

# Utjecaj mliječno kiselih bakterija na rast *Fusarium* sp. i *Penicillium* sp. na zrnu soje

---

**Vorgić, Pamela**

**Master's thesis / Diplomski 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:932179>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**



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

Pamela Vorgić,

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

**UTJECAJ MLIJEČNO KISELIH BAKTERIJA NA RAST *FUSARIUM SP. I*  
*PENICILLIUM SP.* NA ZRNU SOJE**

**Diplomski rad**

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Pamela Vorgić,

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

**UTJECAJ MLIJEČNO KISELIH BAKTERIJA NA RAST *FUSARIUM SP. I*  
*PENICILLIUM SP.* NA ZRNU SOJE**

**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, 2020.

## Sadržaj:

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature .....	3
2.1 Gljive roda <i>Penicillium</i> .....	4
2.2. <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	4
2.3. Gljive roda <i>Fusarium</i> .....	5
2.4. <i>Fusarium verticillioides</i> .....	6
2.5. Bakterije mliječne kiseline .....	7
2.6. <i>Lactobacillus spp.</i> .....	8
2.7. <i>Lactobacillus casei</i> .....	8
2.8. <i>Lactobacillus brevis</i> .....	9
2.9. Skladištenje zrna.....	11
3. Materijal i metode .....	13
3.1. Priprema podloga za uzgoj mliječnih bakterija .....	13
3.2. Priprema podloga za uzgoj gljiva .....	13
3.3 Postavljanje pokusa .....	14
4. Rezultati .....	17
5. Rasprava .....	19
7. Popis literature.....	23
8. Sažetak .....	28
9. Summary .....	29
10. Popis tablica.....	30
11. Popis slika.....	31
12. Popis grafikona .....	32

Temeljna dokumentacijska kartica

Basic documentation card

## 1. Uvod

Soja *Glycine max* (L.) Merrill, pripada u najstarije kulturne biljke, porijeklom iz Azije, više od četiri tisuće godina se uzgaja na tom području. Jednogodišnja je mahunarka i pripada redu *Fabaceae* ili *Leguminosae* (mahunarke ili lepirnjače), porodici *Fabaceae*, rodu *Glycine*, koja se danas na globalnoj razini ubraja među glavne bjelančevinaste i uljne kulture (Vratarić i Sudarić, 2000.).

Prema podacima Food and Agriculture Organization (FAO, 2018.) po proizvodnji u svijetu soja je na petom mjestu, nakon proizvodnje riže, pšenice, ječma i kukuruza. Prosječna proizvodnja soje u svijetu je 335 milijuna tona godišnje, a uzgaja se na nešto manje od 125 milijuna hektara (FAO, 2018.). Prema statističkim podacima FAO (2018.) Sjedinjene američke države su najveći proizvođači soje u svijetu, po površinama nakon njih slijedi Brazil, Argentina i Kina.

Prema podacima Državnog zavoda za statistiku Republike Hrvatske 2018. godine proizvodnja soje je iznosila 246 000 tona, a uzgaja se na 77 tisuća hektara. Prosječan prinos soje za 2018. godinu iznosio je 3,2 t/ha. Ekološka soja u 2018. godini se uzgajala na 2286 hektara, dok je proizvodnja na oranicama za tu godinu iznosila 5 594 tona soje.

Soja je važna kultura koja ima visoki sadržaj bjelančevina i ulja. Njezino zrno se koristi kao izvor jestivih ulja i bjelančevina za ishranu ljudi, stoke kao i za industrijske svrhe. Također se može koristiti kao cijela biljka za silažu, zelenu masu, sijeno, a dehidriranjem se dobivaju brikete, granule i zeleno brašno (Vratarić i Sudarić, 2008.).

Nadalje, isti autori navode kako je soja važna kultura u plodoredu zbog sposobnosti simbioze sa kvržičnim bakterijama *Bradyrhizobium japonicum* na korijenu koje obogaćuju tlo dušikom 40 – 60 kg/ha kroz proces biološke fiksacije dušika.

Kontaminacija usjeva gljivama uzrokuje štetu na soji uključujući nisku klijavost, nisku kvalitetu pečenja, omekšavanje i truljenje, te stvaranje patogena i alergena (Piotrowska i sur., 2013.). Prema Roy i sur. (2000.) najčešće vrste koje kontaminiraju sjeme soje, mahunu i cvijet pripadaju rodovima *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* i *Aspergillus*. Ćosić i sur. (2008.) navode kako su najčešći uzročnici bolesti zrna soje iz rodova *Fusarium sp.*, a prisutnost parazita u unutrašnjosti sjemena ili na površini može uzrokovati probleme prilikom klijanja i nicanja ili u kasnijim razvojnim fazama te u znatnoj mjeri utjecati na biološku vrijednost, kondiciju, vitalnost biljaka i prinos.

U ekološkoj poljoprivredi prema zakonima, određena kemijska i sintetička sredstva za zaštitu bilja su zabranjena, stoga zaraza soje gljivama *Fusarium* i *Penicillium* predstavlja problem za proizvođače. Stoga proizvođači koriste biološke metode zaštite. Cilj ovoga diplomskog rada bio je utvrditi antifungalni učinak izolata mliječno kiselih bakterija roda *Lactobacillus* na rod *Fusarium sp.* i *Penicillium sp.* na zrnju soje.

## 2. Pregled literature

Gljive pripadaju u skupinu organizama koja obuhvaća približno 250 000 vrsta. U ovu skupinu organizama pripadaju kvasci, plijesni te mesnate gljive (Duraković i Redžepović, 2002.). Gljive učestvuju u razgradnji organskih tvari u prirodi zajedno s bakterijama. U prehrambenoj industriji se koriste brojne vrste gljiva i bakterija.

Na tvarima s vrlo malim sadržajem vode može rasti većina gljiva, one iskorištavaju složene ugljikohidrate, odnosno lignin, koji im omogućuje rast u različitim uvjetima sredine i na različitim supstratima, također većina gljiva može rasti i u okolišu s visokom koncentracijom šećera ili soli (Duraković i Duraković, 2003.).

Gljive mogu smanjiti kvalitetu usjeva, uskladištene usjeve ili uništiti usjeve na polju (Munoz, 2010.). Najčešće izolirane gljive koje uzrokuju ove štete su iz rodova *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* i *Claviceps* (Munoz, 2010). Osim toga mnoge vrste mogu proizvoditi i mikotoksine, oni nastaju kao sekundarni metaboliti plijesni, a uzrokuju bolesti kod ljudi i životinja, unose se putem hrane, udisanjem i preko kože (Munoz, 2010.). Mikotoksini su spojevi niske molekularne mase, ne sudjeluju u primarnom metabolizmu plijesni i nemaju određenu metaboličku funkciju pri njihovom rastu i razvoju (Delaš i sur., 1995.). Yiannikouris i Jouany (2002.) navode kako biosintezu mikotoksina (sekundarnih metabolita gljiva) mogu stimulirati uvjeti u okolišu, kao što su količina slobodne vode -  $a_w$ , temperatura, koncentracija kisika i pH supstrata, odnosno fizikalno-kemijski parametri.

Gljive kontaminanti žitarica i uljarica važne su za procjenu potencijalnog rizika kontaminacije mikotoksinima (Piotrowska i sur., 2013.). Znatno broje mikotoksina je kancerogen i uzrokuje razna oboljenja. U konvencionalnoj poljoprivredi za nadzor fungalnog rasta koriste se kemijska sredstva, a u ekološkoj poljoprivredi provodi se upotrebom eteričnih ulja, masnih kiselina i biopreparata.

Legan (2000.) navodi kako se gljivična mikroflora mijenja tijekom sušenja i skladištenja nakon žetve. Gljive koje su prisutne tijekom vegetacije, a prilagođene su visokim vlažnostima i ne preživljavaju tijekom sušenja i skladištenja, a zamjenjuju ih gljive koje su prisutne kod skladištenja.

## 2.1 Gljive roda *Penicillium*

Rod *Penicillium* pripada redu *Eurotiales*, razredu *Eurotiomycetes* u pododjelu *Ascomycotina* (Houbraken i Samson, 2011.). Ako je poznat nespolni stadij, on pripada pododjelu *Deuteromycotina* (Duraković i Duraković, 2003.). Frisvad i Samson (2004.) navode kako se *Penicillium* često nalazi na različitim staništima u tlu, na vegetaciji i zraku. Može se također naći u zatvorenom okruženju i u raznim prehrambenim proizvodima. U prirodi je njegova glavna funkcija razgradnja organskih materijala, a uzrokuje truleži kao patogen prije i poslije skladištenja usjeva. Duraković i Duraković (2003.) navode kako su to mezofilne gljive koje rastu između 5 – 37 °C, optimalna temperatura rasta se kreće od 20 – 30 °C, a pH 3 - 4,5. Na temperaturi od 23 °C i pH od 3 – 4,5 se postiže maksimalni *in vitro* rast. To je gljiva koja favorizira umjerene i hladne klime. Frisvad i sur. (2004.) navode kako *Penicillium* vrste također proizvode sekundarne metabolite od kojih su neki mikotoksini.

## 2.2. *Penicillium chrysogenum*

Houbraken i sur., (2011.) navode kako je *Penicillium chrysogenum* plijesan koji se često pojavljuje u zatvorenom okruženju i hrani. Ove plijesni mogu se nalaziti u namirnicama i u krmi, zbog toga mogu biti opasne za zdravlje ljudi i životinja (Duraković i Duraković, 2003.).

Reiss (1977.) navodi kako *P. chrysogenum* proizvodi citrinin na kruhu od cjelovitog zrna pšenice i pšeničnim klicama, integralnom kruhu s lanenim sjemenkama, raženom kruhu sa zdrobljenom pšenicom i raženom kruhu sa pšeničnim brašnom. Najveći porast citrinina, pronađen je u kruhu od cjelovitog zrna pšenice bili su u rasponu od 0,2 – 0,4 µg/g kruha. Optimalne temperature za rast i stvaranje citrinina bile su 30°C odnosno 25°C.

Rokefortin C, prvi je puta izoliran iz *Penicillium roqueforti*, a kasnije i iz drugih *Penicillium* vrsta koje rastu na kontaminiranom krmivom zrnu, luku, pivu i vinu. Kontaminacija hrane i hrane za životinje rokefortinom C je važan zbog neurotoksičnosti ovog mikotoksina (Wagener i sur., 1980.).

Estrada i sur., (2010.) navode kako je u početnom eksperimentu u laboratoriju *P. chrysogenum* NRRL 1951 i njegov derivat Wisconsin 54-1255 proizvode roquefortin C i meleagrin. Prirodni soj *P. chrysogenum* proizvodi osim roquefortina C i male količine roquefortina D (Vinokurova i sur., 2003.). *P. chrysogenum* proizvodi i PR-toksin



(*Penicillium roqueforti* toksin) (Frisvad i sur., 2004.). Silaža i prehrambeni proizvodi obogaćeni PR-toksinom mogu dovesti do oštećenja vitalnih unutarnjih organa, probavnih smetnji, karcinogenosti, imunotoksičnosti, nekroze i inhibicije enzima. Također ima značajan mutageni potencijal da poremeti ili promjeni ključne procese poput replikacije DNK, transkripcije i translacije na molekularnoj razini. Brza konverzija PR toksina u ostale derivate, kao što su PR imin, PR amid i PR kiselina, na temelju raspoloživih uvjeta odražava njihovu nestabilnost i razgradne aspekte. Kontaminacija silaže, žitarica ili drugih proizvoda hrane ili hrane za životinje PR-toksinom velika je opasnost za zdravlje ljudi i životinja zbog svojih svojstava da u relativno malim dozama izazivaju štetne efekte toksičnosti (Sumrah i sur., 2005.).

Neki sojevi *P. chrysogenum* proizvode sekalonsku kiselinu D i F. Sekalonska kiselina pripada klasi mikotoksina koji su u početku izolirani kao glavni ergot pigmenta gljive *Claviceps purpurea* koja parazitira raž. U srednjem vijeku u Europi dovelo je do masovnih trovanja poznatih kao ergotizam, koji su uzrokovani toksičnim alkaloidima ergota odnosno onečišćenja brašna *C. purpurea* (Frisvad i sur., 2004.).

### **2.3. Gljive roda *Fusarium***

Zbog velike sposobnosti prilagođavanja različitim agroklimatskim uvjetima i okolišu rod *Fusarium* je rasprostranjen u svim dijelovima svijeta (Ćosić i sur., 2004.). U ekonomski najznačajnije gljive pripada rod *Fusarium*, on obuhvaća popriličan broj vrsta od kojih su neke vrste saprofitske, a neke vrste su fakultativni paraziti te napadaju velik broj korovnih i kultiviranih biljnih vrsta (Ćosić i sur., 2006.). Mnoge vrste ovoga roda mogu uzrokovati bolesti kod ljudi i životinja. Veliki broj *Fusarium* vrsta još uvijek je slabo ili vrlo slabo istražen kao i njihova rasprostranjenost i ekologija (Leslie i Summerell 2006.)

Rod *Fusarium* pripada u globalne fitopatogene, koji može umanjiti kvalitetu i prinose te također ugroziti poljoprivredne proizvođače, ali i izazvati poskupljenje prehrambenih proizvoda brašna i kruha. Osim financijskog rizika za proizvođače i potrošače, postoji i zdravstveni rizik za sve potrošače žitarica.

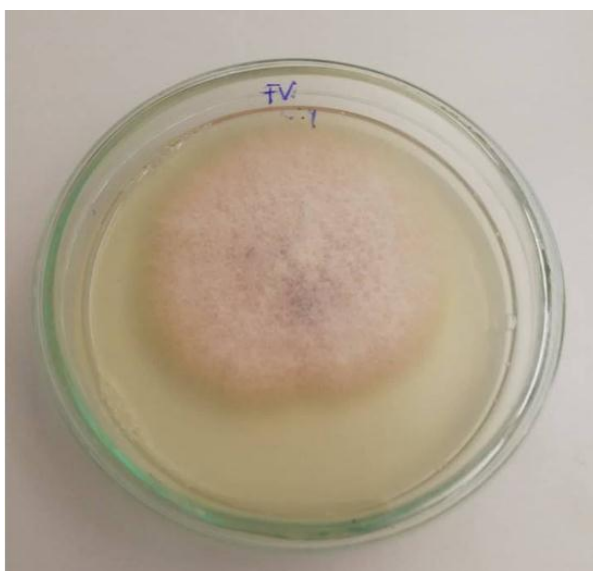
Ovi fitopatogeni imaju sposobnost akumulacije u zrnu žitarica mikotoksina otrovnih produkata svoga metabolizma, posebice trihotecena, fumonizina i zearalenona koji mogu

izazvati bolesti kod ljudi i životinja ako konzumiraju takvu hranu (Kanižai Šarić i sur., 2011.).

#### 2.4. *Fusarium verticillioides*

Vrsta *Fusarium verticillioides* je rasprostranjena širom svijeta te napada mnoge biljne vrste, a značajne štete nanosi kukuruzu kojem uzrokuje truljenje stabljike i klica, a rezultat je značajni gubitak prinosa i smanjenje kakvoće zrna. Vrijeme i način infekcije utječu na intenzitet bolesti i na vrijeme otkrivanja simptoma (Leslie i Summerell 2006.).

Burgess i sur. (1994.) navode kako *F. verticillioides* (Slika 1) izaziva i trulež stabljike i korijena šećerne trske i truljenje glave kod šparoga. *F. verticillioides* i srodne vrste kao što su *F. proliferatum* proizvode fumonizine u kukuruzu i šećernoj trski.



Slika 1. Čista kultura *Fusarium verticillioides*

Izvor: Autor

Predstavnici roda *Fusarium* su uzročnici i bolesti soje i to: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum* i *Fusarium solani* (Yang i sur. 2001.). Ivić i sur. (2009). navode kako kontaminacija sjemena *Fusarium* vrstama iznosi od 5% do 69% za pšenicu, od 25% do 100% za kukuruz, od 4% do 17% za soju. Dominantne vrste bile su *F. graminearum* na pšenici

(27% izolata), *F. verticillioides* na kukuruзу (83% izolata) i *F. sporotrichioides* na soji (34% izolata). Istraživanje je pokazalo da je rizik od kontaminacije *Fusarium* toksinima veći za kukuruz i pšenicu nego za soju.

Ćosić i sur. (2003.) u svojem istraživanju kroz sedam godina i na deset lokacija u Savoniji prikupljali su uzorke pšenice i kukuruza. Iz uzoraka pšenice je izolirano 1169 izolata od kojih je čak 9 *Fusarium* vrsta, a 894 izolata s kukuruza, a šest *Fusarium* vrsta. *F. graminearum* je prevladavao na svim dijelovima biljke pšenice i stabljike kukuruza i ostacima korijena. Dok je *F. moniliforme* prevladavao na zrnima i stabljikama kukuruza. U Hrvatskoj je prvi puta izoliran i određen *F. sporotrichioides*.

Mikotoksini se mogu razviti u gotovo svoj stočnoj hrani tijekom vegetacijske sezone u žetvi ili tijekom skladištenja (Peraica i sur., 1999.). Hladno i vlažno vrijeme pogoduje njihovom stvaranju (Peraica i sur., 1999.). Fumonizini su prvi puta opisani i okarakterizirani kao mikotoksini tek 1988. godine (Peraica i sur., 1999.). Proizvode ih plijesni roda *Fusarium*. Najčešći proizvođači fumonizina su *F. verticillioides* i *Fusarium proliferatum*. S toksikološke strane najznačajniji je fumonizin B1 (Peraica i sur., 1999.). Fuminozin B1 je najpoznatiji i najproučavaniji od fuminozina, ali poznati su i drugi derivati (Leslie i Summerell, 2006.) Najbolja sinteza fumonizina B1 utvrđena je na zrnima kukuruza koji je sadržavao od 27% do 32% vlage i pri temperaturi od 20°C (Bars i sur., 1994.). Kod konja fumonizini uzrokuju leukoencefalomalaciju, a plućni edem kod svinja (Leslie i Summerell, 2006.). IARC, (2002.) navodi kako postoji veza između fuminozina i karcinoma jednjaka kod ljudi. Defekte neuralne cijevi također mogu uzrokovati fuminozini kod pokusnih životinja, pa se to stavlja u kontekst klastera slučajeva anencefalije i spine bifide u južnom Teksasu (slučajevi iz sredine 1990-ih godina), a uzrokom se smatra kontaminirani kukuruz fumonizinima (IARC, 2002.). IARC je svrstala fumonizine u skupinu 2B; mogućih karcinogena za ljude (IARC, 2002.).

## **2.5. Bakterije mliječne kiseline**

Bakterije mliječne kiseline su važni mikroorganizmi za industriju jer se primjenjuju kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda (Kos i sur., 2008.). To su gram-pozitivne bakterije (s niskim sadržajem gvanina i citozina u molekuli DNA) koje su prirodno prisutne na supstratima bogatim hranjivim tvarima poput mlijeka, mesa, razgrađenog biljnog materijala te u ljudskom gastrointestinalnom sustavu (Đukić, 2009.).

Obuhvaćaju 20 rodova: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Weisella*, *Dolosigranulum*, *Alloiococcus*, *Globicatella*, *Atopobium* *Actinomyces* (Pandžić, 2017.). Bakterije mliječne kiseline čine normalnu mikrofloru mlijeka, one se uvijek nalaze u mlijeku i mliječnim proizvodima. Po fiziološkim osobinama bakterije mliječne kiseline mogu biti tipične (proizvode prvenstveno mliječnu kiselinu kod fermentacije mliječnog šećera, 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.). Bakterije mliječne kiseline koriste se kod proizvodnje nekih sireva i fermentiranih mliječnih proizvoda, zbog toga se ubrajaju u korisne bakterije. Mogu se nalaziti i u moštu, na grožđu, pivu i vinu (Pandžić, 2017.).

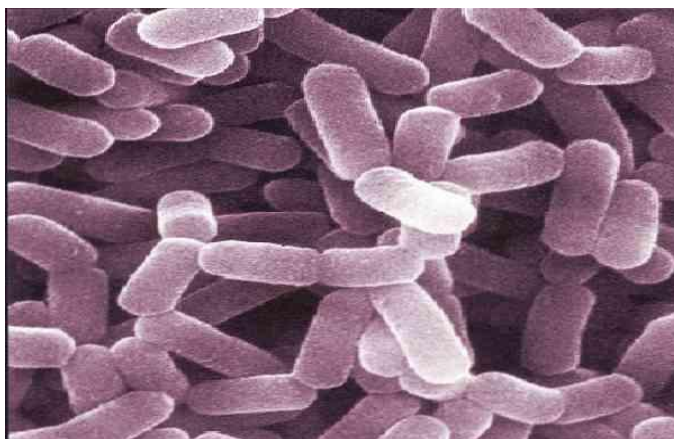
Huang i sur., (2016.) ističu važnost probiotika koji su ispitani zbog njihovog potencijala kao dodatna terapija i kao mikrobna terapija raka.

## **2.6. *Lactobacillus* spp.**

Dio grupe bakterija mliječne kiseline su i *Lactobacillus* bakterije. One kroz mliječno kiselu fermentaciju pretvaraju šećer u mliječnu kiselinu u organizmu (Makarova i sur., 2006.). Rod *Lactobacillus* je najbrojniji s oko 80 vrsta. Vrste koje pripadaju ovom rodu su *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus debrueckii*, *Lactobacillus viridiscens* i *Lactobacillus xylosus* (Marković, 1990.). *Lactobacillus* su asporogene, aerobne ili fakultativno anaerobne bakterije, a proizvode mliječnu kiselinu (Presečan, 2010.).

## **2.7. *Lactobacillus casei***

*Lactobacillus casei* (Slika 2.) sadrži brojne sojeve s dokazanom probiotičkom aktivnošću (Buriti i Saad, 2007.). Probiotici su definirani kao živi mikroorganizmi koji kada se konzumiraju u odgovarajućoj količini, pružaju zdravstvenu korist domaćinu (Hill i sur., 2014.). Može djelovati i kao antibiotik u kombinaciji sa drugim probioticima (McFarland, 2009.).



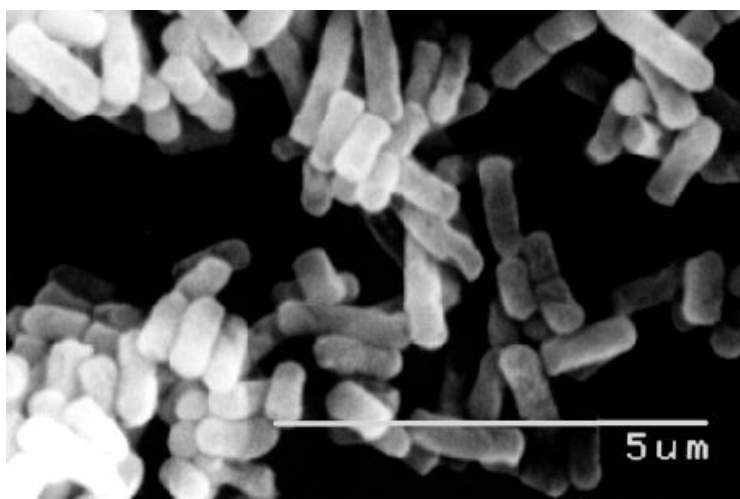
Slika 2. *Lactobacillus casei* (Izvor:

<https://hr.thpanorama.com/articles/biologa/lactobacillus-casei-charactersticas-taxonoma-morfologa-beneficios.html>

Bakterije mliječne kiseline tijekom fermentacije i rasta proizvode znatne količine organske kiseline, a one djeluju inhibicijski na rast i razmnožavanje mikroorganizama (Brkić, 1995.). Osobina *L. casei* je također da proizvodi bakteriocin zbog toga ima dodatno antimikrobno djelovanje (Koninsky, 1982.). Bakteriocini se ne klasificiraju kao antibiotici oni su različiti po brojnim karakteristikama, iako imaju antibiotska svojstva. Antibiotici su sekundarni metaboliti, a bakteriocini se sintetiziraju na ribosomima tijekom lag faze rasta, to su mali peptidi (Chen i Hoover, 2003.).

### **2.8. *Lactobacillus brevis***

*L. brevis* (Slika 3.) je bakterija mliječne kiseline, izolirana iz silaže, kao i iz fermentiranog kupusa i ostale fermentirane hrane (Makarova i sur., 2006.).



Slika 3. *Lactobacillus brevis*

(Izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Lactobacillus-brevis-cells-at-3-days-in-MRS-The-cellular-wall-is-intact-Magnification-x\\_fig1\\_228486256](https://www.researchgate.net/figure/Lactobacillus-brevis-cells-at-3-days-in-MRS-The-cellular-wall-is-intact-Magnification-x_fig1_228486256))

Dokazana su antifungalna svojstva mliječno kiselih bakterija. Hassan i Bullerman (2008.) u svojem istraživanju antifungalne aktivnosti *Lactobacillus paracasei* izoliranim iz tradicionalne kulture kruha od kiselog tijesta je potpuno inhibirao rast *F. poliferatum* i *F. graminearum* u tekućem okruženju.

Florianowicz (2001.) u svojem istraživanju antifungalne aktivnosti jedanaest odabranih bakterijskih kultura i pet gljivica u različitim fazama njihova rasta istražena je s obzirom na njihovu aktivnost protiv *Penicillium expansum*. Rezultati pokazuju da su tri soja roda *Lactobacillus*: *L. casei*, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* i *Lactobacillus lactis* ssp. *cremoris* su aktivni protiv *P. expansum*.

U svom preglednom radu Schnürer i Magnusson (2005.) istraživanjima potvrđuju učinkovitost u suzbijanju širenja gljiva sa bakterijama mliječne kiseline. Zaključili su kako su bakterije mliječne kiseline u suzbijanju širenja gljiva nedovoljno istražene. Također navode kako je nužno izvršiti dodatna istraživanja s ciljem pronalaska najefikasnijih rješenja za primjenu navedenih mikroorganizama u prevenciji širenja gljiva.. Mnoga istraživanja se baziraju na antifungalnom učinku bakterija mliječne kiseline, ali ne i drugim uzrocima koji su zaslužni za inhibitornu aktivnost i produkte njihova metabolizma. Nekoliko je istraživanja dokazalo da osim organskih kiselina bakterije mliječne kiseline proizvode i antifungalne peptide, odnosno proteine.

Magnusson i sur. (2003.) proveli su opsežno istraživanje bakterija mliječnih kiselina sa više od 1200 izolata i njihova učinka kao antigljivičnog preparata. istraživanje je pokazalo kako 10 % izolata ima aktivnosti koje mogu zaustaviti širenje gljiva, dok je 4 % njih pokazalo snažnu aktivnost protiv gljiva.

## **2.9. Skladištenje zrna**

U skladištu sjeme soje provede oko 7-8 mjeseci odnosno od žetve do iduće sjetve. Tijekom skladištenja sjemena dolazi do postepenog starenja, ali i do oštećenja sjemena što utječe na kvalitetu sjemena soje (Vratarić i Sudarić, 2008.). Milošević i Malešević (2004.) navode kako očuvanje biološke vrijednosti odnosno klijavosti u skladištu utječe niz čimbenika kao što su, temperatura skladišnog prostora, vlaga skladišnog prostora i sjemena, nasljedna svojstva sjemena i kvaliteta sjemena. Volenik i sur. (2007.) navode kako je najbitniji čimbenik za očuvanje dugovječnosti sjemena i očuvanje zdravog sjemena je sadržaj vlage u zrnu.

Vratarić i Sudarić (2008.) navode kako gljive mogu zaraziti sjeme prije žetve u polju i na taj način umanjiti kvalitetu sjemena. Piotrowska i sur. (2013.) navode kako skladišne plijesni kontaminiraju žitarice nakon žetve i tijekom skladištenja. Na rast plijesni utječe niz različitih čimbenika, zbog toga treba promišljati o vremenu žetve s obzirom na vlagu zrna i osigurati najpovoljnije uvjete tijekom skladištenja. Neprikladna obrada i upravljanje sjemenom također može doprinjeti rastu plijesni.

Vratarić i Sudarić (2008.) navode kako za razvoj skladišnih plijesni pogoduje viša relativna vlaga i viša temperatura zraka u skladištu. Mislivec i Bruce (1977.) navode kako se kontaminacija plijesni *P. chrysogenum* češće nalazi na površini soje koja nije površinski dezinficirana, a rijetko kod soje koja je površinski dezinficirana. Posljedice kontaminacije plijesni na žitaricama i uljaricama su niska klijavost, niska kvaliteta pečenja, diskoloracija, neuobičajeni okusi, omekšavanje i truljenje (Vratarić i Sudarić, 2008.). Osim ovih posljedica Vratarić i Sudarić (2008.) navode i zagrijavanje sjemena, biokemijske promjene, gubitak mase i proizvodnju mikotoksina.

Milner i Gedes (1946.) u svojem istraživanju izvještavaju o naglom porastu temperature i proizvodnja CO<sub>2</sub> uslijed širenja plijesni pri čemu su izmjerene temperature od 50 do 55 °C,

nakon toga došlo je do pada temperature. Uslijed ovog procesa sjeme oksidira te ponovno raste temperatura i CO<sub>2</sub>, zbog čega dolazi do zapaljenja.



### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Priprema podloga za uzgoj mliječnih bakterija

U ovom diplomskom radu rađen je pokus u kojem su korištene mliječno kisele bakterije *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus brevis* iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju i zemljišne resurse Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Bakterije su nacijepljene u MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) (Merck, Njemačka) tekuću podlogu pri 37 °C kroz 48 h.

#### 3.2. Priprema podloga za uzgoj gljiva

Antifungalna aktivnost je testirana na čistim kulturama: *Fusarium verticilloides* M-7075 (Fusarium Research Center, Department of Plant Pathology, Penn State University, SAD) i *Penicillium chrysogenum* iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju i zemljišne resurse Fakulteta Agrobiotehničkih znanosti Osijek. Umnožene su čiste kulture gljiva na krumpir-dekstroznom agaru (Biolife, Italija) na temperaturi od 25°C±1°C tijekom sedam dana.



Slika 4. Razlijevanje podloga u petrijeve zdjelice (Izvor: Autor)



Slika 5. Nacjepljivanje gljiva (Izvor: Autor)

### 3.3 Postavljanje pokusa

Cjelokupni postupak odrađen je u sterilnim uvjetima, a korišten pribor i podloge su sterilizirani u autoklavu (INKO). Sjeme soje proizvedeno je na ekološkom poljoprivrednom gospodarstvu „Eko-Jazo d.o.o.“ koje je korišteno u pokusu i služilo je kao prirodan supstrat za ispitivanje antifungalne djelotvornosti ispitivanih sojeva bakterija mliječnih kiselina. Zrno soje je izvavano u količini od 10 g (Slika 6.) u petrijeve zdjelice i sterilizirano. Potom je zrno soje nakvašeno s ispitivanim sojevima mliječno-kiselih bakterija (Slika 7.) u trajanju od 8 h na sobnoj temperaturi. Broj bakterija određen je po McFarland standardu i sadržavalo je  $3 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$  stanica. Kontrole su tretirane sa 10 ml sterilne vode. Nakon 8 h sati kvašenja na sobnoj temperaturi izvršena je inokulacija s micelijskim diskom ispitivanih čistih kultura plijesni uzetog s rubova kolonije promjera 4 mm u sredinu ploče (Slika 8.).



Slika 6. Vaganje sjemena soje (Izvor: Gabriella Kanižai Šarić)



Slika 7. Tretiranje sjemena mliječno kiselim bakterijama (Izvor: Gabriella Kanižai Šarić)

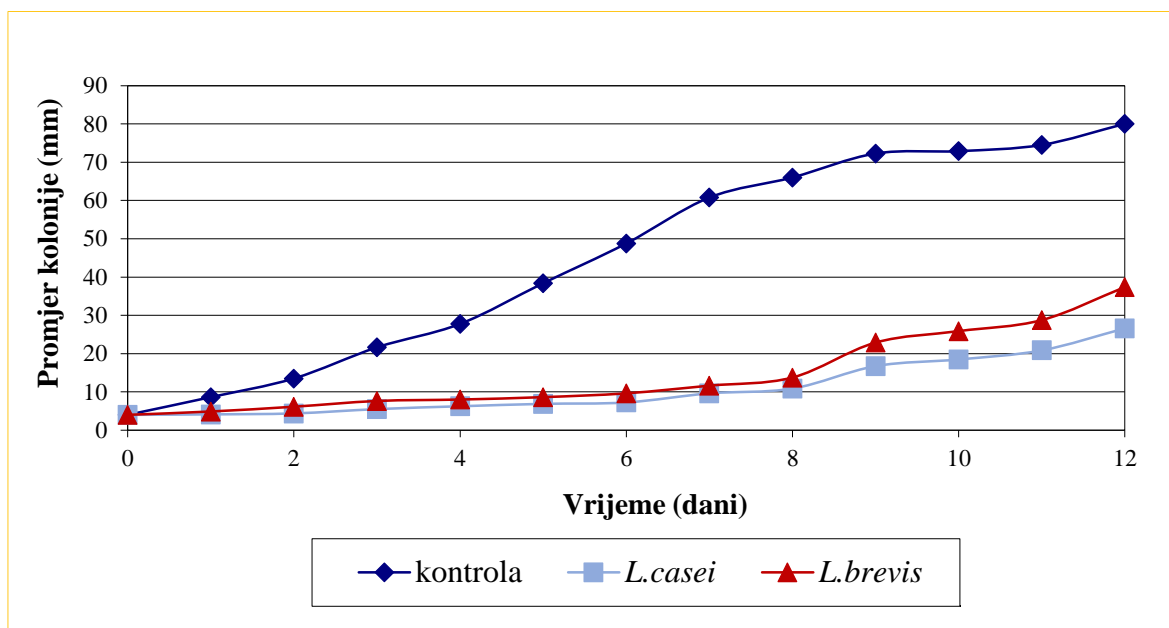


Slika 8. Inokulacija micelijskim diskom (Izvor: Gabriella Kanižai Šarić)

Petrijeve ploče su inkubirane u četiri ponavljanja na  $30^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  u laboratorijskom termostatu (Termo Medicinski aparati, BTS-M). Izolati mliječno kiselih bakterija nisu sadržavale kontrolne probe. Praćen je porast plijesni izmjeravanjem dva promjera kolonije pod pravim kutom, svakodnevno u periodu od 14 dana.

Rezultati su se statistički analizirali tako da su se razlike između stope rasta testiranih izolata bakterija mliječne kiseline i kontrole testirane sa Studentovim t-testom. U statističkoj analizi podataka korišteni su Microsoft Excel (2013.) i Statistica 13.3 (Dell Inc. 2017.).

## 4. Rezultati



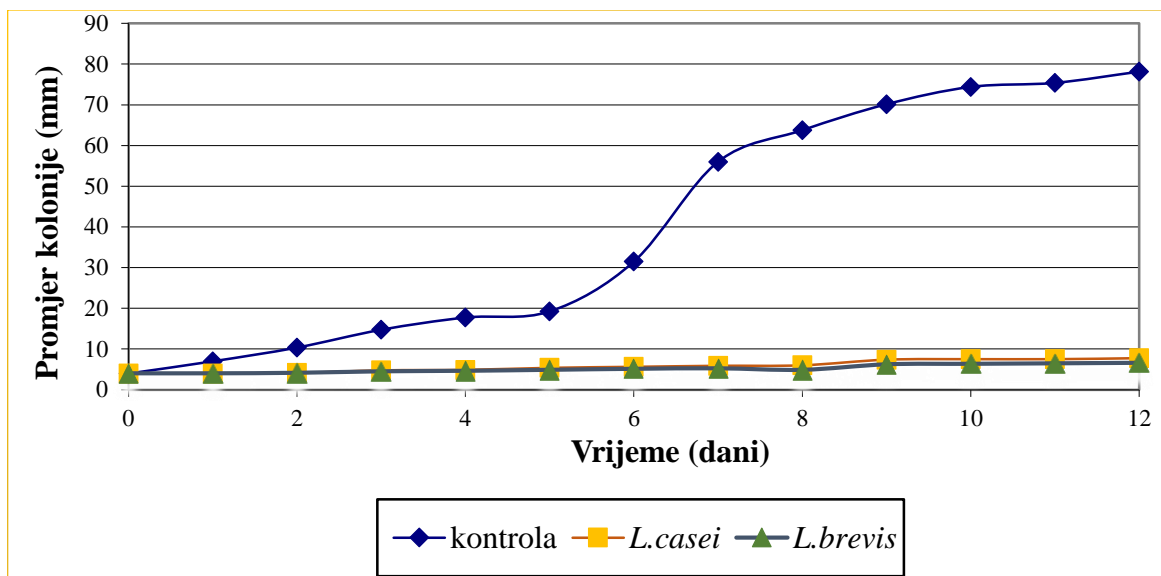
**Grafikon 1.** Rast *Fusarium verticillioides* uz *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus brevis*

**Tablica 1.** Utjecaj mliječno kiselih bakterija na rast *Fusarium verticillioides*

Mliječno kisele bakterije	stopa rasta (mm/dan)	p
kontrola	3,77	
<i>Lactobacillus casei</i>	0,91	0,000229**
<i>Lactobacillus brevis</i>	1,21	0,001016**

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

U Grafikonu 1. i Tablici 1. je prikazan micelijski rast odnosno dnevna stopa rasta *F. verticillioides* koji je tretiran s *L. casei* i *L. brevis* u odnosu na kontrolu.



**Grafikon 2.** Rast *Penicillium chrysogenum* uz *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus casei*

**Tablica 2.** Utjecaj mliječno kiselih bakterija na rast *Penicillium chrysogenum*

Mliječno kisele bakterije	Stopa rasta (mm/dan)	p
Kontrola	3,35	
<i>Lactobacillus casei</i>	0,48	0,000326**
<i>Lactobacillus brevis</i>	0,43	0,000270**

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

U Grafikonu 2. i Tablici 2. je prikazan micelijski rast odnosno dnevna stopa rasta *P. chrysogenum* koji je tretiran s *L. casei* i *L. brevis* u odnosu na kontrolu.

## 5. Rasprava

U *in vivo* istraživanju utvrđena je statistički vrlo značajna antifungalna djelotvornost *L. casei* ( $p < 0,01$ ) i *L. brevis* ( $p < 0,01$ ) (Tablica 1.) pri čemu je utvrđeno smanjenje stope rasta *Fusarium verticillioides* za 67-75 % u odnosu na kontrolu (Grafikon 1.). Jednako uspješno inhibira micelijski rast *L. casei* i *L. brevis* na *P. chrysogenum*, za 86-87% (Grafikon 2.), što je statistički značajno ( $p < 0,01$ ) u usporedbi s kontrolom (Tablica 2.).

Gljivična oboljenja na biljkama je teško kontrolirati, pogoduje im visoka temperatura i visoka vlažnost, stoga je u ljetnim mjesecima njihova pojavnost veća. Shah i sur (1992.) u svome radu navode kako su ekstrakti sjemenki *Argemone mexicana* L. uklonile većinu gljivica na mletačkom grahu, koji spada u porodicu mahunarki kao i soja.

Kritzinger i sur. (2002.) navode kako se protiv gljive *P. chrysogenum* mogu koristiti esencijalna ulja timijana, peperminra i dr. Rathod i Pawar (2012.) navode kako su najčešće izdvojene gljive na soji *P. chrysogenum*, *Aspergillus*, *Fusarium* za čije se suzbijanje mogu koristiti ekstrakti lišća medicinskog bilja *Polyalthia longifolia* Thw., *Allium sativum* L. i *Azadirachta indica* A. Juss.

Krishnamurthy i sur. (2008.) istraživali su inhibicijski utjecaj različitih prirodnih proizvoda na rast *Aspergillus flavus*. Neem torta, kaptan, listovi praha indijskog ginsenga i dr. pokazali su inhibicijski učinak i alternativu u korištenju kemijskih fungicida. Tretmani su održali veliki postotak klijanja sjemena soje u razdoblju od 6 mjeseci tijekom skladištenja.

Različiti autori israživali su različite vrste bakterija mliječne kiseline tako Saladino i sur. (2016) navode kako bakterije mliječne kiseline koje su pokazale antifungalno djelovanje protiv *P. expansum* i *Aspergillus parasiticus* korištene su u fermentaciji kruha s kvascem zbog promatranja smanjenja rasta gljivica i aflatoksina koji je kontaminiran sa *A. parasiticus*. Rezultati su pokazali smanjenje aflatoksina i produženje roka trajanja kruha za 3-4 dana.

Čvek i sur. (2010.) u svom radu istraživali antifungalno djelovanje izolata bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* K1 na rast plijesni *Aspergillus ochraceus*. Rezultati su pokazali da suspenzija stanica bakterije *L. plantarum* K1 značajno inhibira rast plijesni tijekom prvih 14 dana inkubacije, dok supernatant fermentirane hranjive podloge pokazuje dobar inhibitorni utjecaj na rast plijesni kroz duži period inkubacije.

Russo i sur. (2016.) ispitali su antifungalno djelovanje osamdeset i osam sojeva *L. plantarum* protiv *P. chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* i dr. Soj *L. plantarum* UFG 121 je pokazao jako antifungalno djelovanje. Uzorci koji su sadržavali ovaj soj bakterije mliječne kiseline imali su izvrsne učinke kao bio konzervansa za piće na bazi zobi. Sorentino i sur. (2013.) su utvrdili antifungalnu učinkovitost kulture *L. plantarum* u odnosu na 11 *Penicillium* rodova izoliranih s crnog tartufa na temperaturi skladištenja tartufa (4° C). Ova antifungalna učinkovitost je utvrđena i protiv *Penicillium digitatum*, DSM 2750 uzročnika zelene plijesni tartufa.

Laitila i sur., (2002) u svojem istraživanju antifungalne aktivnosti dva soja *L. plantarum* protiv *Fusarium* plijesni *in vitro* u ječmenom sladu, ukazuju na to da ovi sojevi s poznatim i odabranim karakteristikama se mogu koristiti kao prirodno, visokokvalitetno sredstvo za biokontrolu za upravljanje problemima uzrokovanim gljivama *Fusarium* tijekom klijanja žitarica.

Antifungalnu djelotvornost bakterija mliječne kiseline potvrdila su brojna istraživanja. Kanižai Šarić i sur. (2017.) ispitali su antifungalni učinak djelotvornosti mliječno kiselih bakterija u *in vitro* istraživanju na rast plijesni roda *Fusarium*. Utvrdili su da *L. brevis* reducira micelijski rast plijesni *Fusarium verticillioides* i *Fusarium graminearum*, te redukciju rasta *F. graminearum* uz djelovanje *L. casei*.

Hongjuan i sur. (2014.) ispitali su antifungalnu aktivnost i učinak *L. casei* na morfologiju micelija i ultrastrukturu *P. chrysogenum*, te su rezultati pokazali da *L. casei* inhibira rast *P. chrysogenum*, također su uočene morfološke karakteristike *P. chrysogenum*, vrh hife bio je deformiran i imao je moniliformni oblik i micelij je izgledao prozirno. Rezultati su pokazali visoku antifungalnu aktivnost ovog bakterijskog soja.

Antifungalnu djelotvornost bakterija mliječne kiseline istražili su Laref i Guessas (2013.) na rodove *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Trichoderma spp.* i *Stemphylium spp.*, u tekućoj hranjivoj podlozi za vrijeme i poslije sedam dana uzgoja nije zabilježen rast gljiva, bakterije mliječne kiseline su pokazale antifungalan učinak. Inhibitorna aktivnost se nije promijenila niti grijanjem, hlađenjem niti zamrzavanjem uzoraka.

Kivanc i Kovanci (2017.) istraživali su antifungalno djelovanje 45 bakterija mliječnih kiselina koje su izolirane iz fermentiranih proizvoda protiv *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus parasiticus* i dr. Samo 9 izolata je pokazalo antifungalnu



učinkovitost protiv jedne ili više vrsta plijesni. *L. brevis* KL7 je inhibirao *P. chrysogenum* i *A. parasiticus* za 5 dana.

U ekološkoj poljoprivredi važna je primjena sredstava za tretiranje samog sjemena, osim financijskog rizika koji mogu uzrokovati *P. chrysogenum* i *F. verticillioides*, također je važnije očuvati zdravlje ljudi i životinja.

## 6. Zaključak

U proizvodnji, preradi, transportu i skladištenju hrana osjetljiva je na kontaminaciju plijesnima. Pretpostavka je da se 5 do 10 % ukupne hrane baci zbog kontaminacije gljivama (Munoz, 2010.). Problem zaraze gljivama nije prisutan samo u svijetu nego i u poljoprivredi Republike Hrvatske. Pojedini rodovi gljiva pripadaju u globalne fitopatogene koji mogu izazvati velike štete za proizvođače, zdravlje ljudi i životinja. *Penicillium* kontaminira suhe namirnice, začine, suhe žitarice, svježe voće i povrće, dok *Fusarium* najviše kontaminira kukuruz, šećernu trsku i šparoge. Prije ili poslije žetve, te pri neadekvatnom skladištenju može doći do zaraze ovim gljivama. Stoga se one mogu naći u hrani koju konzumiramo, kao i njihovi mikotoksini.

Suvremena proizvodnja hrane zahtjeva što manju upotrebu kemijskih sredstava koja se može postići i primjenom biopreparata. Oni se koriste u ekološkoj poljoprivredi, prirodnog su podrijetla, u potpunosti su biorazgradivi, ne narušavaju zdravlje potrošača i ne zagađuju ekosustave.

Rezultati provedenog istraživanja potvrdili su antifungalni učinak izolata mliječno kiselih bakterija. *L. brevis* i *L. casei* značajno inhibiraju micelijski rast rodova *Fusarium verticillioides* i *Penicillium chrysogenum* na supstratu soje. Utvrđeno je da za kontrolu rasta plijesni bakterije mliječne kiseline imaju veliki potencijal u zaštiti usjeva protiv fitopatogena kao i na njihovu primjenu u biološkoj metodi zaštite usjeva u ekološkoj poljoprivredi.

## 7. Popis literature

1. Bars, L.J., Bars, L.P., Dupuy, J., Boudra, H., Cassini, R. (1994.): Biotic and abiotic factors in fumonisin B1 production and stability, *Journal of AOAC international* 77: 517– 521.
2. Brkić, B. (1995.): Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
3. Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., Backhouse, D. (1994.): *Laboratory manual for Fusarium research*. Sydney, Australia, University of Sydney.
4. Buriti, F. C., Saad, S. M. (2007.): Bacteria of *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotic in food products and their importance for human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 57: 373–380.
5. Chen, H., Hoover, D. G. (2003.): Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 (3): 82-100.
6. Čvek, D., Frece J., Markov K., Friganović M., Delaš F. (2010.): Antifungalni učinak bakterije *Lactobacillus plantarum K1* na rast plijesni *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 5 (1-2), 43-47.
7. Ćosić, J., Vrandečić K., Jurković D., Ereš I., Poštić J. (2008.): Parazitna mikopopulacija zrna soje. *Poljoprivreda* 14 (1): 1330-7142.
8. Ćosić, J., Vrandečić, K., Svitlica, B. (2004.): *Fusarium* vrste izolirane s pšenice i kukuruza u istočnoj Hrvatskoj. *Poljoprivreda* 10: 9-14.
9. Delaš, F., Duraković, S., Delaš I., Radić B., Markov K. (1995.): The influence of temperature on the growth of mould *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 and ochratoxin A biosynthesis in pure and mixed culture, *PBN Revija*, 33 (4): 139-143.
10. Dukić, M. (2009.): Utjecaj liofilizacije i mikroinkapsulacije na funkcionalnost probiotičkih bakterija kao živih lijekova. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
11. Duraković, S., Redžepović, S. (2002.): Uvod u opću mikrobiologiju. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
12. Florianowicz, T. (2001.): Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *European Food Research and Tehnology* 212 (3): 282-286.
13. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO.

14. Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen T. O., Samson R. A., (2004.): Mycotoxin, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 49: 201-241.
15. Frisvad, JC., Samson, RA. (2004.): Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins, *Studies in Mycology*, 49:1-174.
16. Hassan, Y.I., Bullerman, L.B. (2008.): Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans* against *Fusarium proliferatum* and *Fusarium graminearum* in a liquid culture setting. *Journal of Food Protection*, 71 (11): 2213-6.
17. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. (2014.): Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11: 506-514.
18. Hongjuan, L., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Uluko, H., Pang, X., Sun, Y., Xue, H., Zhao, L., Kong, F., Lv, J. (2014.): Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morfology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control* 43:57-64.
19. Houbraken, J., Samson, R.A. (2011.): *Penicillium* and segregation of *Trichocomaceae* into three families, *Studies in Mycology*, 70:1-51.
20. Huang, L., Shan, Y.J., He, C.X., Ren, M.H., Tian, P.J., Song, W. (2016): Effects of *L. paracasei* X12 on cell cycle of clon cancer HT-29 cells and regulation of mTOR signalling pathway 1 2, *Journal of Functional Foods*, 21: 431-439.
21. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Traditional Herbal Medicines, Some mycotoxins, Naphthalene and Styrene: Summary of Dana Reported and Evaluation, 82:275-343.
22. Ivić, D., Domijan, A.M., Peraica, M., Miličević, T., Cvjetković, B. (2009.): *Fusarium spp.* contamination of wheat, maize, soybean, and pea in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60: 435-442.
23. Kanižai Šarić, G., Milaković, Z., Krstanović, V. (2011.): Toksičnost *Fusarium* toksina; *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 6 (3-4), 112-116.
24. 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.

25. Kivanc, M., Kovanci, P. (2017.): Screening of antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *Journal of Food* 42 (5): 477-484.
26. Koninsky, J. (1982.): Coucins and other bacteriocins with an established mode of action. *Annual Review of Microbiology*, 36:125-144.
27. Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjuračić, K., Frece, J., Iannaccone, C., Canganella, F. (2008.): Characterization of Three Selected Probiotic Strains for Application in Food Industry, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5): 699-707.
28. Krishnamurthy, Y.L., Shashikala, J. Shankar Naik, B. (2008.): Antifungal potential of some natural products against *Aspergillus flavus* in soybean seeds during storage. *Journal of Stored Products Research* 44 (4): 305-309.
29. Kritzinger, Q., Aveling T.A.S. (2002.): Effects of essential oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds. *Seed Science and Tehnology* 30(3): 609-619.
30. Laitila, A., Alakomi HL., Raaska L., Mattila-Sandholm T., Haikara A. (2002.): Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds *in vitro* and in malting of barley. *Journal of applied microbiology* 93(4): 566-76.
31. Laref, N., Guessas, B. (2013.): Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria. Research article. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 13: 80-88.
32. Legan, J.D. (2000.): Cereals and cereal products. The microbiological safety and quality of food, 28:759-783.
33. 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(1): 129-135.
34. Makarova, K.; Slesarev, A.; Wolf, Y.; Sorokin, A.; Mirkin, B.; Koonin, E.; Pavlov, A.; Pavlova, N. (2006.): Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(42): 15611–15616
35. Marković, B. S. (1990.): Mikrobiologija II (bakterije, kvasci i plesni). Udžbenik. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
36. McFarland, L.V. (2009.): Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe*, 15(6): 274–280
37. Milner, M., Geddes, W.F. (1946.) Grain storage studies. 4. Biological and chemical factors involved in the spontaneous heating of soybeans. *Cereal Chemistry* 23: 449-70.
38. Milošević, M., Malešević, M. (2004): Semearstvo. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo. 110-114.

39. Mislivec, P.B., Bruce V.R. (1977.): Incidence of toxic and other mold species and genera in soybeans. *Journal of food protection* 40 (5): 309-312.
40. Pandžić, I. (2017.): Korištenje bakterija mliječne kiseline u poljoprivrednoj proizvodnji. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
41. Peraica, M., Radic B., Lucić, A., Pavlovic, M. (1999.): Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ*, 77(9): 754-776.
42. Piotrowska, M., Slizewska, K., Biernasiak, J. (2013.): Mycotoxin in Cereal and Soybean-Based Foodd and Feed. *IntechOpen*. OI: 10.5772/54470. Available from: <https://www.intechopen.com/books/soybean-pest-resistance/mycotoxins-in-cereal-and-soybean-based-food-and-feed>
43. 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, Prehrambenotehnološki fakultet Osijek.
44. Rathod, L.R., Pawar P.V. (2012.): Antimicrobial activity of medicinal plant to control seed borne pathogen of soybean. *Current Botany* 3: (2): 10-12
45. Reiss, J. (1977.): Mycotoxins in foodstuffs. X. Production of Citrinin by *Penicillium chrysogenum* in Bread. *Food and cosmetics toxicology*.
46. Roy, KW, Baird RE, Abney TS. (2000.): A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in North America, with methods and a key for identification of selected fungi. *Mycopathologia*, 150:15-27.
47. Russo, P., Arena, P.M., Fiocco, D., Capozzi V., Drider D., Spano, G. (2016.): L- plantarum with broad antifungal activity: A promising approach to increse safety and shelt-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology* 247: 48-54.
48. Saladino, F., Luz, C., manyes, L., Fernandez-Franzon, M., Meca, G., In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and thei application in loaf bred shelf life improvement. *Food Control* 67: 273-277.
49. Shah, N.H., Khan, M.I., Azam, M.F. (1992.): Seed microflora of cowpea and its control with extract of *Argemone mexicana*. *Bioved* 3(2): 176-168.
50. Sorrentino, E., Reale, A., Tremonte, P., Maiuro, L., Succi, M., Tipaldi, L., Di Renzo T., Panella G., Coppola R. (2013.): *Lactobacillus plantarum* 29 Inhibits *Penicillium spp.* Involved in the Spoilage of Black Truffles (*Tuber aestivum*). *Journal of Food Science*, 78 (8): 1188-1194

51. URL: <http://www.fao.org/home/en/>. Datum pristupa: 16.4.2020.
52. Vinokurova, N.G., Boičenko, L.V., and Arinbasarov, M.U. (2003.): Formation of alkaloids from *Penicillium* species fungi during growth on wheat kernels. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologija*. 39(4): 457–60.
53. Volenik, M., Rozman, V., Kalinović, I., Liška, A., Kiš, D., Šimić, B.(2007.): Influence of Relative Humidity and Temperature on the Changes in Grain Moisture in Stored Soybean and Maize.
54. Vratarić, M., Sudarić, A. (2008.): Soja (*Glycine max (L.) Merr.*). Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Poljoprivredni institut Osijek, Osijek, Hrvatska.
55. Wagener, R.E., Davis, N.D., and Diener, U.L. (1980.): Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*. *Applied and environmental microbiology*. 39(4): 882–887.
56. World Health Organization, WHO, URL: <https://www.who.int/>. Datum pristupa 16.4.2020.
57. Yang, XB, Feng, F. (2001.): Ranges and diversity of soybean fungal diseases in North America. *Phytopathology*; 91(8): 769-775.
58. Yiannikouris, A., Jouany, J. P. (2002.): Mycotoxines in feeds and their fate in animals: a review, *Animal Research*, 51(2): 81-99.

## 8. Sažetak

Fitopatogene vrste koje imaju sposobnost nakupljanja u namirnicama i zrnu žitarica svojih otrovnih produkata metabolizma odnosno mikotoksina su rodovi *Fusarium* i *Penicillium*. Osim što mogu ozbiljno narušiti zdravlje ljudi i životinja, utječu i na smanjenje prinosa i prihoda za proizvođače. U *in vivo* istraživanju koje smo proveli ispitali smo antifungalnu djelotvornost bakterija mliječne kiseline s ciljem suzbijanja zaraze zrna soje sa *Fusarium verticillioides* i *Penicillium chrysogenum*. Provedenim istraživanjem utvrđeno je značajno smanjenje micelijskog rasta ovih plijesni uz djelovanje rodova *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus casei*. Rezultati ovoga istraživanja potvrđuju mogućnost korištenja bakterija mliječne kiseline kao jedne od bioloških metoda zaštite usjeva u sprječavanju rasta fitopatogena koji uzrokuju znatne gubitke prinosa i ugrožavaju zdravlje ljudi.

**Ključne riječi:** *Fusarium verticillioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, sjeme soje



## 9. Summary

The genera *Fusarium verticillioides* and *Penicillium chrysogenum* are phytopathogenic species that have the ability to accumulate in food and cereal grains their toxic metabolic products or mycotoxins. In addition to seriously impairing human and animal health, they also reduce yields and incomes for producers. In an *in vivo* study, we examined the antifungal efficacy of lactic acid bacteria with the aim of controlling soybean infection with *F. verticillioides* and *P. chrysogenum*. The research revealed a significant reduction in the mycelial growth of these molds with the action of the genera *L. brevis* and *L. casei*. The results of this study confirm the possibility of using lactic acid bacteria as one of the biological methods of crop protection in preventing the growth of phytopathogens that cause significant yield losses and endanger human health.

**Keywords:** *Fusarium verticillioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, soybean seed

## 10. Popis tablica

<b>Red Br.</b>	<b>Naziv</b>	<b>Stranica</b>
<b>Tablica 1.</b>	Utjecaj antifungalnih kombinacija na rast plijesni <i>Fusarium verticillioides</i>	16
<b>Tablica 2.</b>	Utjecaj antifungalnih kombinacija na rast plijesni <i>Penicillium chrysogenum</i>	17

## 11. Popis slika

Red br.	Naziv	Stranica
1.	Čista kultura <i>Fusarium verticillioides</i>	6
2.	<i>Lactobacillus casei</i>	9
3.	<i>Lactobacillus brevis</i>	10
4.	Razlijevanje podloga u petrijeve zdjelice	13
5.	Nacjepljivanje gljiva	14
6.	Vaganje sjemena soje	15
7.	Tretiranje sjemena mliječno kiselim bakterijama	15
8.	Inokulacija micelijskim diskom	16

## 12. Popis grafikona

Red br.	Naziv	Stranica
1.	Rast plijesni <i>Fusarium verticillioides</i> uz <i>Lactobacillus casei</i> i <i>Lactobacillus brevis</i>	16
2.	Rast plijesni <i>Penicillium chrysogenum</i> uz <i>Lactobacillus brevis</i> i <i>Lactobacillus casei</i>	17

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet Agrobiotehničkih znanosti Osijek  
Sveučilišni diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda

Diplomski rad

Utjecaj mliječno kiselih bakterija na rast *Fusarium sp.* i *Penicillium sp.* na zrnu soje

Pamela Vorgić

## Sažetak:

Fitopatogene vrste koje imaju sposobnost akumulacije u namirnicama i zrnu žitarica svojih otrovnih produkata metabolizma odnosno mikotoksina su i rodovi *Fusarium* i *Penicillium*. Osim što mogu ozbiljno narušiti zdravlje ljudi i životinja, utječu i na smanjenje prinosa i prihoda za proizvođače. U *in vivo* istraživanju koje smo proveli ispitali smo antifungalnu djelotvornost bakterija mliječne kiseline s ciljem suzbijanja zaraze zrna soje sa *F. verticillioides* i *P. chrysogenum*. Provedenim istraživanjem utvrđeno je značajno smanjenje micelijskog rasta ovih plisni uz djelovanje rodova *L. brevis* i *L. casei*. Rezultati ovoga istraživanja ukazuju na mogućnost korištenja bakterija mliječne kiseline kao jedne od bioloških metoda zaštite usjeva u suzbijanju rasta fitopatogena koji dovode do značajnih gubitaka prinosa i rizik za zdravlje ljudi.

**Ključne riječi:** *Fusarium verticillioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, antifungalna djelotvornost

**Rad je izrađen pri:** Fakultet Agrobiotehničkih znanosti Osijek

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

**Broj stranica:** 32

**Broj slika:** 8

**Broj grafikona:** 2

**Broj tablica:** 2

**Broj literaturnih navoda:** 70

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, 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, Vladimira Preloga 1

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayera University of Osijek  
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek  
University Graduate Studies, Ecological agriculture

Graduate thesis

Influence of lactic acid bacteria on growth of *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. on soybean seed

Pamela Vorgić

### Abstract:

The genera *Fusarium verticillioides* and *Penicillium chrysogenum* are phytopathogenic species that have the ability to accumulate in food and cereal grains their toxic metabolic products or mycotoxins. In addition to seriously impairing human and animal health, they also reduce yields and incomes for producers. In an *in vivo* study, we examined the antifungal efficacy of lactic acid bacteria with the aim of controlling soybean infection with *F. verticillioides* and *P. chrysogenum*. The research revealed a significant reduction in the mycelial growth of these molds with the action of the genera *L. brevis* and *L. casei*. The results of this study confirm the possibility of using lactic acid bacteria as one of the biological methods of crop protection in preventing the growth of phytopathogens that cause significant yield losses and endanger human health

**Keywords:** *Fusarium verticillioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, antifungal efficacy

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

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

**Number of pages:** 32

**Number of pictures:** 8

**Number of figures:** 2

**Number of tables:** 2

**Number of references:** 70

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Thesis defended on date:**

### Reviewers:

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

**Thesis deposited at:** Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1