

Antifungalna svojstva bakterija mliječne kiseline na plijesni iz roda *Aspergillus*

Mlakić, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:270442>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Kristina Mlakić
0058222458

**ANTIFUNGALNO DJELOVANJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE NA
PLIJESNI IZ RODA *Aspergillus***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za mikrobiologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Antifungalna svojstva bakterija mliječne kiseline na plijesni iz roda *Aspergillus*

Kristina Mlakić, 0058222458

Sažetak: S obzirom da su plijesni, zbog mogućnosti proizvodnje mikotoksina, među najopasnijim kontaminantima hrane, upotreba neke od antifungalnih strategija prilikom proizvodnje hrane je neizbježna. Korištenje kultura mikroorganizama koji mogu biti i dobrobitni za zdravlje dobar je izbor nasuprot korištenju kemijskih spojeva koji suzbijaju rast plijesni. Cilj ovog rada je bio ispitati antifungalno djelovanje odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK) *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus plantarum* na pet sojeva plijesni iz roda *Aspergillus*. Za to su korištene metoda dvostrukog sloja, metoda s jažicama u podlozi i metoda dodatka supernatanta u hranjivu podlogu. Rezultati su pokazali da antifungalno djelovanje BMK ovisi o upotrijebljenoj metodi, formulaciji bakterijske kulture (žive stanice, supernatant, neutralizirani supernatant), vrsti i soju bakterija. Najjače antifungalno djelovanje pokazao je soj *Lactobacillus plantarum* K1 metodom dvostrukog sloja.

Ključne riječi: antifungalno djelovanje, bakterije mliječne kiseline, *Aspergillus* vrsta, metoda dvostrukog sloja

Rad sadrži: 29 stranica, 11 slika, 4 tablice, 40 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Komentor: dr. sc. Željko Jakopović

Datum obrane: srpanj 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of bioprocess engineering
Laboratory for microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Antifungal properties of lactic acid bacteria on fungi of the genus *Aspergillus*

Kristina Mlakić, 0058222458

Abstract: Considering that molds, due to their ability to produce mycotoxins, are among the most dangerous food contaminants, the use of some antifungal strategies during food production is inevitable. The use of microbial cultures, which can also be beneficial for health, is a good choice compared to the use of chemical compounds that inhibit mold growth. The aim of this study was to examine the antifungal activity of selected strains of lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*, against five strains of *Aspergillus* molds. The methods used for this were the double-layer method, the well diffusion method, and the addition of supernatant to the nutrient medium. The results showed that the antifungal activity of LAB depends on the method used, the formulation of the bacterial culture (live cells, supernatant, neutralized supernatant), the type, and the strain of bacteria. The strain *Lactobacillus plantarum* K1 showed the strongest antifungal activity using the double-layer method.

Keywords: antifungal activity, lactic acid bacteria, *Aspergillus* molds, double-layer method

Thesis contains: 29 pages, 11 figures, 4 tables, 40 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ksenija Markov, Full Professor

Co-mentor: Željko Jakopović, PhD

Thesis defended: July 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Mikrobni antagonizam.....	2
2.1.1. Interakcije bakterija-fungi	3
2.2. Bakterije mliječne kiseline	4
2.2.1. Rod <i>Lactobacillus</i>	5
2.2.2. Antifungalna svojstva bakterija mliječne kiseline	6
2.3. Plijesni.....	7
2.3.1. Rod <i>Aspergillus</i>	8
2.4. Metode određivanja mikrobnog antagonizma	10
2.4.1. Metoda s jažicama u podlozi.....	10
2.4.2. Metoda dvostrukog sloja	10
2.4.3. Metoda ispitivanja antifungalnog djelovanja bezstaničnih supernatanata	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Mikroorganizmi.....	11
3.1.2. Pribor i aparatura	11
3.1.3. Hranjive podloge.....	12
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Uzgoj mikroorganizama	13
3.2.2. Neizravno određivanje broja živih stanica bakterija	13
3.2.3. Izravno određivanje broja spora plijesni	14
3.2.2. Metoda dvostrukog sloja	15
3.2.3. Metoda dodatka supernatanta u podlogu	16
3.2.4. Metoda s jažicama u podlozi.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Određivanje antifungalnih djelovanja BMK na rast plijesni iz roda <i>Aspergillus</i> metodom dvostrukog sloja.....	18
5. ZAKLJUČCI.....	25
6. LITERATURA	26

1. UVOD

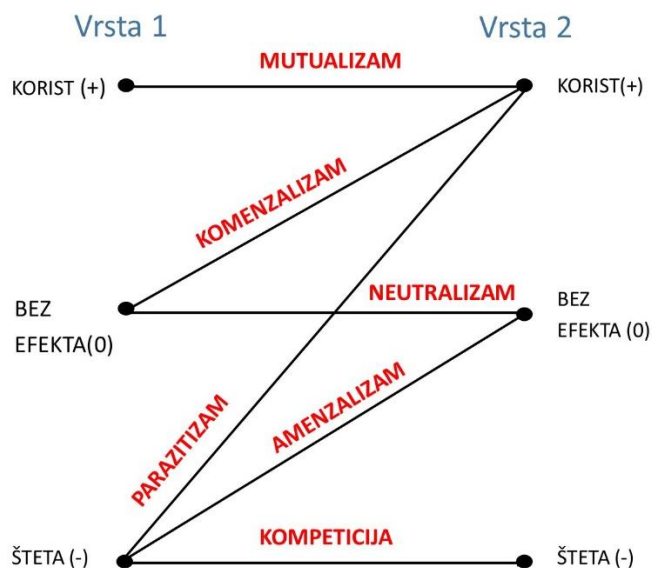
Kontaminacija plijesnima može biti uzrokom smanjene sigurnosti brojnih prehrambenih proizvoda i s tim povezanih gospodarskih gubitaka. Današnja proizvodnja hrane većinom se provodi u velikom mjerilu i zahtijeva velik broj koraka u procesu proizvodnje što dodatno povećava rizik od kontaminacije plijesnima koja je opasna zbog proizvodnje štetnih spojeva. S druge pak strane poznati antifungalni spojevi, iako dokazane djelotvornosti, mogu imati štetan učinak na zdravlje potrošača i okoliš te je njihova primjena zakonski regulirana. Primjerice, prekomjerna i neadekvatna uporaba antibiotika povezana je s rastućim problemom antibiotske rezistencije. Upotreba kultura živih organizama kao biokonzervansa dobra je alternativa u skladu s načelima zelene kemije i dobrobiti potrošača. Pritom posebnu pozornost privlače bakterije mliječne kiseline jer su brojne kulture poznate kao probiotičke, a dosadašnja istraživanja sugeriraju njihovu antifungalnu aktivnost. Dodatna prednost je već stoljećima poznata primjena bakterija mliječne kiseline u proizvodnji fermentiranih namirnica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mikrobní antagonizam

Mikrobni ekosustav je zajedništvo različitih mikroorganizmima koji međusobno djeluju, a određen je složenom interakcijom ekoloških i okolišnih čimbenika u prirodnoj fizičkoj okolini. U određenoj ekološkoj sredini djeluje veliki broj faktora čije je djelovanje povezano, a često jedan drugog uvjetuju te su vrlo često isprepleteni. Zajedničko je djelovanje biotičkih i abiotičkih faktora kojima se živa bića i mikroorganizmi prilagođavaju ili stvaraju nove uvjete za život. Svi mikroorganizmi u prirodi stupaju u neku vrstu odnosa. To su odnosi između jedinki unutar jedne populacije, ili pak odnosi između različitih populacija. U populacijama se najčešće ostvaruje pozitivan vid odnosa ili kooperacija. Postoje i negativni odnosi kao kompeticija kada se među jedinkama javljaju konkurentski odnosi, najčešće zbog hrane. Mikrobi se općenito natječu za hranjive tvari iz okoliša na dva načina. Prvi je putem pasivne konkurencije, a drugi je kroz oštru konkurenciju. Vrste se izravno natječu za hranjive tvari, pri čemu jedna vrsta pokazuje veću potrošnju i time ograničava drugu. Druga vrsta konkurencije je izravna konkurencija (interferentna konkurencija), pri čemu dolazi do proizvodnje antimikrobnih sredstava (siderofori, antibiotici, enzimi, bakteriocini, hlapljive tvari) koji imaju širok spektar djelovanja (Ibrahim i sur., 2021; Kerr, 1999).

Odnosi mikroorganizama s abiotičkim čimbenicima i drugim mikroorganizmima znatno utječu na vitalnost i dinamiku svih ekosustava na Zemlji. Mikrobi uzrokuju biogeokemijsko kruženje tvari što određuje zdravlje biljaka i životinja te rezultira nastankom karakterističnih mikrobnih međuodnosa koji se uspostavljaju često i između filogenetski i metabolički različitih jedinki. Takve interakcije se grupiraju prema učinku jednog organizma na drugi pa prema tome mogu biti pozitivni (+), negativni (-) ili bez učinka (0) (Kost i sur., 2022). Na slici 1 prikazani su mikrobní odnosi i vidljiva je podjela na mutualizam, komenzalizam, parazitizam, neutralizam, amenzalizam i kompeticiju, kao i šteta ili korist mikroorganizama zbog uspostavljanja takvog odnosa.



Slika 1: Prikaz mikrobnih međuodnosa (vlastita slika)

Mikroorganizmi mogu ostvariti korist prilikom interakcije s drugim mikroorganizmima. To su tzv. mutualističke interakcije: komenzalizam i mutualizam (Kost i sur., 2022).

Odnos između mikroorganizama pri kojem jedan mikroorganizam djeluje na drugi tako da usporava, odgađa ili potpuno zaustavlja njegovo razmnožavanje naziva se mikrobnim antagonizmom (Hajsig i Delaš, 2016). Antagonistički odnosi mogu biti kompeticija za hranjive tvari ili amenzalizam koji se temelji na proizvodnji i oslobađanju metabolita koji šteti drugom organizmu. Antagonistički učinak najčešće pokazuju plijesni i bakterije tvorbom proizvoda sekundarnog metabolizma, bakteriocina i antibiotika. Antibiotici su specifični spojevi visoke fiziološke antagonističke aktivnosti prema određenim skupinama mikroorganizama, katkad i tumorskih stanica. Sprječavaju njihov rast i uništavaju ih. Gram pozitivne i gram negativne bakterije sintetiziraju bakteriocine, točnije proteine ili ribosomski sintetizirane peptide karakteristične po svojoj antimikrobnoj aktivnosti. Posebno su zanimljivi i istraživani bakteriocini koje proizvode bakterije mliječne kiseline (BMK) zbog široke mogućnosti primjene kao biokonzervansa u prehrambenoj industriji (Hajsig i Delaš, 2016). Nastanak negativnog učinka u skladu je s prirodnom selekcijom, a raširenost ove vrste odnosa objašnjava se ograničenošću hranjivih tvari u okolini kroz razvitak mehanizama koji će pojedinoj vrsti omogućiti selektivnu prednost (Kost i sur., 2022).

2.1.1. Interakcije bakterija-fungi

Bakterije i fungi u prirodi često dijele staništa. Interakcije koje nastaju kao posljedica suživota moduliraju ponašanje međuodnosa jednog ili oba sudionika. Spomenute se interakcije razlikuju po specifičnosti i jačini djelovanja. U nekim je slučajevima zabilježena jaka

metabolička i biofizička „međuovisnost“ zbog koje dolazi do zajedničkog razvoja i evolucije. S druge strane, zajedničko pojavljivanje bakterija i funga u zajednici ne mora značiti postojanje ikakve interakcije. Prema jačini djelovanja, razina molekularne komunikacije, ako postoji, može biti visoko sofisticirana ili vrlo jednostavna. Također, uspostavljane interakcije mogu biti visoko specifične.

Kada mikroorganizmi rastu zajedno ili koegzistiraju u okolišu, oni međusobno utječu na rast i fiziološke aktivnosti zbog proizvodnje antagonista rasta i natjecanja za prostor i hranjive tvari (Sadiq i sur., 2019). Gljive se u takvim okruženjima ne razlikuju od ostalih mikroorganizama, jer i na njihov rast i potencijal za proizvodnju sekundarnih metabolita (antibiotika, mikotoksina) utječu koegzistirajući mikroorganizmi kao rezultat različitih interakcija. Fungalne vrste proizvode antibiotike/mikotoksine kao odgovor na određene signale iz okoliša ili čimbenike povezane sa stresom zbog nedostatka hranjivih tvari, svjetlosti i čimbenika okoliša poput pH, temperature i aktiviteta vode (a_w) (Sadiq i sur., 2019).

Između goleme bioraznolikosti koja prevladava u prirodnim resursima, bakterije su dobile veliku pozornost ne samo zbog svoje iznimno široke rasprostranjenosti i raznolikosti populacije, već i zbog svoje sposobnosti proizvodnje širokog spektra bioaktivnih metabolita s antimikrobnim svojstvima. Antifungalna aktivnost je relativno česta karakteristika među bakterijama, dajući ekološku prednost bakterijama u okolišima koji podržavaju rast mješovite bakterijske i fungalne flore (Ranjbariyan i sur., 2011). Izravni utjecaj bakterija na funge je kroz zaustavljanje njihovog rasta kao rezultat natjecanja za prostor i hranjive tvari i proizvodnju kiselina i antifungalnih metabolita ili kombinacije ovih čimbenika (Sadiq i sur., 2019). Danas su stotine kemijski različitih antifungalnih spojeva izolirane iz golemog niza bakterija, ali je proizvodnja antifungalnih metabolita u bakterijama prilično ovisna o soju i vrsti pa je stalna potraga za pronalaskom novih bakterijskih populacija kako bi se povećala mogućnost otkrivanja novih antimikotika (Ranjbariyan i sur., 2011)

2.2. Bakterije mliječne kiseline

BMK su gram pozitivne, nesporulirajuće, najčešće nepokretne bakterije. Ubrajaju se u anaerobne i aerotolerantne bakterije koje se najviše pojavljuju u obliku štapića i koka (Sadiq i sur., 2019). Općenito govoreći, dobro podnose kiselu okolinu (optimalan rast je zabilježen pri pH 5,5-5,8) i mezofilne su (optimum rasta se postiže u temperaturnom intervalu 30-38 °C). Na katalaza test daju negativne rezultate (Choi i sur., 2023)

Najprepoznatljivija karakteristika BMK je proizvodnja mliječne kiseline fermentacijom šećera glukloze. Prema krajnjem proizvodu fermentacije, BMK se dijele na homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne BMK proizvode uglavnom mliječnu kiselinu, a heterofermentativne BMK uz mliječnu kiselinu proizvode i octenu te niz drugih spojeva, poput ugljikovog dioksida, acetata i etanola.

BMK su taksonomski svrstane u koljeno *Firmicutes*, razred *Bacilli* i red *Lactobacilliales*, te u rodove *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*. Kriteriji klasifikacije su način fermentacije glukoze, stanična morfologija, način iskorištavanja šećera i raspon temperature rasta (Mokoena, 2017). BMK obitavaju u okolišima bogatim hranjivim tvarima pa se nalaze u otpadnom biljnom materijalu i voću, u mliječnim proizvodima, fermentiranom mesu i ribi, žitaricama, ukiseljenom povrću, napicima, vodi, ali i unutar živih organizama (primjerice, kod ljudi u usnoj šupljini, genitalnom, intestinalnom i dišnom traktu). Dio su zdravog mikrobioma ljudskog probavnog sustava. Pritom nisu smatrane patogenima, izuzev zubnog karijesa koji nastaje kao metabolit određenih sojeva (König i Fröhlich, 2017).

Budući da se BMK koriste od davnina i nepatogene su, američka FDA (Food and Drug Administration), QPS (Qualified Presumption of Safety) i europska EFSA (European Food Safety Authority) dodijelile su im je GRAS (Generally Regarded As Safe) status što omogućuje njihovu široku primjenu u prehrambenoj industriji (Leuschner i sur., 2011). Važna je i primjena BMK kao starter kultura te probiotika (Abouloifa i sur., 2022). Predmet su istraživanja i zbog potencijalne primjene kao zamjena za pesticide (Raman i sur., 2022).

2.2.1. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je najveći rod unutar skupine bakterija mliječne kiseline, jer su se sve gram-pozitivne bakterije u obliku štapića koje proizvode mliječnu kiselinu i nesposobne za stvaranje spora gotovo automatski pripisivale ovom rodu. Kao posljedica toga, rod *Lactobacillus* sadrži brojne bakterije koje su genetski vrlo različite s obzirom na njihov sadržaj G+C, veličinu genoma i broj gena pa je 2020. godine rod *Lactobacillus* reklasificiran u 25 rodova uključujući izmijenjeni rod *Lactobacillus*, koji uključuje organizme prilagođene domaćinu koji se nazivaju skupina *Lactobacillus delbrueckii* i *Paralactobacillus* i 23 nova roda (Zheng i sur., 2020).

Rod *Lactobacillus* pripada koljenu *Firmicutes*, razredu *Bacilli*, redu *Lactobacillales* i obitelji *Lactobacillaceae*. Laktobacili su gram-pozitivne, katalaza-negativne, štapićaste bakterije koje ne stvaraju spore i proizvode mliječnu kiselinu kao glavni krajnji proizvod fermentacije. Na temelju putova fermentacije ugljikohidrata rod se dijeli u tri skupine: (i) obvezni homofermentativni; (ii) fakultativni heterofermentativni; i (iii) obvezni heterofermentativni laktobacili.

Ovom raznolikom bakterijskom rodu pripada preko 250 opisanih vrsta i 57 podvrsta (Kullar i sur., 2023) od kojih se neke koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda, kiselog tijesta, mesa, biljnih namirnica ili kao probiotici, što je omogućeno njihovim GRAS statusom. Mogu sintetizirati bakteriocine i egzopolisaharide, pridonijeti okusu različitih mliječnih

proizvoda, ali u nekim okolnostima također mogu uzrokovati nedostatke okusa i teksture.

Postoji niz bakterija mliječne kiseline različitog podrijetla s dokazanim antimikrobnim i antifungalnim djelovanjem i potencijalom biokonzervacije. Važno je napomenuti da su vrste iz roda *Lactobacillus* najrašireniji bakterijski izolati povezani s antifungalnim djelovanjem među kojima *Lactobacillus plantarum* ima ključnu ulogu u inhibiciji rasta raznih mikroskopskih gljiva i sintezi mikotoksina.

Lactobacillus plantarum

Za vrstu *Lactobacillus plantarum* može se reći da je među najvažnijim vrstama roda *Lactobacillus*. Heterofermentativna je bakterija štapićastog oblika koja se pojavljuje pojedinačno, u parovima ili u kratkim lancima. Prilagodljiva vrsta raznolikih i široko primjenjivih osobina, *L. plantarum* često se koristi kao modelna vrsta za metaboličke, ekološke i genetske studije laktobacila. Dio je prehrambene industrije od komercijalne važnosti kao probiotička i starter kultura (Todorov i sur., 2010). Dokazano je da *L. plantarum* proizvodi bakteriocine i antifungalne spojeve. Ustanovljeno je da ova BMK proizvodi bakteriocine širokog spektra djelovanja prema vrstama *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, i *Aeromonas hydrophila*, od kojih su sve patogene (Bernbom i sur., 2006 i Messi i sur., 2001). Antifungalna aktivnost *L. plantarum* dobro je poznata i mnoge studije dokazuju inhibitorno djelovanje ove bakterijske vrste na plijesni. Cheong i sur. (2014) zabilježili su da 12 sojeva *L. plantarum* izoliranih iz voća, povrća i bilja pokazuje snažno antifungalno djelovanje.

Lactobacillus brevis

L. brevis je gram pozitivna, mikroaerofilna, heterofermentativna bakterija. Nalazi se u mlijeku, siru, fecesu, usnoj šupljini, intestinalnom traktu ljudi i štakora, ukiseljenom voću. Zabilježena su i antimikrobna svojstva *L. brevis* prema patogenim bakterijama *B. cereus* te *S. aureus* koja bi mogla biti osnova za primjenu *L. brevis* kao dobar dodatak probioticima (Rönkä i sur., 2003). Uključen je u proizvodnju širokog spektra fermentiranih proizvoda diljem svijeta. Međutim, u nekim okolnostima može uzrokovati kvarenje raznih namirnica i pića. *Lactobacillus brevis* je jedan od najnepoželjnijih mikroorganizama koji kvare pivo. Dokazano je da *L. brevis* posjeduje i antifungalnu aktivnost koja bi se mogla pripisati kombiniranim učincima organskih kiselina i ostalih antagonističkih spojeva koji često djeluju sinergistički. *L. brevis* inhibira rast micelija i klijanje konidija plijesni *Fusarium proliferatum* i *Aspergillus westerdijkiae* (Somashekaraiyah i sur., 2019; Li i sur., 2024).

2.2.2. Antifungalna svojstva bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline, sa GRAS statusom, smatraju se prikladnim izborom za korištenje kao prirodni konzervansi u hrani i stočnoj hrani za kontrolu rasta gljivica i kasnije proizvodnje mikotoksina (Ibrahim i sur., 2021).

Poznato je da BMK proizvode spojeve antimikrobnog djelovanja (Abouloifa i sur., 2022). Općenito, dva su mehanizma antimikrobnog djelovanja BMK. Prvi bi bio snižavanje pH vrijednosti okoline proizvodnjom organskih kiselina. Značajna promjena pH vrijednosti prema kiselom području onemogućava opstanak drugih mikroorganizama poput plijesni, ali i patogenih bakterija. Drugi je mehanizam djelovanja proizvodnja metabolita koji ometa rast drugih mikroba (Wang i sur., 2020).

Antimikrobni metaboliti su organske kiseline (mliječna, octena, limunska, propionska i mravlja), fenilaktična kiselina, hidroksi-masne kiseline, proteini, reuterin, bakteriocini, vodikov peroksid, diacetil, ciklički dipeptidi (Abouloifa i sur., 2022).

Organske kiseline se do sada smatraju glavnim metabolitima BMK koji snažno utječu na rast plijesni putem inhibicije rasta micelija. Organske kiseline u svom protoniranom ili nedisociranom obliku lipofilne su prirode i stoga lako difundiraju preko stanične membrane plijesni i akumuliraju se u citoplazmi. Među organskim kiselinama mliječna kiselina se smatra glavnim metabolitom BMK, koja se obično proizvodi u najvećoj količini u usporedbi s drugim organskim kiselinama. Međutim, poznato je da mliječna kiselina pokazuje manje inhibitorno djelovanje na rast plijesni u usporedbi s drugim organskim kiselinama kao što su octena i propionska kiselina (Ibrahim i sur., 2021).

2.3. Plijesni

Gljive ili *Fungi* su eukarioti koji zbog svojih značajnih razlika od biljaka i životinja čine zasebno carstvo koje se sastoji od raznolikih jednostaničnih i višestaničnih organizama. Plijesni su mikroskopske micelijske gljive. Nastanjuju širok spektar staništa, rastu u širokom temperaturnom rasponu (od -20 do 50 °C) i hrane se saprofitski, tj. razgrađuju mrtvu organsku tvar. Tijelo plijesni naziva se talus. Za plijesni je karakteristično da rastu micelijski, tj. u isprepletenoj masi sastavljenoj od stanica koje se nazivaju hife. Micelij plijesni je manje ili više razgranat, a dijeli se na zračni ili fertilni (iznad podloge) koji nosi strukture za razmnožavanje te na vegetativni ili supstratni (u podlozi) kojim plijesan crpi hranjive tvari (Markov i sur., 2022).

Plijesni imaju iznimno značajnu ulogu u životu čovjeka, ali predstavljaju i određenu opasnost. Svojim metabolizmom proizvode različite kemijske spojeve, od jednostavnijih organskih kiselina do složenijih molekula, a neke mogu sintetizirati snažne toksine, mikotoksine koji mogu imati jako štetan učinak na zdravlje ljudi i životinja. Većina vrsta plijesni opasnih za čovjeka pripada plijesnima koje prevladavaju u skladištima, a najvažnije vrste mikotoksikotvornih plijesni pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium* te rodu *Fusarium* (Markov i sur., 2022).

Zbog dobre prilagodljivosti na uvjete okoline, efikasnog iskorištenja hranjivih tvari i široke rasprostranjenosti, kažemo da su vrste koje pripadaju plijesnima oportunističke vrste. Stoga su česti kontaminanti hrane čemu pridonosi i lakoća rasprostriranja spora koje dospiju

u proizvodne pogone u, primjerice prehrambenoj industriji. Kontaminacije plijesnima mogu ozbiljno narušiti sigurnost hrane jer svojim metabolizmom proizvode različite vrste mikotoksina: aflatoksine, fumonizine, okratoksine i druge (Sadiq i sur., 2019).

2.3.1. Rod *Aspergillus*

Plijesni iz roda *Aspergillus* široko su rasprostranjene diljem Zemlje. Staništa su im raznolika po okolišnim i klimatskim uvjetima. Primjerice tlo, solane, stijene, polarna staništa, živuće biljke, lišajevi i životinje te fosilni ostaci mjesta su na koja su se aspergili prilagodili i koja obitavaju. Na pojavljivanje ovog roda plijesni u prirodi utječu brojni faktori poput mikroklima, raspoloživosti supstrata i složenih mikrobnih odnosa (Abdel-Azeem i sur., 2016). Od preko 340 opisanih vrsta, neke mogu biti patogene ili blagotvornog djelovanja na ljude, životinje i biljke (Samson i sur. 2014; Abdel-Azeem i sur. 2016).

Aspergili pripadaju odjeljku *Ascomycota* čije su obilježje septirane hife i nespolne konidiospore koje se stvaraju na krajevima hifa te spolne askospore zatvorene u mješnici koja se naziva „askus“ po kome je odjeljak i dobio naziv (Markov i sur. 2022).

Upravo zbog svoje bioraznolikosti, plijesni iz roda *Aspergillus* se svrstavaju među tehnološki najvažnije skupine organizama. Već se naširoko primjenjuju za proizvodnju organskih kiselina i enzima, a brojne druge mogućnosti njihove industrijske primjene nisu još istražene. Igraju i nezamjenjivu ulogu u farmaceutskoj industriji za proizvodnju bioaktivnih supstanci: antibiotika, antifungalnih lijekova i lijekova za sniženje razine kolesterola i lipida u krvi (Bok i sur., 2006; Pecyna i Bizukoje 2011). Također, privlače pažnju i u agronomiji zbog potencijalnog korištenja za zaštitu biljaka od patogena (Abdel-Azeem i sur., 2021).

Uz plijesni roda *Aspergillus* veže se negativna konotacija zbog mikotoksina koje proizvode. Aflatoksini su, zbog svoje izrazite toksičnosti, kancerogenosti, teratogenosti i hepatotoksičnosti, detaljno proučavani od svog prvog pojavljivanja 1960. godine kao „x-bolest purana“. Optimalna proizvodnja aflatoksina odgovara temperaturi od oko 30 °C, rasponu pH od 3,5 do 8 i minimalnoj a_w -vrijednosti od 0,95 do 0,99. Odlikuje ih termostabilnost, a od nepovoljnih uvjeta štite ih proteini na koje su u prirodnom stanju vezani. Ove toksične metabolite moguće je naći u poljoprivrednim proizvodima, žitaricama, kikirikiju, maslinama, vinu, raži, pistacijama i u drugoj hrani, kao i u stočnoj hrani što uzrokuje neizravnu izloženost potrošača životinjskog mesa aflatoksinima. Neke vrste roda *Aspergillus* proizvode i druge toksine štetne za životinje i ljude: okratoksine, ciklopiazoničnu kiselinu i sterigmatocistin (Markov i sur., 2022).

Aspergillus niger

Aspergillus niger jedna je od najprisutnijih vrsta plijesni iz roda *Aspergillus*. Svrstan je u sekciju crnih plijesni *Nigri*. U prirodi je nalazimo kao crnilo na voću, povrću i drugoj hrani, u

tlu, ali i u zatvorenim prostorima. Industrijska uloga različitih sojeva *A. niger* je raznolika: koriste se kao radni mikroorganizmi za proizvodnju organskih kiselina (oksalne, limunske i glukonske) i enzima (amilaze, lipaze, pektinaze, alfa-galaktozidaza, proteaze). Zbog široke primjene, američka FDA i WHO dodijelile su *A. niger* kulturama GRAS status iako najnovija istraživanja upućuju da *A. niger* proizvodi okratoksin A, jako toksični metabolit (Markov i sur., 2022). Za *A. niger* zanimljiva je otpornost na radijaciju što, prema novim istraživanjima, sugerira primjenu ove plijesni u svemirskim misijama (Cortesão i sur., 2020).

Aspergillus westerdijkiae

Aspergillus westerdijkiae, filamentozna gljiva iz sekcije *Circumdati*, predstavnik je roda *Aspergillus* kao kontaminant hrane: moguće ga je identificirati na ugljikohidratima, namirnicima biljnog podrijetla, kavi, mlijeku, vinu, pivu, grožđu i dr. Česti je patogen biljaka i stroga uzročnik ekonomskih gubitaka. Iako je okratoksin A, najrasprostranjeniji mikotoksin, nazvan po vrsti *A. ochraecus* iz koje je prvotno izoliran, studije na molekularnoj razini dokazale su da je *A. ochraecus* bio pogrešno identificiran te da je najznačajniji proizvođač ovog toksičnog spoja upravo *A. westerdijkiae* (Markov i sur., 2022).

Aspergillus parasiticus

A. parasiticus predstavnik je sekcije *Flavi* raste pri višim temperaturama i u uvjetima povećane vlažnosti pa mu jako odgovara tropska klima. Ovu je vrstru moguće naći u tlu, žitaricama, hrani i zemnim oraščićima. Od mikotoksina proizvodi aflatoksine B₁, B₂, G₁ i G₂ zbog čega prisutnost *A. parasiticus* predstavlja opasnost u prehrambenoj industriji. Suprotno tome, *A. parasiticus* se koristi u biotehnološkoj proizvodnji lijeka za melazmu, kojične kiseline (Markov i sur., 2022).

Aspergillus flavus

Taksonomski svrstan u sekciju *Flavi*, *A. flavus* je prirodno prisutan u tlu. Raste micelijski ili u obliku sklerocija. Kod ljudi je uzročnik aspergiloza i alergija, a posebice je poznat po proizvodnji mikotoksina. *A. flavus* prvenstveno proizvodi aflatoksine, a zbog rasprostranjenosti u tlu čest je kontaminant poljoprivrednih kultura aflatoksinima i to sjemena kukuruza, kikirikija, pamuka i oraha (Markov i sur., 2022).

A. carbonarius

A. carbonarius, također iz sekcije *Nigri*, plijesan je prisutna u tlu, blatu i drveću močvare mangrova, zagađenim vodama, na grožđu i sušenom voću. Tropska klima, zbog visoke vlažnosti i temperatura, najviše pogoduje rastu *A. carbonarius*. Producent je okratoksina A. Najznačajnije kontaminacije ovom plijesni povezane su s vinskom industrijom jer do

kontaminacije može doći tijekom dozrijevanja, za vrijeme berbe ili pri preradi grožđa. Biotehnološki se *A. carbonarius* može primjenjivati za proizvodnju sekundarnih metabolita, primjerice limunske kiseline (Markov i sur., 2022).

2.4. Metode određivanja mikrobnog antagonizma

Određivanje mikrobnog antagonizma od velike je koristi u epidemiologiji, predviđanju razvoja bolesti te otkriću novih lijekova. Antibiotička rezistencija je rastući problem koji znanstvenici nastoje riješiti otkrićem novih lijekova, prirodnih ili sintetskih (Hossain, 2024; Balouiri i sur., 2016). U svrhu određivanja i procjene učinka mikrobnog antagonizma razvijene su različite metode, na čvrstim ili u tekućim podlogama. Mikrobnog se antagonizam određuje uz tzv. indikatorske sojeve koji su gram-pozitivne ili gram-negativne, sporogene ili nesporogene bakterije i to su najčešće sojevi *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. Od metoda koje se koriste u tekućim podlogama, najraširenija je turbidimetrijska metoda. Na čvrstim se podlogama primjenjuju metoda dvostrukog sloja podloge, metoda agarnih diskova, metoda „kap preko kapi“, metoda s jažicama u podlozi, metoda s diskovima filtarskog papira, „metoda okomitih crta“ i druge (Hajsig i Delaš, 2016).

2.4.1. Metoda s jažicama u podlozi

Široko primjenjivana u detekciji aktivnosti antimikrobnih ekstrakata, metoda s jažicama u podlozi zasniva se na difuziji antimikrobne tvari krutom podlogom. Najprije se podloga inokulira test mikroorganizmom, zatim se sterilno izbuše rupe u agaru promjera 6-8 mm uz stvaranje jažica koje se napune ispitivanim ekstraktom (obično 100-200 μ L ekstrakta). Slijedi inkubacija na optimalnoj temperaturi rasta testnog mikroorganizma te je nakon nekoliko dana uzgoja (ovisno o brzini rasta test-mikroorganizma) moguće vidjeti zone inhibicije ako je do nje došlo te po promjeru inhibicije zaključiti o jačini djelovanja antimikrobnih agensa (Balouiri i sur., 2016).

2.4.2. Metoda dvostrukog sloja

Metoda dvostrukog sloja također se temelji na difuziji antimikrobnih metabolita čvrstom hranjivom podlogom što može uzrokovati usporavanje, inhibiciju rasta ili odgoditi sporulaciju plijesni. U ovom je radu korištena inačica metode dvostrukog sloja koju su opisali Magnusson i Schnürer (2001). Na sloj MRS agra se nacijepe bakterije u oko 2 cm dugoj crti te se nakon određenog vremena inkubacije radi porasta bakterija izlije sladni agar za uzgoj plijesni koji se inokulira određenom plijesni. Nakon nekoliko dana uzgoja moguće je vidjeti zone inhibicije rasta ako je do nje došlo.

2.4.3. Metoda ispitivanja antifungalnog djelovanja bezstaničnih supernatanata

Pretpostavka ove dilucijske metode je da bakterije pri rastu u podlogu luče antifungalne metabolite. Metoda se provodi odvajanjem bakterijske kulture od supernatanta nakon čega se supernatantom razrijedi čvrsta podloga za uzgoj plijesni. Praćenjem rasta plijesni kroz nekoliko dana i usporedbom s rastom kontrolnog soja, kulture uzgajane bez bakterijskog supernatanta u čvrstoj podlozi, moguće je zaključiti o antifungalnom djelovanju bakterijskih supernatanata. Metoda je provedena kako su je opisali Cheong i sur. (2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

Za izradu ovog rada korištene su bakterije mliječne kiseline i plijesni iz roda *Aspergillus* iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZMPBF).

Bakterije:

- *Lactobacillus plantarum* GRZZ
- *Lactobacillus plantarum* K1
- *Lactobacillus brevis* A16

Plijesni:

- *Aspergillus niger* Z100
- *Aspergillus westerdijkiae* Z103
- *Aspergillus parasiticus* Z104
- *Aspergillus flavus* Z107
- *Aspergillus carbonarius* Z108

3.1.2. Pribor i aparatura

- Mikrobiološke epruvete (16 × 160 mm)
- Kivete 15 mL
- Stalak za epruvete
- Plastični i stakleni štapići po Drygalskom
- Mikrobiološka lanceta
- Mikrobiološka ušica
- Bunsenov plamenik
- Pipetman 1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

- Pipetman 200 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Petrijeve zdjelice promjera 10 cm
- Predmetno i pokrovno stakalce
- Thomaova komorica
- Vaga (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Erlenmeyerove tikvice
- Vibro mikser V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)
- Brojač kolonija BZG30 (WTW, Weilheim, Njemačka)
- Termostat (Sutjeska, Beograd)
- Svjetlosni mikroskop CX21 (Olympus, Japan)
- Filter za špricu (celuloza acetat 0,20 µm, 47 mm, Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Centrifuga Z446K (Hermle, Labortechnik GmbH, Njemačka)
- pH metar MP220 (Mettler Toledo; Greifensee, Švicarska)

3.1.3. Hranjive podloge

1. Hranjive podloge za uzgoj i očuvanje BMK:

- MRS (deMan, Rogosa i Sharpe) agar sastava:

Tablica 1: Sastav podloge (MRS agar)

Komponenta	Koncentracija (g/L)
Pepton	10
Mesni ekstrakt	10
Kvašćev ekstrakt	5
Glukoza	20
Tween 80	1
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	0,1
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0,05
NaCH ₃ COO	5
Agar	20

U destiliranoj vodi pH vrijednost podloge je 6,5. Sterilizacija podloge se provodi pri temperaturi 121°C tijekom 15 minuta.

- MRS (deMan, Rogosa i Sharpe) bujon istog sastava, samo bez dodatka agra.

2. Podloga za uzgoj plijesni: sladni agar

Tablica 2: Sastav podloge (sladni agar)

Komponenta	Koncentracija (g/L)
Maltoza	12,5
Dekstrin	2,5
Glicerol	1
Peptokompleks	2,6
Agar	17

U destiliranoj vodi pH vrijednost podloge iznosi 4,6. Sterilizacija podloge se vrši pri temperaturi 121 °C tijekom 15 minuta.

Sve podloge su pripravljene prema uputama proizvođača. Točnije, kruti sadržaj je odvagano i otopljeno u deioniziranoj vodi i zagrijano do vrenja te potom sterilizirano.

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj mikroorganizama

Bakterije korištene u radu su čuvane pri temperaturi od -20 °C u hranjivom bujonu uz dodatak 30 % (v/v) glicerola. Kako bi se mogle koristiti, bakterije je potrebno revitalizirati u bujonu prekonoćnim uzgojem pri odgovarajućoj temperaturi rasta. Sukladno tome, za provođenje opisanih metoda ispitivanja antifungalnog djelovanja, bakterije su uzgajane prekonoćno pri temperaturi 37 °C.

Spore plijesni se čuvaju u vodi u hladnjaku te ih je za korištenje potrebno nacijepiti na krutu podlogu (sladni agar), što je provedeno točkastim nacijepivanjem uz pomoć mikrobiološke lancete. Tako nacijepljene krute hranjive podloge stavljene su u termostat na 28 °C. Nakon pet dana uzgoja plijesni su razvile micelije i sporulirale te je pripremljena vodena suspenzija spora, a broj je određen brojanjem u Thomaovoj komorici.

3.2.2. Neizravno određivanje broja živih stanica bakterija

Za procjenu broja živih stanica bakterija u nekom materijalu ili uzorku rabi se metoda brojanja poraslih kolonija uz pretpostavku da jedna živa stanica tvori jednu koloniju na čvrstoj podlozi. Najprije se pripreme decimalna razrjeđenja kako bi broj poraslih kolonija bio u pravilu od 30 do 300, tj. da ne poraste premalo kolonija što bi moglo implicirati na nedovoljan broj živih bakterija u uzorku, ali da ne dođe do sljublivanja kolonija i prerastanja podloge što onemogućuje brojanje. Decimalna se razrjeđenja pripreme tako da se početni uzorak

razrjeđuje u omjeru 1:10 te se iduće razrjeđenje dobije istim razrjeđivanjem prethodnog. Tako su, nakon prekonoćnog uzgoja bakterija načinjene serije razrjeđenja te je po 0,1 mL odgovarajućih razrjeđenja nacijepljeno na krutu podlogu za uzgoj bakterija, ravnomjerno i sterilno raspoređeno po podlozi štapićem po Drygalskom te prekonoćno uzgajano. Kad su kolonije porasle, izabrane su podloge s odgovarajućim brojem kolonija koje su prebrojane i izražene kao CFU vrijednost (CFU, eng. Colony Forming Units) koja se računa prema jednadžbi 1:

$$CFU = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{upotrijebljeni volumen uzorka [mL]}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad [1]$$

Broj stanica izražen kao CFU/mL bio je za: *L. plantarum* K1 $7,7 \times 10^8$, *L. plantarum* GRZZ $3,0 \times 10^9$ i *L. brevis* A16 $2,3 \times 10^9$.

3.2.3. Izravno određivanje broja spora plijesni

Broj spora plijesni po volumenu suspenzije moguće je odrediti izravnim brojanjem spora pod mikroskopom pomoću Thomaove komorice. Suspenziju spora potrebno je homogenizirati vibro mikserom. Uzorak se zatim nanosi na Thomaovu komoricu koja sadrži mrežu precizno definiranih kvadrata i kvadratića koji olakšavaju brojanje pod mikroskopom. Spore plijesni se broje unutar kvadrata, a brojevi spora koriste se za izračunavanje koncentracije spora u uzorku prema izrazu 2:

$$N = \frac{m \times n \times 1000 \times 4000}{q} \text{ spora / mL} \quad [2]$$

Pri čemu je:

N – Ukupan broj spora plijesni u Thomaovoj komorici

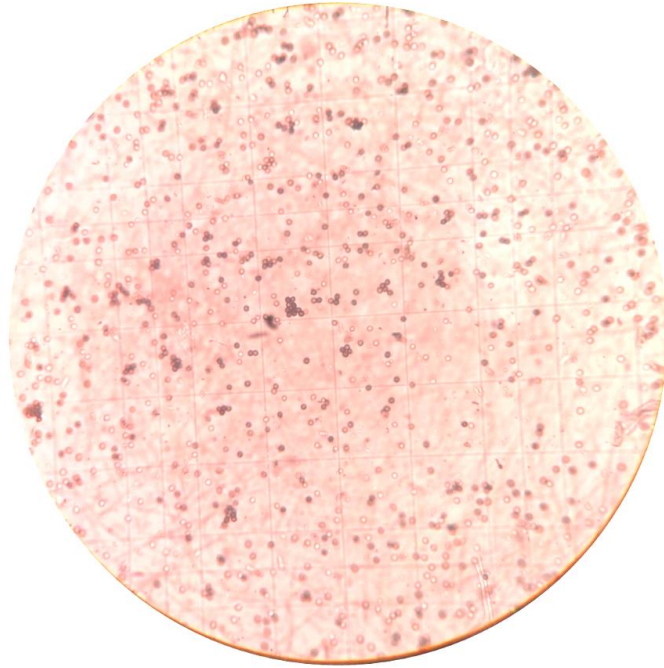
m – broj izbrojenih spora plijesni

n – razrjeđenje uzorka u kojem se broje spore plijesni

q – broj kvadratića u kojima su izbrojene spore plijesni

Pod pretpostavkom da je suspenzija homogenizirana, koncentracija suspenzije određena u Thominoj komorici odgovara koncentraciji suspenzije spora plijesni. Broj spora plijesni bio je 10^4 spora/mL.

Na slici 2 prikazana je mikroskopska slika jednog velikog kvadrata Thomaove komorice sa sporama plijesni.



Slika 2: Mikroskopska slika jednog velikog kvadrata Thomaove komorice i spore plijesni; P=400x (vlastita fotografija)

3.2.2. Metoda dvostrukog sloja

Za provedbu metode dvostrukog sloja za odabrane bakterije mliječne kiseline i plijesni iz roda *Aspergillus* pripremljene su Petrijeve zdjelice sa čvrstim MRS agrom na koje su nacijepljeni sojevi bakterija u ravnim crtama i zatim su inkubirane 48 h pri 37 °C nakon čega su bakterije porasle. Na slici 3 vidljiv je porast bakterija i način kako su nacijepljene na hranjivu podlogu.



Slika 3: Prikaz naciepljivanja i porasta bakterijskih kultura za metodu dvostrukog sloja (vlastita fotografija)

Na porasle kulture bakterija izliven je novi sloj hranjive podloge, sladni agar za uzgoj plijesni. Nakon što se podloga ohladila na nju je naciepljena suspenzija spora plijesni i ravnomjerno razmazana štapićem po Drygalskom. Pripravljene zdjelice sa dvostrukim slojem inkubirane su 72 h pri 28 °C.

3.2.3. Metoda dodatka supernatanta u podlogu

U svrhu provođenja metode bakterijske su kulture uzgajane 24 h pri 37 °C u tekućem bujonu. Uslijedilo je centrifugiranje kako bi se odvojila bakterijska biomasa od supernatanta koji su zatim hladno sterilizirani filtracijom kako bi bila osigurana potpuna odsutnost bakterijskih stanica. Izmjerene su pH vrijednosti supernatanta uz pomoć pH-metra te su supernatanti od triju bakterijskih kultura podijeljeni u dvije skupine od po 15 mL: (i) supernatanti koji nisu neutralizirani; (ii) supernatanti koji su neutralizirani. Izmjerene pH vrijednosti supernatanta ukazivale su na kiselo područje i iznosile su: 4,05 za soj *L. plantarum* GRZZ; 3,95 za soj *L. plantarum* K1 i 4,05 za soj *L. brevis* A16. Druga je skupina supernatanta neutralizirana dodatkom 1 M NaOH. Prilikom neutralizacije supernatanti su pokazali slično ponašanje (pH bi se mijenjao za približno isto jedinica dodatkom istog volumena lužine) uz blago pufersko djelovanje pri pH 5. Da bi inhibicijsko djelovanje bilo jasno, metoda nalaže da 10% hranjive podloge za uzgoj plijesni čine supernatanti bakterijskih kultura te je shodno tome u svaku od Peterijevih zdjelica dodano po 1,5 mL supernatanta te po 15 mL sladnog agra pa su hranjive podloge sa supernatantima u Petrijevoj zdjelici blagim miješanjem homogenizirane. Za svaki je supernatant (neutralizirani ili neneutralizirani) metoda provedena

u duplikatu što je, uz kontrolne sojeve, činilo ukupno 65 Petrijevih zdjelica za svaki bakterijski supernatant i sve ispitivane plijesni. Nakon što su se podloge ohladile, točkasto su nacijepijene plijesni i inkubirane na 27 °C. Rast je plijesni preačen kroz pet dana te su rezultati očitani treći i peti dan rasta.

3.2.4. Metoda s jažicama u podlozi

Za provođenje metode s jažicama u podlozi, najprije je po 0,1 mL suspenzije spora plijesni nacijepijeno na kruti sladni agar te razmazano štapićem po Drygalskom. Pritom su načinjene rupe u agaru u koje je dodano po 100 µL supernatanata bakterijskih kultura. Nakon 72 h rasta, očitani su rezultati i ako se pojave zone bez rasta oko jažice, to su zone inhibicije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Antifungalno djelovanje bakterija mliječne kiseline, i stanica i supernatanta (netretiranog i neutraliziranog), na rast plijesni iz roda *Aspergillus* praćeno je metodom dvostrukog sloja, metodom jažica u podlozi te metodom dodatka supernatanta u hranjivu podlogu. Rezultati istraživanja prikazani su u tablicama 3 i 4 te na slikama 4-11.

4.1. Određivanje antifungalnih djelovanja BMK na rast plijesni iz roda *Aspergillus* metodom dvostrukog sloja

Tablica 3: Rezultati metode dvostrukog sloja

BMK	JAČINA INHIBICIJE RASTA				
	<i>A. niger</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. carbonarius</i>
<i>L. plantarum</i> K1	+++	+++	++	++	+
<i>L. plantarum</i> GRZZ	+	+	-	-	-
<i>L. brevis</i> A16	-	-	-	-	-

Legenda: vrlo jaka inhibicija (+++), srednje jaka inhibicija (++) , slaba inhibicija (+), bez inhibicije (-)



Slika 4: Inhibicija rasta i sporulacije plijesni *A. niger* Z100 u prisutnosti bakterije *L. plantarum* K1 (vlastita fotografija)



Slika 5: Inhibicija rasta i sporulacije plijesni *A. westerdijkiae* Z103 i u prisutnosti bakterije *L. plantarum* K1 (vlastita fotografija)

Slika 6 objedinjuje sve rezultate metode dvostrukog sloja. Bakterije redom prema dolje su: *L. plantarum* GRZZ; *L. plantarum* K1 i *L. brevis* A16, a plijesni s lijeva na desno su *A. westerdijkiae* 103, *A. niger* Z100, *A. parasiticus* Z104, *A. flavus* Z107 te *A. carbonarius* Z108.



Slika 6: Rezultati metode dvostrukog sloja (vlastita fotografija)

Rezultati metode dvostrukog sloja dokazuju antifungalno djelovanje *L. plantarum* K1 na sve sojeve istraživanih plijesni iz roda *Aspergillus*. Najsnažnije djelovanje dokazano je na *A. niger* i *A. westerdijkiae*, dok najslabije na *A. carbonarius* (tablica 3). Oko BMK poraslih u obliku crte, zbog difuzije antifungalnih metabolita, došlo je do inhibicije rasta plijesni što se očituje prozornom zonom (slike 4 i 5). Također, kod svih plijesni vidljiv je izostanak sporulacije u prisutnosti soja K1 (slika 6).

L. plantarum GRZZ pokazuje slabu antifungalnu aktivnost na rast *A. niger* i *A. westerdijkiae*, dok na ostale vrste *A. parasiticus*, *A. flavus* i *A. carbonarius* inhibicija nije dokazana.

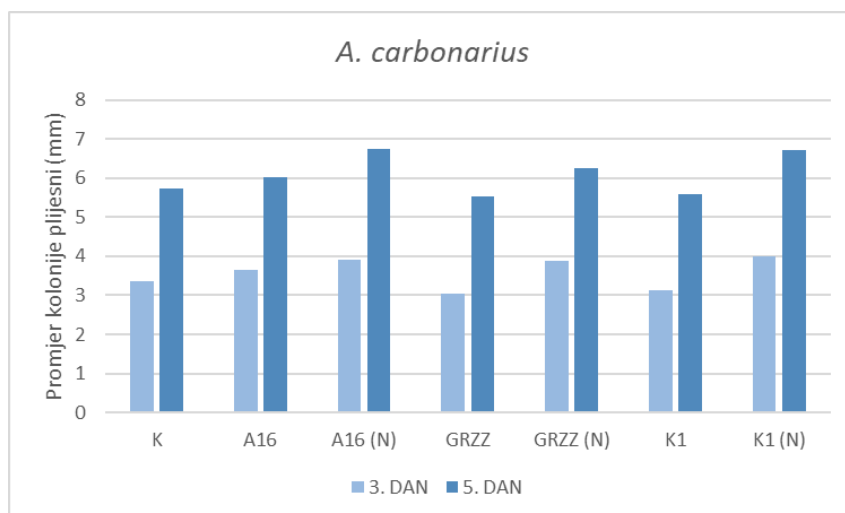
U pokusima s bakterijom *L. brevis* ovom metodom nije dokazan antifungalni učinak na rast kao ni na sporulaciju plijesni (tablica 3 i slika 6).

Rezultati u ovom istraživanju djelomično su u suglasju s rezultatima istraživanja drugih autora (Sathe i sur., 2007) koji su određivali antifungalno djelovanje 359 izolata bakterija mliječne kiseline protiv plijesni *Aspergillus flavus* i koji su dokazali da samo 10 % izolata pokazuje antifungalnu aktivnost. Pokazalo se, kao i u ovom istraživanju, da među različitim sojevima BMK postoje značajne razlike u aktivnosti prema različitim plijesnima, zbog čega se javljaju i velike razlike u njihovom antifungalnom djelovanju.

Ström i suradnici (2002) su testirali 1200 izolata BMK iz različitog okoliša od kojih je otprilike 10 % pokazalo inhibitornu aktivnost, a njih 4 % snažnu aktivnost protiv vrsta plijesni iz roda *Aspergillus*. Autori su uz pomoć nuklearne magnetske rezonance, masene spektroskopije i plinske kromatografije, dokazali da su uz cikličke peptide, koji su odgovorni za antifungalnu aktivnost određenih BMK, u bakterije *Lactobacillus plantarum* prisutni L i D izomeri 3-fenil mliječne kiseline. Produkciju širokog spektra antifungalnih spojeva zabilježili su kod soja MiLAB 393 bakterije *Lactobacillus plantarum* koji je izoliran iz silaže, a njegovo djelovanje je dokazano na plijesnima iz rodova *Fusarium* i *Aspergillus*. I u ovom istraživanju je dokazano antifungalno djelovanje sojeva bakterije *Lactobacillus plantarum* na plijesni roda *Aspergillus*.

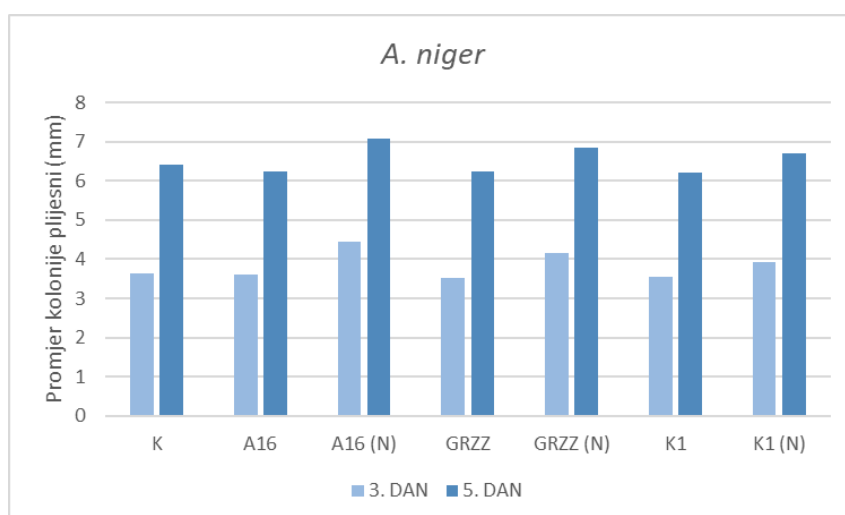
Kako mehanizmi antimikrobnog djelovanja BMK uključuju proizvodnju organskih kiselina, primjerice mliječne, octene, propionske te je u drugom dijelu ovog istraživanja određivana antifungalna aktivnost supernatanta izolata BMK na rast mikotoksikogenih vrsta iz roda *Aspergillus*. Inhibicija je određena u prisutnosti netretiranog supernatanta kao rezultat proizvodnje organskih kiselina, ali i u prisutnosti neutraliziranog supernatanta kako bi se izuzelo djelovanje utjecaja sniženja pH kao rezultat proizvodnje organskih kiselina.

Rezultati utjecaja netretiranog i neutraliziranog supernatanta na rast plijesni metodom dodatka supernatanta u hranjivu podlogu prikazani su na slikama 7 – 11, a metodom jažica u podlozi u tablici 2.



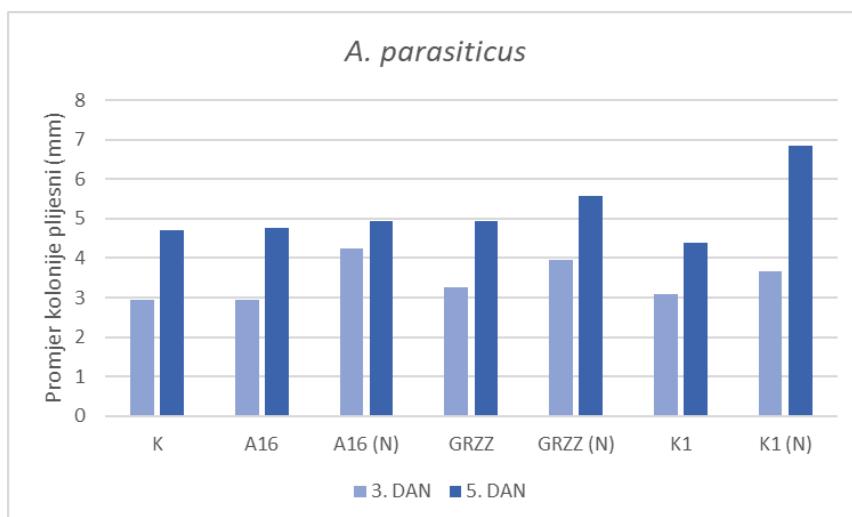
(N)- neutralizirani supernatant

Slika 7: Promjer kolonije plijesni *A. carbonarius* Z108 nakon 3. i 5. dana uzgoja pri 28 °C uz dodatak bakterijskog supernatanta



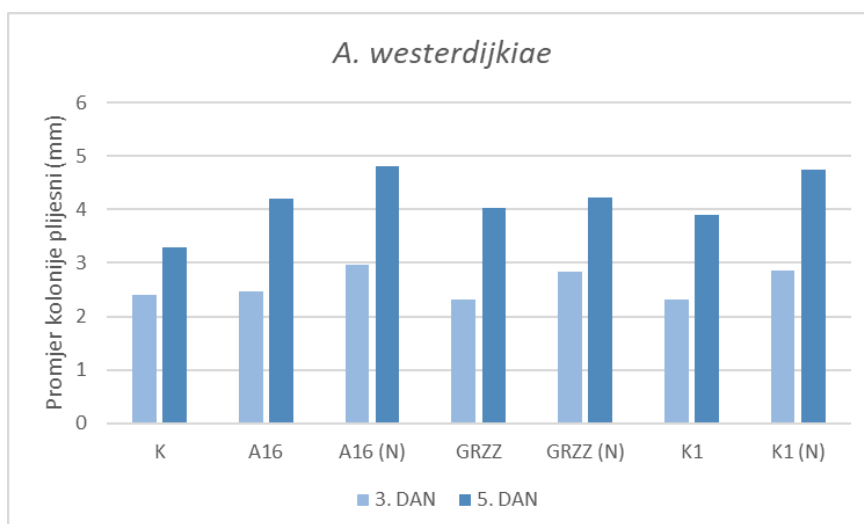
(N)- neutralizirani supernatant

Slika 8: Promjer kolonije plijesni *A. niger* Z100 nakon 3. i 5. dana uzgoja pri 28 °C uz dodatak bakterijskog supernatanta



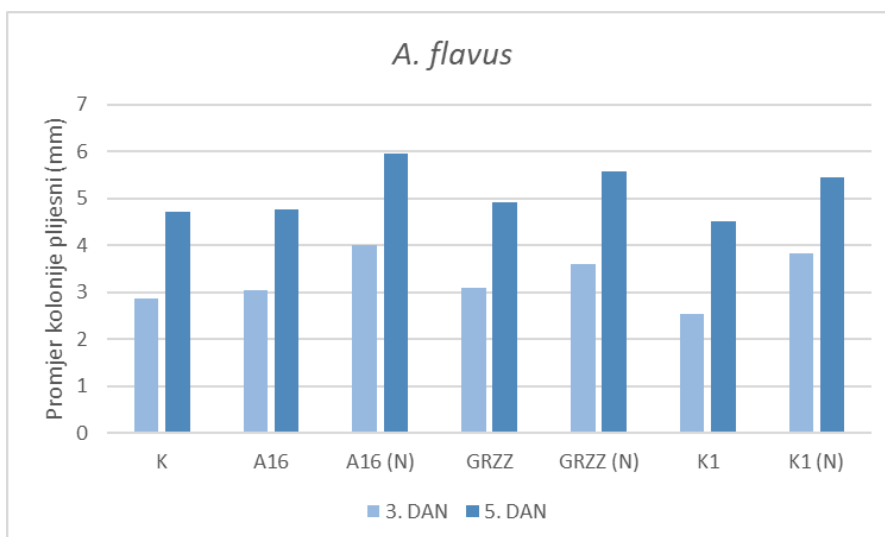
(N)- neutralizirani supernatant

Slika 9: Promjer kolonije plijesni *A. parasiticus* Z104 nakon 3. i 5. dana uzgoja pri 28 °C uz dodatak bakterijskog supernatanta



(N)- neutralizirani supernatant

Slika 10: Promjer kolonije plijesni *A. westerdijkiae* Z103 nakon 3. i 5. dana uzgoja pri 28 °C uz dodatak bakterijskog supernatanta



(N)- neutralizirani supernatant

Slika 11: Promjer kolonije plijesni *A. flavus* Z107 nakon 3. i 5. dana uzgoja pri 28 °C uz dodatak bakterijskog supernatanta

Tablica 4: Rezultati inhibicije rasta plijesni metodom jažica u podlozi

BMK	JAČINA INHIBICIJE RASTA				
	<i>A. niger</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. carbonarius</i>
K1	-	-	-	-	-
K1 _(N)	-	-	++	-	-
GRZZ	-	-	++	-	-
GRZZ _(N)	-	-	-	-	-
A16	-	-	-	-	-
A16 _(N)	-	-	-	-	-

Legenda: (N) neutralizirani supernatant; (++++) vrlo jaka inhibicija ;(++) srednje jaka inhibicija; (+) slaba inhibicija; (-) nema inhibicije

Supernatanti (netretirani i neutralizirani) izolata BMK različitog podrijetla nisu iskazali značajan stupanj inhibicije rasta odabranih plijesni (slike 7- 11, tablica 4). Jedino je kod izolata K1 i GRZZ zabilježena slaba inhibicija rasta. Kod K1 je iznosila maksimalnih 3 % za *A. niger*, *A. westerdijkiae* i *A. flavus* te 10 % za *A. carbonarius* (slike 7, 8, 10, 11), a kod soja GRZZ je iznosila 3% samo za *A. niger* i 10 % za *A. carbonarius* (slike 7 i 8). Nadalje, iz dobivenih rezultata vidljivo je da čak dolazi do boljeg rasta u prisutnosti supernatanta BMK od kontrolnog soja, što može biti rezultat sinergističkog djelovanja proizvedenih spojeva i stanica plijesni pa dolazi do stimulacije rasta (slike 7 – 11). Rezultati ovog istraživanja, kada je korišten netretirani

supernatant, u kontradikciji su sa zaključcima studije koju su 2023. godine objavili Kanjan i sur. koji su zabilježili snažno antifungalno djelovanje supernatanta bakterije *Lactiplantibacillus plantarum* 124 prema plijesnima *Penicillium sp.* i *A. flavus*. Elektronskom mikroskopijom je primjećeno da su u netretiranom supernatantu spojevi koje luči bakterija *L. plantarum* 124, uzrokovali ozbiljna oštećenja staničnih membrana i organela *A. flavus* i *Penicillium sp.* Međutim, isti autori su dokazali značajan gubitak antifungalnog djelovanja nakon neutralizacije supernatanta (Kanjan i sur., 2023), što je slučaj i u ovom istraživanju.

Sumarno gledajući, inhibicije rasta netretiranih supernatanta bile su neznatne za sve ispitane izolate, dok je nakon neutralizacije za sve izolate dobiven gotovo potpuni gubitak antifungalnog djelovanja. Takvi rezultati mogu upućivati na zaključak da je glavni mehanizam antifungalnog djelovanja proizvodnja organskih kiselina.

U istraživanjima antifungalnog djelovanja BMK na rast kvasaca, Jørgensen i sur. (2017) u svojem istraživanju sa supernatantom bakterije *Lactobacillus reuteri* navode kako uz sniženje pH postoji mogućnost inhibicije rasta *Candida albicans* i proizvodnjom antifungalnih molekula.

Od svih provedenih metoda u ovom istraživanju, metodom dvostrukog sloja dobiveni su najbolji rezultati antifungalnog djelovanja BMK. Rezultati su pokazali da žive stanice iskazuju najjače antifungalno djelovanje što se može objasniti da stanice tijekom rasta u/na hranjivoj podlozi na kojoj se nalaze i plijesni, kao rezultat natjecanja za prostor i hranjive tvari luče razne metabolite. Heterofermentativne BMK uz mliječnu kiselinu i različite antimikrobne supstance, proizvode octenu kiselinu u relativno visokim količinama, i propionsku u niskim količinama (Sadiq i sur., 2019). Poznato je da je jedna od najdjelotvornijih i najviše korištenih organskih kiselina za spriječavanje rasta i sporulaciju plijesni, propionska kiselina koja djeluje kao antigerminacijski agens, pa je možda i to razlog dobivenih rezultata metodom dvostrukog sloja u ovom istraživanju.

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata antifungalnog djelovanja bakterija mliječne kiseline na rast plijesni iz roda *Aspergillus* može se zaključiti:

1. Od odabranih metoda (metoda dvostrukog sloja, metoda s jažicama u podlozi, metoda dodatak supernatanta u hranjivu podlogu) jedino je metodom dvostrukog sloja dokazana inhibicija rasta plijesni.
2. Najjače antifungalno djelovanje pokazao je soj *Lactobacillus plantarum* K1 metodom dvostrukog sloja.
3. Antifungalno djelovanje bakterija mliječne kiseline ovisi o vrsti i soju bakterije.
4. Žive stanice BMK u odnosu na netretirani i neutralizirani supernatant bakterija su preduvjet za sprječavanje rasta i sporulaciju plijesni iz roda *Aspergillus*.

6. LITERATURA

Abdel-Azeem AM, Salem FM, Abdel-Azeem MA, Nafady NA, Mohesien MT, Soliman EA (2016) Biodiversity of the genus *Aspergillus* in different habitats, *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, 3-28. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1>

Abdel-Azeem AM, Yadav AN, Yadav N, Usmani Z (2021) Industrially important fungi for sustainable development, Volume 1: Biodiversity and ecological perspectives, Springer International Publishing, Cham, Švicarska, 2-86.

Abouloifa H, Hasnaoui I, Rokni Y, Bellaouchi R, Ghabbour N, Karboune S i sur. (2022). Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application in food biopreservation, *Advances in Applied Microbiology* **120**, 33-77. <https://doi.org/10.1016/bs.aams.2022.07.001>

Álvarez M, Andrade MJ, Delgado J, Núñez F, Román AC, Rodrigues P(2023) *Rosmarinus officinalis* reduces the ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in a dry-cured fermented sausage-based medium, *Food Control* **145**, 109436. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109436>

Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis* **6**, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Bernbom N, Licht TR, Saadbye P, Vogensen FK, Nrrung B (2006). *Lactobacillus plantarum* inhibits growth of *Listeria monocytogenes* in an in vitro continuous flow gut model, but promotes invasion of *L. monocytogenes* in the gut of gnotobiotic rats, *International Journal of Food Microbiology* **108**, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.021>

Bok JW, Hoffmeister D, Maggio-Hall LA, Murillo R, Glasner JD, Keller NP(2006) Genomic mining for *Aspergillus* natural products, *Chemistry & biology* **13** (1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.10.008>

Cheong EYL, Sandhu A, Jayabalan J, Kieu Le TT, Nhiep NT, My Ho HT i sur. (2014) Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese, *Food Control* **46**, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.011>

Choi GH, Holzapfel WH, Todorov, SD (2023) Diversity of the bacteriocins, their classification and potential applications in combat of antibiotic resistant and clinically relevant pathogens, *Critical Reviews in Microbiology* **49**, 578-597. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2022.2090227>

Cortese M, De Haas A, Unterbusch R, Fujimori A, Schütze T, Meyer V i sur. (2020) *Aspergillus niger* spores are highly resistant to space radiation, *Frontiers in Microbiology*, **11**, 560. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00560>

Hajsig D i Delaš F (2016) Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije, Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, 75-88.

Hossain TJ (2024) Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations, *European Journal of Microbiology and Immunology* **14**(2), 97-115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>

- Ibrahim SA, Ayivi RD, Zimmerman T, Siddiqui SA, Altemimi AB, Fidan H i sur. (2021) Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: Food safety and microbial food spoilage prevention, *Foods* **10(12)**, 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>
- Jørgensen MR, Kragelund C, Jensen PØ, Keller MK, Twetman D (2017) Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species *in vitro*, *Journal of Oral Microbiology* **9(1)**, 1–8. <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1274582>
- Kanjan P, Sakpetch P (2023) Effect of antifungal compounds secreted by *Lactiplantibacillus plantarum* 124 against *Aspergillus flavus* and *Penicillium sp.* and its application in Kaeng-Tai-Pla-Haeng to extend the shelf life, *International Journal of Food Science & Technology* **58(10)**, 5376-5387. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16656>
- Kerr JR (1999) Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity, *Microbial ecology in health and disease* **11(3)**, 129-142 <https://doi.org/10.1080/089106099435709>
- Kost C, Patil KR, Friedman J, Garcia SL, Ralser M (2023) Metabolic exchanges are ubiquitous in natural microbial communities, *Nature Microbiology* **8(12)**, 2244-2252. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01511>
- König H, Fröhlich J (2017) Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, *Heidelberg: Springer* 3–29. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_1
- Kullar R, Goldstein EJC, Johnson S, McFarland LV (2023) *Lactobacillus bacteremia* and probiotics: a review, *Microorganisms* **11(4)**, 896. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040896>
- Leuschner RGK, Robinson TP, Hugas M, Cocconcelli PS, Richard-Forget F, Klein G i sur. (2011). Corrigendum to “Qualified presumption of safety (QPS): A generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA)”, *Trends in Food Science and Technology* **22**, 51-52. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.001>
- Li L, Yang B, Yang S, Tian X, Gao Y, Song J i sur. (2024) Inhibitory effects of *Lactobacillus brevis* on *Aspergillus westerdijkiae* and antifungal compounds identification, *Postharvest Biology and Technology* **214**, 112980 <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2024.112980>
- Magnusson J, Schnürer J (2001) *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound, *Applied and environmental microbiology* **67(1)**, 1-5. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.1-5.2001>
- Markov K, Pleadin J, Jakopović Ž, Zadavec M, Frece J (2022) Plijesni- odabrane značajke, izolacija i identifikacija, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, 2-32.
- Messi P, Bondi M, Sabia C, Battini R, Manicardi G (2001) Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain, *International Journal of Food Microbiology* **64**: 193–198 [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00419-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00419-0)
- Mokoena MP (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review, *Molecules* **22**, 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>

Pecyna M, Bizukojc M (2011) Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* with the simultaneous use of lactose and glycerol in a discontinuous fed-batch culture, *Journal of Biotechnology* **151** (1), 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.079>

Raman J, Kim JS, Choi KR, Eun H, Yang D, Ko YJ i sur. (2022) Application of lactic acid bacteria (LAB) in sustainable agriculture: advantages and limitations, *International Journal of Molecular Sciences* **23**(14), 7784. <https://doi.org/10.3390/ijms23147784>

Ranjbariyan AR , Shams-Ghahfarokhi M, Kalantari- S , Razzaghi-Abyaneh M (2011) Molecular identification of antagonistic bacteria from Tehran soils and evaluation of their inhibitory activities toward pathogenic fungi, *Iranian journal of microbiology* **3**(3), 140.

Rönkä E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A (2003) Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*, *International Journal of Food Microbiology* **83**(1), 63-74, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00315](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00315)

Sadiq FA, Yan B, Tian F, Zhao J, Zhang H, & Chen W (2019) Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **18**, 1403-1406. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J et al (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*, *Studies in mycology* **78**, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>

Sathe SJ, Nawani NN, Dhakepalkar PK, Kapadnis BP (2007) Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables, *Journal of Applied Microbiology* **103**(6), 2622-2628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03525.x>

Somashekaraiah R, Mottawea W, Gunduraj A, Joshi U, Hammami R, Sreenivasa MY (2021) Probiotic and antifungal attributes of *Levilactobacillus brevis* MYSN105, isolated from an Indian traditional fermented food Pozha, *Frontiers in Microbiology* **12**, 696267. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.696267>

Ström K, Sjögren J, Broberg A, Schnürer J (2002) *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyl lactic acid, *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4322–4327. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002>

Todorov SD, Franco BDGDM (2010) *Lactobacillus Plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production, *Food Reviews International* **26**(3), 205–229. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.484113>

Wang X, Wang W, Lv H, Zhang H, Liu Y, Zhang M i sur. (2021) Probiotic potential and wide-spectrum antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from infant feces. *Probiotics and antimicrobial proteins* **13**, 90-101. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09658-3>

Zalán Z, Hudáček J, Štětina J, Chumchalová J, & Halász A (2009). Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media, *European Food Research and Technology* **230**, 395–404 <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1179-9>

Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CM, Harris HM, Mattarelli, P i sur. (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended

description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*, *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **70(4)**, 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Izjava o izvornosti

Ja Kristina Mlakić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis