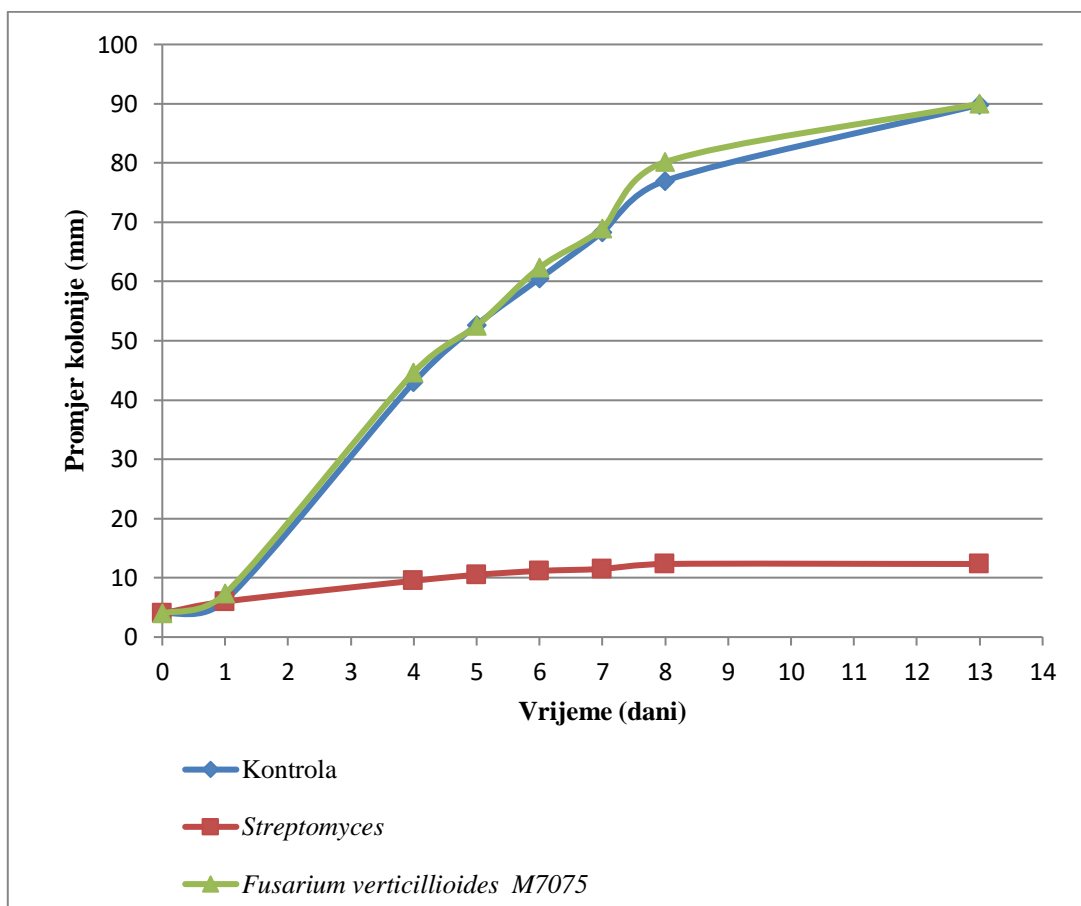
ns- notsignificant

Rezultati drugih istraživanja su utvrdili antifungalnu djelotvornost roda *Streptomyces*. Colombo i sur. (2019.) su proveli analizu o djelovanju *Streptomyces* spp. na *Fusarium* spp. i njihove toksine. Uočeni su brojni *Streptomyces* sojevi koji pokazuju antifungalno

djelovanje. Neki od sojeva su PAL114 koji je inhibirao *Fusarium culmorum*, soj 6803 koji je inhibirao rast *F. graminearum*, soj 201 je inhibirao rast *F. moniliforme*, LZ35 protiv *F. verticillioides* (Colombo i sur., 2019., cit. Aouiche i sur., 2014., Bordoloi i sur., 2001., Chen i sur., 2010., Deng i sur., 2014.). Karakteristični su novi antifungalni proteini, izolirani iz *Streptomyces* sp. C/33-6. Pokazali su fungicidno djelovanje u kojem je u potpunosti inhibirano klijanje konidija *F. graminearum* (Colombo i sur., 2019., cit. Fulgueira i sur., 2004.). Pregled literature pokazuje znatan rast zainteresiranosti za uporabu *Streptomyces* spp. kao sredstva za biološku kontrolu protiv *Fusarium* spp. zbog inhibirajućeg rasta te ograničavanja nakupljanja toksina. Također, ključno je razumijevanje ekološke uloge, a posebno interakcije između domaćina i mikroorganizama kako bi se razvila učinkovita i dugotrajna biokontrola (Colombo i sur., 2019.). U Koreji su Jung i sur. (2013.) istraživali utjecaj bakterijskog izolata BN1 koji pripada rodu *Streptomyces* protiv *F. graminearum*, uzročnika fuzarijske paleži klasova, jedne od najtežih bolesti žitarica. Zbog čestih epidemija ove bolesti u Koreji, korišteni su kemijski fungicidi čija upotreba je dovela do otpornih sojeva *F. graminearum*. Zamijećena je razlika dužine sadnica zaraženih s *F. graminearum* i nezaraženih sjemenki. Sjemenke su natopljene ili prskane suspenzijom spora *F. graminearum*. Sjemenke su imale sličan postotak klijanja, a razlike među njima je uočena nakon rasta. Zaražene biljke su bile manje nego biljke koje nisu zaražene. Učinkovitost BN1 je ocjenjena *in vitro* i *in vivo* metodama. Njihovo istraživanje je rezultiralo inhibiranim rastom *F. graminearum* na glavama pšenice primjenom metode prskanja ispitivanog izolata u vrijeme cvatnje (Jung i sur. 2013.). Nourozian i sur. (2006.) su proveli istraživanje o biološkoj kontroli *F. graminearum* na pšenici koristeći sojeve *Bacillus subtilis* 53 i 71, *Pseudomonas fluorescens* biov1 soj 32 i *Streptomyces* sp. *Streptomyces* je smanjio težinu bolesti fuzarijske paleži klasova 21 dan nakon inokulacije. Prinos pšenice tretirane s *Streptomyces* sp. soj 3 i s *F. graminearum* je bio veći nego u kontrolama koje su tretirane samo patogenom. Pšenica, tretirana samo izolatima *Streptomyces*, je imala značajno veći prinos. Ispitivani izolati pokazali su zone inhibicije između patogena i bakterija. Autori navode kako bi razlog tomu mogao biti posljedica inhibitorne tvari koju luči bakterija te suzbija tako rast patogenih gljiva. Druga mogućnost je da bakterijski izolati troše hranjive tvari u agaru i na taj način zaustavljaju rast *F. graminearum*. *Streptomyces* izolati su pokazali svoje djelovanje u pokusima na polju, iako u laboratorijskim pokusima nisu što upućuje na zaključak kako je pokus na polju pouzdanija metoda nego *in vitro*, navode autori. Neki sojevi *Streptomyces* sp. su dostupni u pojedinim zemljama kao biološka kontrola biljnih bolesti (Nourozian i sur., 2006.).

3.2. Antifungalno djelovanje *Streptomyces* sp. na *F. verticillioides* M7075 i M1325

Izostao je i očekivani antifungalni učinak roda *Streptomyces* u inhibiciji rasta *F. verticillioides* M7075 i *F. verticillioides* M1325 (Grafikon 3. i 4.) pri čemu nije zabilježena statistički opravdana razlika (Tablica 3 i 4.).

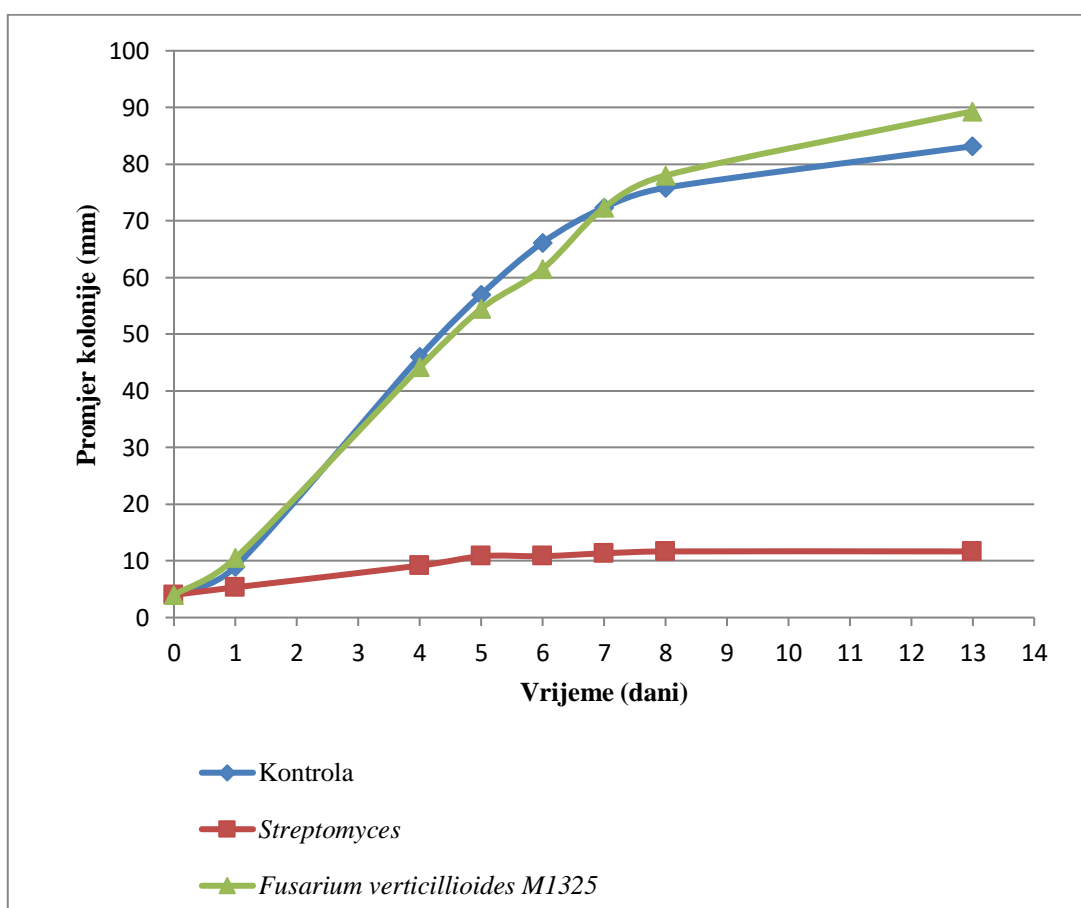


Grafikon 3: Rast *F. verticillioides* M7075 uz *Streptomyces* sp.

Tablica 3: Statistički prikaz razlike rasta *F. verticillioides* M7075 i kontrole

Tretman	stopa rasta (mm/dan)	p
Kontrola	3,86	
<i>F. verticillioides</i> M7075	3,94	ns

ns- not significant



Grafikon 4: Rast *F. verticillioides* FRC-M-1325 uz *Streptomyces* sp.

Tablica 4: Statistički prikaz razlike rasta *F. verticillioides* M1325 i kontrole

Tretman	stopa rasta (mm/dan)	p
Kontrola	3,97	
<i>F. verticillioides</i> M1325	3,98	ns

ns- notsignificant

Rezultati sličnih istraživanja su pokazala očekovani antifungalni učinak roda *Streptomyces*. Getha i Vikineswary (2002.) istraživali su utjecaj *Streptomyces violaceusniger* soj G10 na *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* soj 4. *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) je jedan od glavnih uzročnika bolesti koje uzrokuju uvenuće banana. Pet izolata (G10, G16, G20, G21 i G27) inhibirali su rast svih ispitivanih gljivica. Soj G10 je pokazao snažan antagonistički učinak protiv 3 od 4 gljivična patogena. Jedini je izolat koji je inhibirao FOC soj 4 te FOC sojeve 1 i 2. Na „cross-plug“ pokusnim pločama za ispitivanje uočeno je kako nema direktnog kontakta između soja G10 i inhibirane gljivične kolonije. Ovo sugerira na inhibiciju izlučenim difuznim antifungalnim metabolitima u agar. Inhibicija rasta micelija gljivica bila je evidentna nakon 2 dana inkubacije, ali antagonistički efekt bio je izraženiji nakon 4 dana inkubacije. Litički učinak, uzrokovan sojem G10, prvi je put otkriven u gljivičnim hifama nakon 2 dana inkubacije. Već četvrti dan češće su se opazile izobličenje i liza hifa. Uočeni su i drugi morfološki učinci, poput abnormalnog razgranavanja hifa i stvaranja izbočina na hifama. Također, ispitan je i inhibitorni učinak soja G10 na klijanje spora i razvoj FOC rase 4 u tlu. Rezultati su vrlo nalikovali onima opaženim u *in vitro* pokusu. Ti učinci uključuju inhibiciju klijanja gljivične spore, oticanje, izobličenje i pretjerano grananje gljivičnih hifa. U svim slučajevima došlo je do određenog pada razvoja FOC u prisutnosti soja G10 (Getha i Vikineswary, 2002.).

Ursan i sur. (2018.) su izolirali nove *Streptomyces* sojeve, iz vrtnog tla i komposta, za biološku kontrolu protiv fitopatogenih gljiva, a posebno *F. graminearum* i *F. culmorum*.

Više od 78% od ukupnog broja bakterija je pokazalo inhibitorsko djelovanje prema najmanje 2 testirana fitopatogena, ali samo su 4 soja (SS16, S15, StrS1 i StrS4) odabrana zbog šireg antifungalnog djelovanja. Uočeno je inhibitorsko djelovanje sojeva SS16 i Str4 na razvoj dva aflatoksina *A. flavus* (GE2 i T11), prethodno izoliranih iz žitarica (Ursan i sur., 2018., cit. Ciobotaru i sur., 2015). Primijenjene metode pokazale su sposobnost većine odabranih bakterija da stvaraju hidrolatne enzime poput amilaze, celulaze (CMC-aze), himinaze, lipaze i proteaze. Rezultati dobiveni ovim eksperimentima sugeriraju da sinteza hidrolatnih enzima, poput proteaza i hitinaza, može pridonijeti antifungalnim svojstvima odabranih *Streptomyces* spp, navode autori. Nadalje, u istom istraživanju, HPTLC analizom kultura ekstrakata, koristeći zearalenon kao standard, dokazano je da je nivo ovog mikotoksina smanjen u prisutnosti *Streptomyces* sojeva SS16 i Str4, stoga dobiveni rezultati sugeriraju na smanjenje mikotoksina, barem u slučaju ZEA, tijekom uzgoja *Streptomyces* s fitopatogenim gljivama koje proizvode mikotoksin, najvjerojatnije posljedica inhibicijskog djelovanja bakterija na rast gljivica. Odabrani prirodni sojevi *Streptomyces* spp. imaju jasna antifungalna svojstva i mogu se upotrijebiti u daljnjim eksperimentima za studije koje uključuju složene interakcije s biljkama i biljnim patogenima (Ursan i sur., 2018.).

U Iranu, Aghigi i sur. (2004.) su proveli istraživanje o antifungalnom djelovanju aktinomiceta na fitopatogene gljive. Ustanovili su kako od 110 izolata, 14 je pokazalo antifungalno djelovanje barem prema jednoj od ispitivanih gljiva. To su *Frankia* sp. soj 103, *Streptomyces plicatus* soj 101, *Streptomyces* sp. sojevi 44, 102, 01, N, G, 56, 96, 78, L, 30, 43 i 95. Autori su primjetili kako korišteni sojevi pokazuju prisutnost potencijalnih antifungalnih metabolita pri čemu je uočen širok spektar djelovanja od inhibicije rasta micelija, stvaranje mikroklerocija, proizvodnju melanina te stvaranja zone inhibicije. *Phytophthora megasperma* je bila najosjetljivija, a *Saccharomyces cerevisiae* i *Fusarium solani* su bili najmanje osjetljivi na aktinomicete, navode autori.

Streptomyces sp. soj 5406 se koristi posljednjih 35 godina u Kini za zaštitu usjeva pamuka od patogena koji se prenose u zemlji. Rezultati su pokazali da uporaba *Streptomyces* pospješuje rast usjeva i povrća (Aghigi i sur., 2004., cit. Valois i sur., 1996.). Suspenzije spora nekih od izolata se koriste u kontroli korijenskih gljivičnih uzročnika primjenom tretmana na sjemenu i sadnicama (Aghigi i sur., 2004.).

Kanini i sur. (2013.) su proveli istraživanje biološke kontrole protiv *Fusarium oxysporum*. Ova gljiva dovodi do velikih gubitaka u stakleničkoj proizvodnji, proizvodnji na otvorenom polju te hidroponskom uzgoju. Ispitali su 528 *Streptomyces* izolata. Od njih najbolji, s najvećim antagonističkim djelovanjem, je bio *Streptomyces rochei* ACTA1551 te je on dalje korišten u ispitivanju biološke zaštite rajčice. Dokazali su da sjeme zaraženo sa *Streptomyces rochei* ACTA1551 može zaštititi biljke od simptoma venuća koje uzrokuje *F. oxysporum*. Također su zapazili usporen rast patogena u nesterilnim tlima prirodne mikroflore. *Streptomyces* može zaštititi biljku samo jednim premazom sjemena suspenzijom spora prije sjetve, prednost ove inokulacije je što sredstvo brzo i obilno prekriva čitavu površinu sjemena čineći ga tako puno efikasnijim (Kanini i sur., 2013.).

El-Shanshoury i sur. (1996.) su utvrdili pozitivna djelovanja kombinacije kemijskih i bioloških sredstava protiv uzročnika bolesti. Koristili su 2 vrste kemijskih sredstava, pedimentalin i metribuzin te *Streptomyces corchorusii* i *Streptomyces mutabilis*. Istraživanja su pokazala kako pendimetallin i metribuzin inhibiraju rast *F. oxysporum* i *Pseudomonas solanacearum* te potiču rast *Streptomyces corchorusii* i *Streptomyces mutabilis*. Inhibicijski učinak se povećava povećanjem koncentracije testiranih herbicida. Kontrola patogena se razlikovala ovisno o vrsti, koncentraciji herbicida, antagonističkom organizmu i vrsti tla, navode autori. Kao najučinkovitiji tretman za kontrolu *F. oxysporum* i *P. solanacearum* se pokazala inokulacija sjemena biljaka natopljenih u pendimentalinu sa *Streptomyces corchorusii* i *Streptomyces mutabilis*. Simptomi bolesti su smanjeni u nesteriliziranim tlima više nego na steriliziranim. Slična zapažanja su primijećena upotrebom drugih mikroorganizama, kao što su: *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces pulcher*, *Streptomyces citreofluorescan*, *Streptomyces atroolivaceus* i *Azotobacter chroococcum*. Ovo istraživanje je primjer uspješne upotrebe bioloških preparata, a smanjene upotrebe kemijskih sredstava (El-Shanshoury i sur., 1996.).

Nourozian i sur. (2006.) su proveli istraživanje o biološkoj kontroli *Fusarium graminearum* na pšenici koristeći sojeve *Bacillus subtilis* 53 i 71, *Pseudomonas fluorescens* bioV1 soj 32 i *Streptomyces* sp. *Streptomyces* je smanjio težinu bolesti FHB 21 dan nakon inokulacije. Prinos pšenice tretirane s *Streptomyces* sp. soj 3 i s *F. graminearum* je bio veći nego u kontrolama koje su tretirane samo sa patogenom. Pšenica, tretirana samo s izolatima *Streptomyces*, je imala značajno veći prinos. Ispitivani izolati pokazali su zone inhibicije između patogena i bakterija. Navode kako bi razlog tomu mogao biti posljedica inhibitorne tvari koja luči bakterija te suzbija tako rast patogenih gljiva. Druga mogućnost

je da bakterijski izolati troše hranjive tvari u agaru i na taj način zaustavljaju rast *F. graminearum*. *Streptomyces* izolati su pokazali svoje djelovanje u pokusima na polju, iako u laboratorijskim pokusima nisu. To upućuje na to da je pokus na polju pouzdanija metoda nego *in vitro*. Neki sojevi *Streptomyces* sp. su dostupni u pojedinim zemljama kao biološka kontrola biljnih bolesti (Nourozian i sur., 2006.).

Zbog toksičnoga djelovanja kemijskih sredstava na zdravlje ljudi i životinja, onečišćenja okoliša, poremećaja prirodne ravnoteže, rezidua u hrani, ekološka poljoprivreda sugerira na korištenje preventivnih mjera kao što su plodored i higijena tla, gnojidba te korištenje bioloških sredstava (Znaor, 1996.).

Unatoč mnogim uspjesima istraživača, istraživanje u svrhu pisanja ovoga rada *in vitro* metodom nije pokazalo inhibitorški učinak *Streptomyces* na rast i razvoj gljiva *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticilloides*. Patogene gljive su pokazale otpornost prema antibiotskom djelovanju *Streptomyces*.

U svijetu se proizvede 100 000 tona antibiotika godišnje za potrebe zdravstva, poljoprivrede (de Lima Procópio i sur., 2012., cit. Nikaido, 2009.). Njihova pretjerana upotreba je rezultirala otpornošću patogena. Otpornost može biti stečena genetskim promjenama poput mutacija ili stjecanja otpornih gena horizontalnim prijenosom. Provedeno istraživanje sa *Streptomyces* izoliranim iz gradskog tla je ukazalo na rezistentnost većine sojeva na više antibiotika. Na otpornost može utjecati fiziološko stanje patogena te koncentracija antibiotika (de Lima Procópio i sur., 2012., cit. Aminov, 2009., Martinez i sur., 2009.).

U praktičnoj upotrebi, pesticidni preparati koji su prije par mjeseci bili u upotrebi, više nisu učinkoviti. Uzročnici biljnih bolesti i štetnici su postali na njihovo djelovanje zbog česte upotrebe. Proizvodnjom novih preparata, proces otpornosti se ubrzava i pojačava te prenosi na potomstvo (Znaor, 1996.).

4. ZAKLJUČAK

Proizvodnja žitarica je važna za ishranu ljudi i životinja. No, njihov rast i razvoj ugrožavaju fitopatogene gljive uzrokujući smanjen rast, propadanje biljke i niže prinose. Mikotoksini koji proizvode gljive imaju negativne utjecaje na organizam živih bića. U mnogim istraživanjima potvrđena je antifungalna sposobnost aktinomiceta, a među njima najpoznatiji i najistraženiji je rod *Streptomyces*. U ovom istraživanju istraživani rod *Streptomyces* nije potvrdio inhibicijski i antifungalni učinak na rast *F. graminearum* 110250, *F. graminearum* R5796, *F. verticilloides* M7075 i *F. verticilloides* M1325. No, ipak, aktinomicete, a posebice rod *Streptomyces*, zaslužuju punu pažnju istraživača. Slijedeća istraživanja bi trebala identificirati i druge vrste i sojeve roda *Streptomyces* kao potencijalne biološke izolate za suzbijanje uzročnika biljnih bolesti.

5. LITERATURA

1. Aghighi, S., Shahidi Bonjar, G. H., Rawashdeh, R., Batayneh, S., Saadoun, I. (2004): First report of antifungal spectra of activity of Iranian actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Asian Journal of Plant Sciences, 3(4), 463-471.
2. Arifuzzaman, M., Khatun, M. R., Rahman, H. (2010): Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. African Journal of Biotechnology, 9(29), 4615-4619.
3. Colombo, E. M., Kunova, A., Cortesi, P., Saracchi, M., Pasquali, M. (2019): Critical Assessment of Streptomyces spp. Able to Control Toxigenic Fusaria in Cereals: A Literature and Patent Review. International Journal of Molecular Sciences, 20(24), 6119.
4. Cvjetković, B. (2014): Upravljanje rizikom od mikotoksina počinje u polju. Glasilo biljne zaštite, 14(4), 317-328.
5. Ćosić, J., Ivezić, M., Štefanić, E., Šamota, D., Kalinović, I., Rozman, V., Liška, A., Ranogajec, Lj. (2008): Najznačajniji štetnici, bolesti i korovi u ratarskoj proizvodnji. Osječko-baranjska županija, Osijek, 64
6. Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2006.): Praktikum iz fitopatologije, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
7. Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2013): Fuzarijska palež klasova. Glasnik Zaštite Bilja, 36(4), 64-67.
8. de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., de Araújo, J. M. (2012): Antibiotics produced by Streptomyces. The Brazilian Journal of infectious diseases, 16(5), 466-471.
9. Domijan, A. M. (2013): Rezultati nedavnih studija o mehanizmu neurotoksičnosti fumonizina B1. Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme, 55(1), 25-33.
10. Dražavni zavod za statistiku (2019.): Statističke informacije. Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, Zagreb, 107
11. El-Shanshoury, A. E. R. R., El-Sououd, S. M. A., Awadalla, O. A., El-Bandy, N. B. (1996): Effects of Streptomyces corchorusii, Streptomyces mutabilis, pendimethalin,

- and metribuzin on the control of bacterial and Fusarium wilt of tomato. Canadian journal of botany, 74(7), 1016-1022.
12. Ennouari, A., Sanchis, V., Rahouti, M., Zinedine, A. (2018): Isolation and molecular identification of mycotoxin producing fungi in durum wheat from Morocco. Journal of Materials and Environmental Sciences, 9: 1470-1479
 13. FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (07.04.2020.)
 14. Getha, K., Vikineswary, S. (2002): Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 28(6), 303-310.
 15. Godena, S. (2011): Ekološko maslinarstvo. Izazov 21. stoljeća. Agronomski glasnik, 73(3), 165-178.
 16. Jung, B., Park, S. Y., Lee, Y. W., Lee, J. (2013): Biological efficacy of *Streptomyces* sp. strain BN1 against the cereal head blight pathogen *Fusarium graminearum*. The plant pathology journal, 29(1), 52.
 17. Kanini, G. S., Katsifas, E. A., Savvides, A. L., Karagouni, A. D. (2013): *Streptomyces rochei* ACTA1551, an indigenous Greek isolate studied as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. BioMed research international, 2013.
 18. Kanižai Šarić, G., Milaković, Z., Krstanović, V. (2011): Toksičnost *Fusarium* toksina. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 6(3-4), 112-116.
 19. Kanižai Šarić, G., Tkalec, M. (2011): Značajne mikotoksikogene gljive u poljoprivrednoj proizvodnji. Glasnik zaštite bilja, 34(4), 38-41.
 20. Nourozian, J., Etebarian, H. R., Khodakaramian, G. (2006): Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. Songklanakarin J. Sci. Technol, 28(Suppl 1), 29-38.
 21. Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z., Šegvić Klarić, M. (2008): Okratoksin ai zearalenon: kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme, 50(3), 147-159.
 22. Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2017.): Utjecaj postupaka prerade na transformaciju i smanjenje koncentracije mikotoksina u određenim skupinama hrane. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 12(1-2), 4-13.

23. Prapagdee, B., Kuekulvong, C., Mongkolsuk, S. (2008): Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. *International journal of biological sciences*, 4(5), 330–337.
24. Šarčević – Todosijević, Lj., Živanović, Lj., Petrović, B., Marinković, T., Popović, V. (2018): Brojnost i značaj aktinomiceta u zemljištu u fazi fiziološke zrelosti zrna kukuruza (*Zea mays L.*). U: Zbornik radova, XXIII Savetovanje u biotehnologiji
25. Tomasović, S. (1987): Fuzarioze pšenice s posebnim osvrtom na fuzarioze klasa (*Fusarium graminearum Schw.*). *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 49(4), 47-55.
26. Ursan, M., Boiu-Sicuia, O. A., Voaides, C., Stan, V., Bubueanu, C., Cornea, C. P. (2018): The potential of new *Streptomyces* isolates as biocontrol agents against *Fusarium* spp. In “Agriculture for Life, Life for Agriculture” Conference Proceedings (Vol. 1, No. 1, pp. 594-600). Sciendo.
27. Znaor, D. (1996.): *Ekološka poljoprivreda-poljopriveda sutrašnjice*. Nakladni zavod Globus. 467