

»Mladi za napredek Maribora«

37. srečanje

# Vpliv naravnih pripravkov na škodljive glive na semenih žita

Raziskovalno področje: BIOTEHNOLOGIJA, KMETIJSTVO, ŽIVILSTVO

Raziskovalna naloga

Avtor: JERNEJ NEZMAN

Mentor: KATJA HOLNTHANER ZOREC, VALERIJA TKALEC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 165/ 170

Maribor, januar 2020



»Mladi za napredek Maribora«

37. srečanje

# Vpliv naravnih pripravkov na škodljive glive na semenih žita

Raziskovalno področje: BIOTEHNOLOGIJA, KMETIJSTVO, ŽIVILSTVO

Raziskovalna naloga

Maribor, januar 2020



## Kazalo vsebine

1. Uvod .....	1
2. Teoretično ozadje .....	2
2.1 Glive, kot škodljiv mikroorganizem rastlin in semen .....	2
2.1.1 <i>Alternaria alternata</i> .....	2
2.1.2 <i>Fusarium sp.</i> .....	4
2.2 Fungicidi .....	6
2.2.1 Sintetični fungicidi .....	8
2.2.2 Naravni fungicidi .....	9
2.3 Vpliv bakterij mikrobioma pšenice na patogene glive .....	13
3. Raziskovalna vprašanja in hipoteze .....	14
3.1 Hipoteze .....	14
4. Metode in materiali .....	15
4.1 Seznam materiala .....	15
4.2 Pridobivanje in priprava materiala .....	15
4.2.1 Priprava suspenzije gliv .....	16
4.2.2 Priprava bakterijskih izolatov .....	16
4.3 Priprava redčitvene vrste in izračun CFU .....	17
4.4 Priprava disk dilucijskega antibiograma .....	19
4.5 Testiranje vpliva bakterijskih izolatov na rast gliv .....	20
4.6 Priprava in koncentracije priprava pripravkov .....	20
4.7 Testiranje kaljivosti .....	21
5. Rezultati .....	22
5.1 Določitev števila enot, ki tvorijo kolonije v suspenziji .....	22
5.2 Inhibicjske cone .....	23
5.3 Kaljivost .....	31
5.4 Vpliv bakterijskih izolatov na rast gliv .....	32
6. Razprava .....	33
6.1 Ovrednotenje rezultatov antibiogramov in klitvenih poskusov .....	33
6.2 Vpliv izbranih bakterijskih izolatov na rast gliv .....	35
6.3 Pomen dobljenih rezultatov .....	36
6.4 Možne izboljšave in nadaljnje študije .....	36
7. Zaključek .....	37
8. Družbena odgovornost .....	38
Viri .....	39
Priloga .....	42

## Kazalo slik

Slika 1: Kolonije <i>Alternarije alternata</i> na DG18 gojišču.....	2
Slika 2: Verige konidijev in njihovo razvejanje glive <i>Alternaria alternata</i> .....	3
Slika 3: Simptomi okužbe z <i>Alternario spp.</i> na pšeničnem zrnju in na žitnem klasu.....	4
Slika 4: Prikaz makrokonidijev (ma), mikrokonidijev (mi) in klamidiokonidijev (cs) <i>Fusariuma sp.</i> .....	4
Slika 5: Rast glive <i>Fusarium sp.</i> na gojišču DG18, ki smo jo uporabili v raziskovalni nalogi. ....	5
Slika 6: Makrokonidiji, po obliki bananam podobne večcelične strukture <i>Fusarium sp.</i> .....	6
Slika 7: Levo: simptomi fuzarioze klasa na pšeničnem klasu, Desno: roza obarvanje zaradi velike količine spor <i>Fusarium sp.</i> na klasu. ....	6
Slika 8: Naravni fungicid .....	10
Slika 9: Čebula .....	11
Slika 10: Olje čajevca .....	12
Slika 11: Majaron.....	12
Slika 12: Cimet.....	13
Slika 13: Testiranje in prikaz inhibicije bakterije na škodljivo glivo. Levo: kontrola, desno: bakterijska inhibicija rasti glive- bakterije se nahajajo na zgornjem kvadratu .....	14
Slika 14: Redčitvena vrsta.....	19
Slika 15: Razredčitvena vrsta <i>Fusarium sp.</i> .....	22
Slika 16: Testiranje sterilnosti pripravkov. Disk s sokom čebule na gojišču DG18- difuzijskega antibiogram (na desni)-okrog diska vidimo manjšo rast gliv. ....	23
Slika 17: Prikaz učinkovitosti sode bikarbone na dan 7 po nacepitvi.....	29
Slika 18: Eksperiment kaljivosti semen, ki so bila tretirana s pripravki.....	31
Slika 19: Primer rasti <i>Fusarium sp.</i> v prisotnosti bakterij .....	32
Slika 20: Primer rasti <i>Alternaria alternata</i> ob prisotnosti bakterij.....	32

## Kazalo tabel

Tabela 1: Glive, ki povzročajo pomembne bolezni, katerih rast preprečujemo s fungicidi .....	8
Tabela 2: Seznam izolatov, ki smo jih vključili v testiranje vpliva na rast izbranih gliv .....	17
Tabela 3: Koncentracije testiranih pripravkov .....	21
Tabela 4:Število poraslih kolonij pri redčitveni vrsti glivnih suspenzij in vrednost CFU v osnovni (založni) suspenziji.....	22
Tabela 5: Slikovni prikaz rezultatov testiranja pripravkov z <i>Alternari alternato</i> .....	24
Tabela 6: Opisni prikaz rezultatov testiranja pripravkov z <i>Alternario atlernato</i> .....	26
Tabela 7: Slikovni prikaz rezultatov testiranja pripravkov s <i>Fusarium sp.</i> .....	27
Tabela 8: Velikost inhibicijskih con pri <i>Fusarium sp.</i> .....	29

## Kazalo grafikonov

Graf 1: Inhibicijske cone (mm) pri <i>Fusarium sp.</i> .....	30
Graf 2: Kaljivost semen. Skupno je v testiranje s posamezno učinkovino bilo vključenih 10 semen....	31

## Povzetek

Semena žit so pogosto okužena z različnimi mikroorganizmi, kjer imajo poseben pomen glive. Obolenja zmanjšujejo kaljivost semena, energijo kaljivosti in preprečujejo mladostni razvoj rastline. Za zaviranje rasti gliv so v redni uporabi okolju in človeku škodljiva fitofarmacevtska sredstva. Zato se vedno več raziskav posveča testiranju naravnih, bolj ekoloških alternativ. V naši raziskovalni nalogi smo z disk dilucijskim antibiogramom na dveh glivah, *Fusarium sp.* in *Alternaria alternata* testirali: sodo bikarbono, čajevac, majaron, cimeti in čebulo. Sočasno smo določali tudi delež kaljivosti obdelanih semen. Poleg naravnih pripravkov smo v testiranje vključili tudi več bakterijskih vrst (n=13) bacilusov, paenibacilusov in *Pantoea agglomerans*, ki so bile naravno prisotne na semenih žita in bi glede na predhodne raziskave prav tako lahko vplivale na rast gliv. V nalogi smo pokazali, da imajo nekatere naravne učinkovine, predvsem cimeti in olje čajevca velik potencial za razkuževanje semen.





## Zahvala

Rad bi se zahvalil zunanji mentorici za vso pomoč pri izvajanju eksperimentov za raziskovalno nalogo in vso pomoč pri pisanju same raziskovalne naloge. Prav tako bi se rad zahvalil Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLOZH) ter Oddelku za mikrobiološke raziskave, da so mi omogočili izvajanje eksperimentov. Zahvalil bi se tudi notranji mentorici za pomoč pri strukturiranju raziskovalne naloge.

## 1. Uvod

Semena žit so pogosto (v do 90 %) okužena z različnimi škodljivimi mikroorganizmi, ki pri rastlini povzročajo bolezni. Obolenja zmanjšujejo kaljivost semena, energijo kaljivosti in upočasnjujejo mladostni razvoj rastline. Bolezni semen in širjenje mikroorganizmov preprečujemo s pesticidi in podobnimi kemikalijami; te imajo dolgo razpadno dobo in ostanejo na rastlini ali v prsti tudi po opravljenem delu. Te snovi so škodljive za človeka, živali in okolje (Šarc, 2020).

Za zaviranje rasti gliv uporabljamo fungicide, ki spadajo med fitofarmacevtska sredstva. To so snovi, ki preprečujejo rast in razvoj gliv. V kmetijstvu se pogosto uporabljajo sintetični fungicidi zaradi svoje učinkovitosti. Ti imajo tako kot insekticidi in drugi pesticidi negativni učinek na človeka in okolje (Šarc, 2020). Potencialna rešitev slabosti sintetičnih fungicidov bi bila uporaba naravnih alternativ, ki bi imeli primerljiv protimikrobni učinek, vendar veliko manjši negativni vpliv na človeka, živali in okolje.

V raziskovalni nalogi smo testirali nekatere naravne pripravke in soli, za katere naj bi veljalo, da imajo protimikrobni učinek. To so bili: cimet, majaron, soda bikarbona, čebula in čajevec. Protimikrobni učinek na glive smo preverjali tudi pri nekaterih bakterijah, ki so bile pridobljene iz žita. Bakterije so zajemale 9 različnih vrst iz rodu *Bacillus*, 3 vrste iz rodu *Paenibacillus* in bakterijsko vrsto *Pantoea agglomerans*.

Učinkovitost teh učinkovin smo preverjali na dveh glivah, in sicer *Alternaria alternata* in vrsto glive iz rodu *Fusarium*. Obe glivi lahko povzročata škodo na žitu in posledično kmetovalcem. Prav tako obe glivi v okolje sproščata mikotoksine, ki so nevarni za človekovo zdravje (NIJZ, 2017), zaradi česar morajo biti okuženi proizvodi zavrženi.

## 2. Teoretično ozadje

### 2.1 Glive, kot škodljiv mikroorganizem rastlin in semen

Glivne bolezni povzročajo ogromno škodo v agrikulturi po celem svetu. Rastline so namreč pogosto okužene s patogenimi glivami, kar vključuje glive, ki se nahajajo in prenašajo s semeni. Pri tem je patogen že prisoten v ali na površini semena in lahko povzroči gnitje samega semena ali vpliva na kaljenje. Semena igrajo ključno vlogo pri zdravju rastlin. Glive, ki se nahajajo na semenih nimajo vloge samo pri klitju semena in/ali bolezni rastlin temveč tudi trajno okužijo zemljo, ki potem predstavlja vir okužbe za nove posevke.

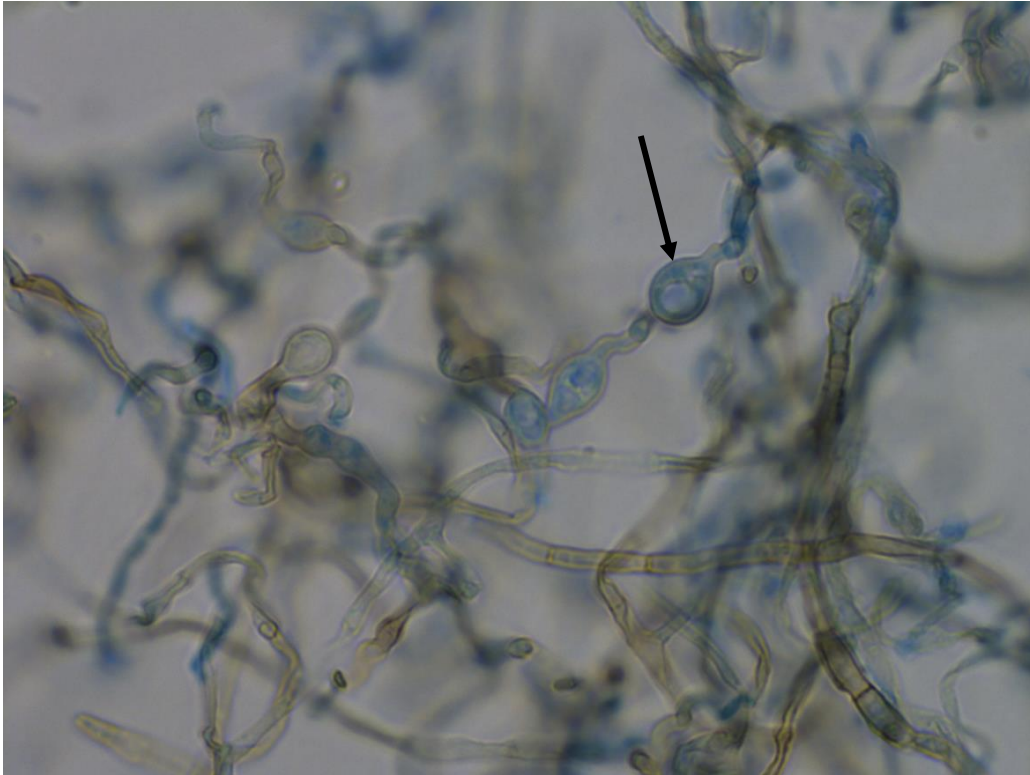
Najpomembnejše glive na semenih so različne vrste *Alternaria*, *Aspergillus*, *Ceratobasidium*, *Cercospora*, *Cochliobolus*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Microdochium*, *Penicillium*, *Pyricularia*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerophthora*, *Trichoderma* in *Tricoconellaare* (Pathak, 2013). Od naštetih gliv, smo v naši raziskovalni nalogi naravne učinkovine testirali na dveh pogostih predstavnikih na pšenici: *Alternaria alternata* in *Fusarium* sp.

#### 2.1.1 *Alternaria alternata*

Rod *Alternaria* uvrščamo v družino *Pleosporaceae*, deblo *Ascomycota*. Kolonije so olivno zelene barve z belim robom, ko rastejo na PDA ali DG18 trdnem gojišču, velike okrog 4 cm po 7-10 dneh rasti. Glivo prepoznamo z mikroskopskim pregledom morfoloških značilnosti. Tvorijo verige 6-14 konidijev (Slika 2) in občasno naknadnih verig 2-8 konidijev, ki so pomembna karakteristika te vrste.



Slika 1: Kolonije *Alternarije alternatae* na DG18 gojišču. (Vir: lasten vir)



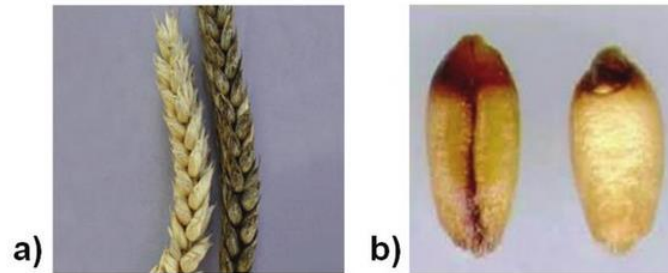
Slika 2: Verige konidijev in njihovo razvejanje glive *Alternaria alternata*. Puščica označuje konidij (vir: lastni vir)

*Alternaria alternata* povzroča škodo na mnogih kmetijskih pridelkih po več delih sveta. Bolezen povzroča na različnih požetih pridelkih, od različnega sadja in zelenjave, oreščkov do žita, vključno s pšenico.

Začetna točka okužbe, tako kot na splošno pri glivah, je pritrnitev spore na kutikulo rastline in kaljenju konidija na površini. Ko konidij kali, se pojavi kalitvena cevka, ki se razvije v apresorij. To je hifna nitka, ki ima vlogo prodiranja čez kutikulo in celično steno. Med okužbo gliva izloča tudi encime, polisaharide, in toksine, ki imajo vlogo pri razvoju bolezni (Rosalba, 2014, str. 147-187).

Glive rodu *Alternaria* so pogosti predstavniki mikrobiote na pšeničnih semenih. Učinek *Alternaria alternata* je mogoče prepoznati po črnih pegah na embrionalnih konicah semena (Slika 3). Bolezen se razvije pri odraslih rastlinah, na njen razvoj vpliva več dejavnikov, od količine dežja do gojitvenih praks (zalivanje zemlje, gnojenje,..), vrste žita, ... Glede na številne raziskave je črna pegavost, ki jo povzroča, posledica abiotičnega stresa, kot je obilica dežja, visoka vlažnost in ekstremne temperature. Poleg patogenosti na rastline in manjšanja

kvalitete semen lahko vrste *Alternaria* izločajo mikotoksine, ki so škodljivi za ljudi in živali. Proizvaja aflatoksine tipa dibenzo- $\alpha$ -pirona. Proizvaja tudi tenuazonsko kislino, ki je inhibitor sinteze beljakovin. (Chu, 2003).

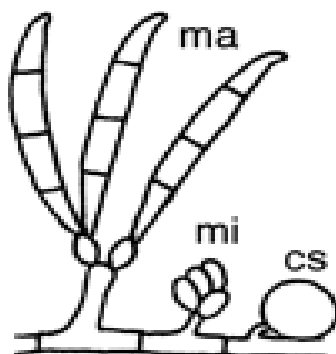


Slika 3: Simptomi okužbe z *Alternario spp.* na pšeničnem zrnju (konica semena, desna slika b.) in na žitnem klasu (leva slika a.) (vir: [https://www.researchgate.net/publication/278963830\\_Visual\\_instrumental\\_mycological\\_and\\_mycotoxicological\\_characterization\\_of\\_wheat\\_inoculated\\_with\\_and\\_protected\\_against\\_Alternaria\\_spp](https://www.researchgate.net/publication/278963830_Visual_instrumental_mycological_and_mycotoxicological_characterization_of_wheat_inoculated_with_and_protected_against_Alternaria_spp)) [dostopno 5.2.2020]

### 2.1.2 *Fusarium sp.*

Rod *Fusarium* uvrščamo v družino *Nectriaceae* in deblo *Ascomycota*.

Na gojišču PDA in DG18 tvorijo bele, kolonije, lahko tudi v barvi lososa ali sivke z žametno površino (Slika 5). Pri mikroskopiranju določamo za glivo značilne makrokonidije (Slika 4 in Slika 6)- večcelične strukture, po obliki podobne bananam ter mikrokonidije (ovalne enocelične strukture). Če so prisotni mikrokonidiji je njihova oblika, število celic (ponavadi 1-3) pomembno za identifikacijo vrst. Včasih se tvorijo tudi klamidiokonidiji (Ohara, 2004).

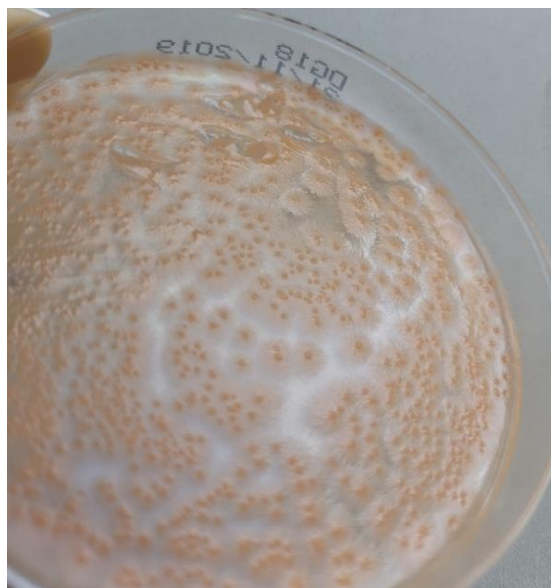


Slika 4: Prikaz makrokonidijev (ma), mikrokonidijev (mi) in klamidiokonidijev (cs) *Fusariuma sp.* (vir: <https://www.genetics.org/content/166/1/113>)

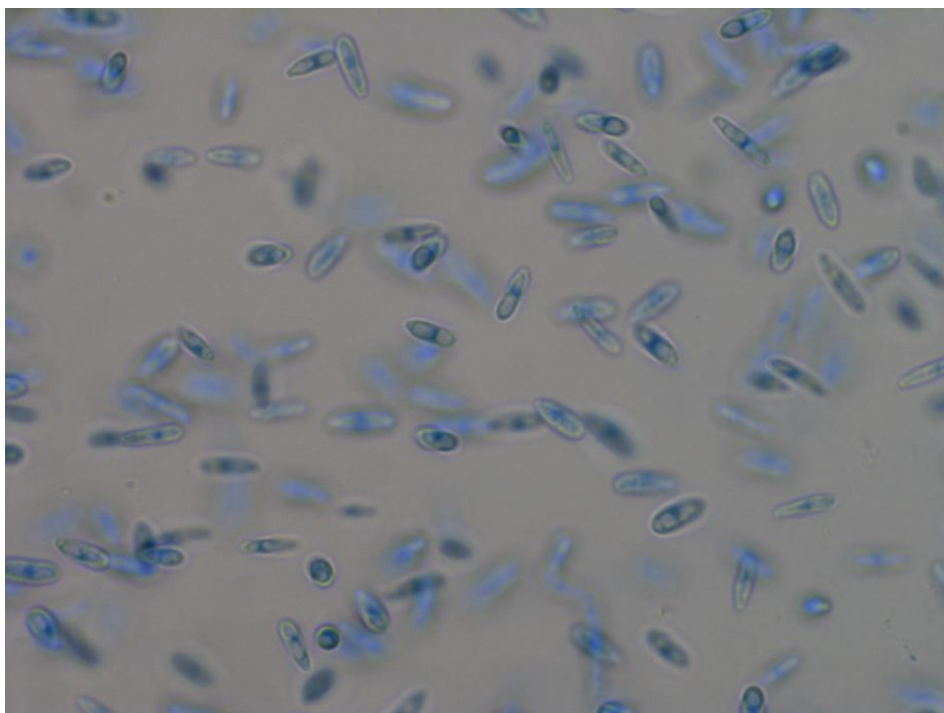
Glive rodu *Fusarium* so pogosto prisotne v zemlji. Sestavlja ga več kot 20 vrst, med katerimi je 14, ki so večjega pomena za pridelovalce rastlin zaradi obolenj, ki jih povzročajo. Te glive napadajo širok spekter rastlin, med katere spada tudi žitarice kot so žito, rž, oves, itd. Pri teh povzročajo fuzarioze klasov (Slika 7) Do okužbe klasa lahko pride od začetka tvorbe klasa do konca cvetenja. To je zato tudi optimalni čas preprečevanja tovrstnih okužb. Bolezen je resnejša, če do okužbe pride v času cvetenja, saj so takrat cvetovi v celoti odprti. Na začetku je vir hrane cvetni prah. Na pojav fuzarioz vpliva tudi: nepravilno kolobarjenje (žita – koruza – žita), obdelava tal brez oranja, občutljiva sorta.

Prisotne so na vseh večjih območjih pridelave žita v Evropi. Bolezen, ki jo povzročajo ima velik vpliv na količino (povprečno 10-40 odstotkov manjši proizvod) in kakovost pridelane pšenice (Early, 2009), (Pečan, 2015)

Sekundarni metaboliti gliv *Fusarium* (mikotoksini) negativno vplivajo na zdravje ljudi in živali. Pomembna predstavnika teh mikotoksinov sta DON (deoxynivalenol) in ZEA (zearelon).



Slika 5: Rast glive *Fusarium* sp. na gojišču DG18, ki smo jo uporabili v raziskovalni nalogi. (vir: lasten vir)



Slika 6: Makrokonidiji, po obliki bananam podobne večcelične strukture *Fusarium sp.* (vir: lasti vir)



Slika 7: Levo: simptomi fuzarioze klasa na pšeničnem klasu, Desno: roza obarvanje zaradi velike količine spor *Fusarium sp.* na klasu. (vir: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2003/fhb/>)

## 2.2 Fungicidi

Zaradi nezaželenih učinkov, ki jih povzročajo glive na rastočih rastlinah, semenih in njihovih plodovih, njihovo rast zaviramo oziroma onemogočamo z uporabo posebnih snovi. Te imenujemo fungicidi. Fungicidi so lahko sintetični, torej jih pridelamo v laboratorijih in se ne pojavljajo v naravi oziroma se pojavljajo v zelo majhnih količinah. V to skupino prištevamo tudi fungicide, katerih aktivna sestavina je organska, torej vsebuje ogljik, če te niso pridobljene iz živečih organizmov, ali pa niso naravnega izvora, torej jih ne pridelajo živeči organizmi. Z

uporabo fungicidov omogočimo večjo verjetnost preživetja rastlin do odraslosti, kar pomeni večji pridelek v agrikulturi in omogoča večjo oskrbljenost prebivalstva s hrano. Prav tako omogoča, da se ta hrana ohrani dalj časa, saj so glive ene izmed povzročiteljev gnitja in njihova odsotnost podaljšuje življenjsko dobo hrane. V spodnji tabeli so prikazani živilski proizvodi in z njimi povezane bolezni, ki jih fungicidi preprečujejo.



Tabela 1: Glive, ki povzročajo pomembne bolezni, katerih rast preprečujemo s fungicidi (vir: prirejeno po <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/fungicide>)

Pridelki	Glive, ki povzročajo pomembne bolezni pred katerimi ščitijo fungicidi
Ječmen	<i>Ustilago nuda</i> in <i>Puccinia striiformis</i>
Riž	<i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Piricularia oryzae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> in <i>Thanatephorus cucumeris</i>
Pšenica	<i>Puccinia</i> spp., <i>Tilletia</i> spp., <i>Ustilago</i> spp.
Krompir	<i>Phytophthora infestans</i>
Kakavovec	<i>Phytophthora palmivora</i>
Kava	<i>Hemileia vastatrix</i> in <i>Colletotrichum coffeanum</i>
Banane	<i>Mycosphaerella</i> spp. in <i>Fusarium oxysporum</i>
Grozdje	<i>Uncinula necator</i> , <i>Plasmopora viticola</i> in <i>Botrytis cinerea</i>
Bombaž	<i>Alternaria macrospora</i>
Zelenjava	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> , <i>Verticillium</i> spp. in <i>Pythium</i> spp.
Sladkorna	<i>Cerospora</i> spp.

### 2.2.1 Sintetični fungicidi

Sintetični fungicidi se pogosteje uporabljajo, zaradi svoje večje učinkovitosti, ki nam daje večjo zaščito in omogoča natančnejšo delovanje zaradi svoje specializiranosti. Obstajajo tudi fungicidi s širokim spektrom delovanja, ki temeljijo na aktivnih snoveh kot so klorpikrin, metil bromidi in formaldehid, vendar je uporaba tovrstnih fungicidov v mnogih državah zaradi njihove strupenosti strogo nadzorovana ali pa prepovedana. (Encyclopaedia Britannica, 2020).

V Sloveniji je dovoljena uporaba mnogih sintetičnih fungicidov, katerih aktivne snovi so:

Prokloraz , Ciprokonazol, Difenokonazol, Epoksikonzazol, Metkonazol, Propikonazol, Tebukonazol, Tetrakonazol, Triadimenol, Protiokonazol, Fenpropidin, Fenpropimorf, Spiroksamin, Biksafen, Fluksapiroksad, Lzopirazam, Azoksistrobin, Pikoksistrobin, Piraklostrobin, Trifloksistrobin, Piraklostrobin Trifloksistrobin, Klorotalonil, Mankozeb in Žveplo (KIS, 2020).

Kljub mnogim prednostim, ki jih imajo sintetični fungicidi, moramo njihovo uporabo omejiti na minimum, saj imajo škodljive učinke na zdravje človeka in živali. Ti zajemajo motnje hormonskega ravnovesja, zmanjšanje oksidativnih procesov, sprememba barve kože, draženje

kože (srbečica, rdečica, otekline, izpuščaji, mehurji, kemijske opekline) in draženje sluznice. Natančni mehanizmi delovanja sintetičnih fungicidov na človeško telo še niso povsem znani (Šarc, 2020).

Negativni učinki sintetičnih fungicidov se ne poznajo le pri človeku temveč tudi pri živalih. Ene izmed teh živali so čebele, ki so eden izmed glavnih opraševalcev na področju Evrope in bi zmanjšanje njihovega števila negativno vplivala tako na biodiverzitetu v ekosistemih in njihovo stabilnost, kot kmetijstvo in posledično gospodarstvo. Raziskava, ki je bila izvedena na tem področju, je dokazala, da na populacijo čebel negativno vplivajo tako insekticidi, kot fungicidi. Negativno delovanje sintetičnih fungicidov ni omejeno samo na čebele, temveč lahko vplivajo tudi na druge opraševalce v ekosistemu (Park, 2015).

### 2.2.2 Naravni fungicidi

Rešitev slabosti sintetičnih fungicidov so lahko naravni fungicidi. Ti lahko imajo veliko manjši negativni vpliv na okolje in ljudi in bi s tem omogočali večjo produktivnost v kmetijstvu, brez stranskih posledic, ki jih prinašajo trenutni ukrepi proti razraščanju gliv (Martínez, 2012).

Interes za uporabo naravnih alternativ sintetičnim fungicidom narašča. Članek o možnih fungicidih je objavil tudi Kmetijsko gospodarski zavod Slovenije (KGZS). V tem članku je napisano, da se lahko naravni fungicidi uporabljajo kot preventivno sredstvo za preprečevanje obolenj in tudi njihovo zdravljenje. Njihovi predstavniki so: njivska preslica, čebula, kopriva, drobnjak, baldrijan, bezeg, kamilica, hren, ognjič, žajbelj, mleko, soda bikarbona, jabolčni kis, morske alge in zeleni čaj. Način izdelave se med različnimi fungicidi razlikuje, vendar je večina pripravljena z namakanjem v vodi, nekateri pa s pripravo čaja (Ogorelec, 2015).



Slika 8: Naravni fungicid (vir: [http://scotdir.com/wp-content/uploads/2015/10/the-best-natural-fungicides\\_1.jpg](http://scotdir.com/wp-content/uploads/2015/10/the-best-natural-fungicides_1.jpg))

Našteti fungicidi se med seboj razlikujejo po svoji učinkovitosti in širini spektra delovanja. Žajbelj, na primer, ima dobro učinkovitost, vendar ima tudi široki spekter delovanja, kar pomeni, da zavira tudi rast gliv, ki živijo v sožitju z rastlino in ji pomagajo pri njenem razvoju in življenju (Ogorelec, 2015).

Te pomanjkljivosti bi bilo mogoče minimalizirati z uporabo optimalnih koncentracij fungicida, kar bi omogočalo največji učinek na željeno glivo in imelo pri tem najmanj nezaželenih posledic. Prav tako bi se lahko uporabila mešanica fungicidov za primere, kjer je določitev vrste patogene glive otežena, ali pa želimo rastlino zaščititi pred več škodljivimi vrstami gliv istočasno. Možnosti optimizacije uporabe naravnih fungicidov so mnoge.

#### 2.2.2.1 Soda bikarbona

Glavna lastnost sode bikarbone ( $\text{NaHCO}_3$ ), da ko je raztopljena v vodi tvori bazično raztopino. Zaradi tega je metabolizem gliv, ki živijo v kislih okoljih, upočasnen. Zaradi bazičnega okolja, pa umre le malo gliv in je velika večina gliv sposobna nadaljevati z razmnoževanjem, ko so ponovno izpostavljene kislemu okolju (Chalker-Scott, 2009).

#### 2.2.2.2 Čebula

Čebula vsebuje mnoge sestavine, ki zavirajo rast gliv. Nekatere od teh so sintezni inhibitorji, kot so na primer fenoli, ki so prisotni v obarvanih zunanjih slojih čebulice. Prav tako je čebula sposobna proizvajati ciklopentan fitoaleksin, ki se začne nabirati na mestu okužbe. Količina proizvedene protimikrobne snovi ob stiku z različnimi mikroorganizmi se razlikuje glede na vrsto. Tako je na primer bila pri eni od raziskav koncentracija protimikrobne učinkovine pri okužbi z glivo *Botrytis allii* manjša kot pri drugih patogenih glivah (Martínez, 2012).



Slika 9: Čebula (vir: [https://images-na.ssl-images-amazon.com/images/I/81UeYuulNjL.\\_SY355\\_.jpg](https://images-na.ssl-images-amazon.com/images/I/81UeYuulNjL._SY355_.jpg))

#### 2.2.2.3 Olje čajevca

Pri testiranju je bil uporabljen olje čajevca britanskega proizvajalca Xpel Marketing Ltd.. Glavne aktivne snovi v olju čajevca so 1,8-evkaliptol,  $\alpha$ -terpineol in terpinen-4-ol (Hammer, 2004). Olje čajevca je že bilo testirano na nekaterih vrstah *Fusarium*, kjer se je izkazalo za učinkovitega (Terzi, 2007). Natančni mehanizmi delovanja teh snovi na glive so trenutno še neznani (Hammer, 2003)



Slika 10: Olje čajevca (vir: lasten vir)

#### 2.2.2.4 Majaron

Majaron (lat. *Origanum majorana*) je predstavnik roda *Origanum*, v katero spada tudi navadna Dobra misel (lat. *Origanum vulgare*). V testiranjih se je ta pokazala za učinkovito proti bakterijam, kasneje se pa je ugotovilo, da ima tudi učinek na glive. Vsebovani aktivni snovi sta 2-metil-5-fenol in 5-metil-2-fenol (Martínez, 2012). Zaradi tega smo sklepali, da je možno da ima podobne učinke tudi *Origanum majorana*.



Slika 11: Majaron (vir: <https://poljubnarave.si/wp-content/uploads/2017/12/majaron-ni-zgolj-za%C4%8Dimba.jpg>)

### 2.2.2.5 Cimet

Cimet vsebuje dve glavni aktivni snovi, ki preprečujeta rast glivam. Prva je 3-fenil-2-propenal, druga pa je eugenol, ki ga je od vseh esencialnih olj le 8 odstotkov, medtem ko je 3-fenil-2-propenala kar 75 odstotkov. Obe snovi inhibirata rast spor. Učinek naj bi imel predvsem na predstavnike rodov *Aspergillus* in *Penicillium* (Martínez, 2012).



Slika 12: Cimet (vir: <https://www.bbcgoodfood.com/sites/default/files/guide/guide-image/2016/08/health-benefits-of-cinnamon-main-image-700-350.jpg>)

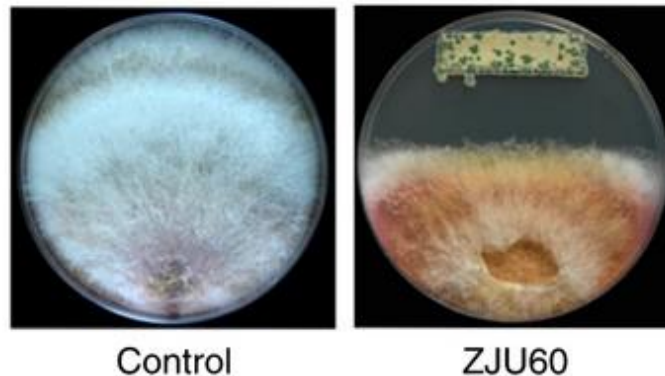
### 2.3 Vpliv bakterij mikrobioma pšenice na patogene glive

Fiziologija rastline in njeno delovanje je močno odvisno od njenega mikrobioma. Mikrobno združbo rastlin (mikrobiom) sestavlja do več tisoč bakterij, gliv in protistov. Ti se nahajajo na koreninah in nadzemnih delih rastline.

Bakterije in glive sta dve glavni skupini rastlinskega mikrobioma in interakcije med tema dvema skupinama imajo velik pomen pri oblikovanju celotne združbe. Interakcije in komunikacija poteka preko izločanja protimikrobnih učinkovin, signalnih molekul, spreminjanje fizikalnokemijskih značilnosti okolja, ... ki vodi tako do antagonizma (negativnega učinka enega na drugega) kot do sodelovanja. Pri kmetijskih rastlinah, se raziskave interakcij osredotočajo predvsem na bakterijske protimikrobne učinkovine, ki bi zavirale škodljive glive. Poleg tvorbe protiglivnih učinkovin so koristne bakterije sposobne razgrajevanja glivnih dejavnikov virulence in povečujejo sistemsko odpornost rastlin proti fitopatogenim glivam.

Uporaba koristnih bakterij bi lahko nadomestila ali zmanjšala uporabo fitofarmaceutskih sredstev, ki so trenutno v uporabi. Njihova uporaba, kot omenjeno škoduje zdravju človeka,

živali in okolja. Poleg tega se pojavljajo glive, ki so odporne na ta sredstva in pri sub-letalnih koncentracij vzpodbudijo tvorbo mikotoksinov (Chen 2018).



Slika 13: Testiranje in prikaz inhibicije bakterije na škodljivo glivo. Levo: kontrola, desno: bakterijska inhibicija rasti glive-bakterije se nahajajo na zgornjem kvadratu . (vir: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05683-7>)

### 3. Raziskovalna vprašanja in hipoteze

Glavna raziskovalna tema je bilo določanje vpliva naravnih pripravkov, soli in izbranih bakterij na škodljive glive iz semenih žit. V sklopu tega smo želeli odgovoriti na naslednja vprašanja:

- Kateri naravni pripravki bodo imeli vpliv na dve izbrani glivi, ki lahko škodujeta semenu, kaljenju in razvoju rastline?
- Bo kateri od izbranih naravnih fungicidov vplival na kaljivost semen?
- Ali bo na rast gliv vplival kateri od bakterijskih izolatov iz žita?

#### 3.1 Hipoteze

1. Vsaj eden izmed izbranih naravnih fungicidov bo imel primerljivi učinek s sintetičnim.
2. Naravni pripravki se bodo med seboj razlikovali v učinkovitosti na zaviranje rasti gliv in kaljivost semen.
3. Eden od izbranih bakterijskih izolatov iz pšenice bo imel negativen vpliv na glivno rast.

## 4. Metode in materiali

### 4.1 Seznam materiala

- glivni izolat *Fusarium sp.*
- glivni izolat *Alternaria alternata*
- bakterijski izolati iz žita
- Olje čajevca
- Čaj majarona
- Sok čebule
- Soda bikarbona
- Cimet v prahu
- Sintetično fitofarmaceutvsko sredstvo
- Centrifugirke
- Gojišče DG 18 z dodanim kloramfenikolom (Biolife)
- Gojišče DG 18 brez kloramfenikola (Biolife)
- Gojišče TSA (Sigma-Aldrich)
- Avtomatska pipeta (Eppendorf)
- Cepilne zanke (eza)
- Razmazovalna palčka (hokejka)
- Laminarij
- Pšenična zrna
- Filter papir
- Pufer PBS (phosphate buffered saline).
- Kljunasto merilo
- Sterilni diski za mikrobiološko uporabo (Sigma-Aldrich)
- Sterilna destilirana H<sub>2</sub>O
- Tween-80 (BioRad)

### 4.2 Pridobivanje in priprava materiala

V okviru raziskovalne naloge smo testirali vpliv naravnih učinkovin in izbranih bakterijskih izolatov iz žita na rast dveh izbranih gliv. V ta namen smo mikroorganizme gojili, pripravili ustrezne suspenzije in jih nacepili na gojišča, kjer je potekalo testiranje.

Izolati gliv *Alternaria alternata* in *Fusarium sp.* so bili osamljeni na Oddelku za mikrobiološke raziskave (OMR, Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH)). Sestavine za naravne fungicide so bile kupljene v trgovini in pripravljene v delovno raztopino v



raziskovalnem laboratoriju OMR, NLZOH. Gojišča so bila pridobljena od proizvajalca Biolife. Eksperimentalno delo je potekalo v laminarju na NLZOH.

#### 4.2.1 Priprava suspenzije gliv

Glive smo nacepili na gojišče DG18 in inkubirali 7 dni pri temperaturi 30 °C. Posamezno ploščo smo nato prelili s 5 mL 0,05% raztopine Tween-80 (BioRad) in s hokejko podrgnili po plošči. Vso suspenzijo smo iz plošče nato odpipetirali v sterilno centrifugirko.

#### 4.2.2 Priprava bakterijskih izolatov

Izolate smo nacepili na gojišče TSA (Sigma-Aldrich) in ga inkubirali dva dni. Iz plošče smo pobrali 10 µl kulture z umerjeno cepilno zanko, resuspendirali v 700 µl pufra PBS in vorteksirali (dobro premešali, da smo dobili homogeno bakterijsko suspenzijo). Skupno 100 µl tako pripravljene suspenzije smo prenesli na svežo, tanjšo (približno 3 mm debelo) gojišče in enakomerno razmazali s hokejko. Iz gojišča smo pripravili kvadrate (približno 1,5 cm x 1 cm), ki smo jih uporabili v testiranju učinka na glive. V testiranje smo vključili 3 različne vrste bakterij rodu *Paenibacillus*, 9 vrst *Bacillus* in izolat *Pantoea agglomerans* (ena najpogostejših bakterijskih vrst, ki se nahaja na pšenici). (primer testiranja: Slika 19; Slike vseh gojišč testiranja izolatov se nahajajo v Prilogi)

Tabela 2: Seznam izolatov, ki smo jih vključili v testiranje vpliva na rast izbranih gliv

Oznaka izolata	Vrsta izolata
ZZV19-10645	<i>Paenibacillus hordei</i>
ZZV19-10646	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>
ZZV19-10628	<i>Paenibacillus nicotianae</i>
ZZV19-10503	<i>Bacillus megaterium</i>
ZZV19-10504	<i>Bacillus subtilis</i>
ZZV19-10505	<i>Bacillus mycoides</i>
ZZV19-10408	<i>Bacillus muralis</i>
ZZV19-10409	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ZZV19-10675	<i>Bacillus jeotgali</i>
ZZV19-10507	<i>Bacillus pumilus</i>
ZZV19-10497	<i>Bacillus altitudinis</i>
ZZV19-10501	<i>Bacillus simplex</i>
ZZV19-10621	<i>Pantoea agglomerans</i>

### 4.3 Priprava redčitvene vrste in izračun CFU

Zaradi majhne velikosti mikroorganizmov, je določanje njihovega števila dokaj težavno. Pri tem si pomagamo z uporabo metode izračuna števila CFU (angl. colony forming units). To so posamezne celice, ki so se sposobne namnožiti in tvoriti kolonijo mikroorganizmov. Uporabljamo ga za ocenjevanje števila prisotnih mikroorganizmov. Ta številka je le ocena in je lahko manjša od števila prisotnih celic, saj se mikroorganizmi lahko združujejo v skupine, v katerih so medsebojno povezane (npr. bakterije streptokoki in stafilokoki) Glive pa se pretežno razmnožujejo s sporami.

Za določanje CFU je potrebno nanesti suspenzijo mikroorganizmov na gojišče, kjer se lahko vidi število nastalih kolonij. Vendar je mnogokrat koncentracija mikroorganizmov tako velika,

da porastejo celotno gojišče. Zato je suspenzijo, za zanesljive rezultate, potrebno redčiti. To storimo s pripravo redčitvene vrste.

Redčitveno vrsto pripravimo tako, da iz osnovne suspenzije (s koncentracijo 1) vzamemo eno enoto (pogosto ml) tekočine in jo dodamo devetim enotam sterilne tekočine. Pri tem je koncentracija novo pridobljene suspenzije  $10^{-1}$ . Proces lahko ponavljamo, dokler ne dobimo željene razredčine. Pri uporabi tovrstne metode pridobimo suspenzije s koncentracijami  $10^{-n}$ ; pri čemer je  $n$  naravno število.

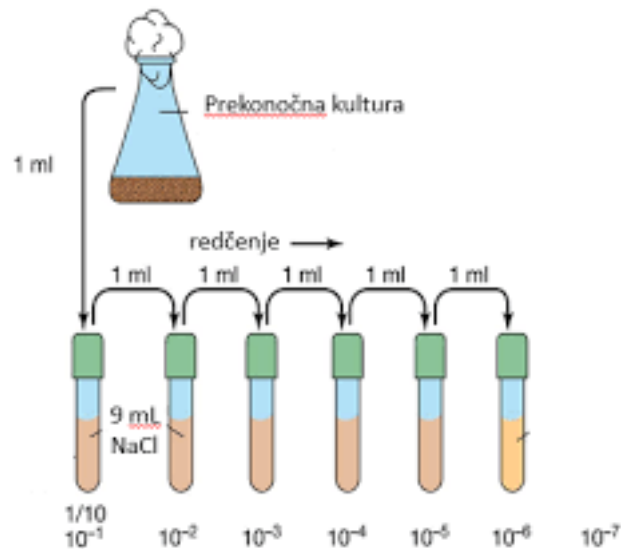
Na gojišče nanese eno desetino (10 odstotkov) suspenzije. S tem smo še zmanjšali število CFU za faktor 10. Ko na gojišču zrastejo kolonije, jih preštejemo. To je lahko storjeno s računalnikom ali ročno. Dobljeno število kolonij označimo z neznanko  $x$ . Za večjo natančnost lahko poskus izvedemo večkrat, pri čemer za število kolonij vzamemo povprečje vseh CFU določene redčine in koncentracijo izračunamo po naslednji formuli:

$$\text{št. CFU} = \bar{x} \times 10^{n+1}$$

Pri čemer je  $n$  enak stopnji redčine suspenzije, ki je bila nanešena na gojišče. Torej, če je  $\bar{x} = 120$  in redčina suspenzije, ki je bila nanešena na ploščo  $10^{-5}$  se koncentracija CFU/ml izhodne suspenzije izračuna na naslednji način:

$$c = 120 \times 10^{5+1} \text{ CFU/ml}$$

$$c = 1,2 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$$



Slika 14: Redčitvena vrsta (vir: <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcS0k42CeUH5Kr4SgOKgAVeili91mhjjPJWNbXlqz41AnCdxLWK08A&s>). V našem primeru smo prenašali po 100  $\mu\text{L}$  v 900  $\mu\text{L}$

#### 4.4 Priprava disk dilucijskega antibiograma

Za testiranje učinkovitosti izbranih pripravkov smo uporabili disk dilucijski antibiogram. Tega smo pripravili tako, da smo na posamezno gojišče DG18 s kloramfenikolom nanesli suspenzijo z določeno glivo (100  $\mu\text{L}$   $10^{-4}$  *Fusarium sp.* in  $10^{-1}$  suspenzije *Alternaria alternata*) in jo enakomerno razporedili po plošči z razmazovalno palčko (hokejko). Nato smo na gojišče dali diske, ki so bili prepojeni s izbranimi pripravki (natančne koncentracije v poglavju 4.5) in izmerili inhibicijsko cono okrog diska-del gojišča brez vidne rasti, ta nam namreč pove, kako učinkoviti je pripravek v zaviranju rasti gliv. Pri izvedenem eksperimentu smo imeli pozitivno in negativno kontrolo. Za negativno kontrolo smo uporabili disk, ki je bil prepojen s sterilnim PBS. Za pozitivno kontrolo pa smo uporabili disk prepojen s sintetičnim fungicidom, ki se uporablja za razkuževanje pšenice. Tekom eksperimenta smo testirali še sterilnost diskov in pripravkov. Gojišča smo nato hranili pri 30 °C za 5 dni in nato izmerili inhibicijsko cono s kljunastim merilom. Poskuse smo izvajali v paralelkah, da preverimo ponovljivost rezultata.

#### 4.5 Testiranje vpliva bakterijskih izolatov na rast gliv

Testiranje je bilo osnovano na objavi Chen in sodelavcev (Chen, 2018). Na kratko, na gojišče DG18 brez kloramfenikola (da ne uničimo bakterij, ki smo jih vključili v testiranje) smo nanegli posamezni glivi, podobno kot pri antibiogramu ( $100 \mu\text{l } 10^{-4}$  *Fusarium sp.* in  $10^{-1}$  suspenzije *Alternaria alternata*) in nanje položili kvadratke z nacepljenimi bakterijami, inkubirali 5 dni na  $30^\circ\text{C}$ , pri čemer smo plošče pregledali pri 3, 4 in 5 dneh.

#### 4.6 Priprava in koncentracije pripravkov

Pri pripravi sredstev za testiranje smo zaradi medsebojne raznolikosti pripravkov morali uporabiti različne metode priprave. S pripravljenimi delovnimi raztopinami smo nato prepojili diske (približno  $50 \mu\text{l}$  raztopine na disk) in jih položili na ploščo z ravno nacepljenimi glivami.

Postopki priprave delovnih raztopin so natančneje opisani spodaj.

- Majaron smo testirali v obliki čaja. V  $250 \text{ ml}$  vrele sterilne destilirane vode smo dodali 4 čajne žličke suhega majarona, pustili stati  $5 \text{ min}$  in odcedili. Pri testiranju smo uporabili hladen čaj.
- Sintetični fungicid smo redčili tako, da smo  $10 \mu\text{l}$  fungicida dodali  $10 \text{ ml}$  sterilne destilirane vode ( $0,1 \%$ ).
- Čebulni sok smo pripravili tako, da smo sesekljali odraslo čebulo in jo nato s sterilno brizgo stisnili in zbrali sok. Za testiranje smo uporabili neredčen sok.
- Sodo bikarbono smo uporabili v koncentraciji  $0,25 \text{ g} / 1 \text{ ml}$ , ki smo jo pripravili s sterilno destilirano vodo.
- Cimet smo pripravili tako, da smo  $0,1 \text{ gramu}$  cimeta dodali  $1 \text{ ml}$  sterilne destilirane vode.
- Olje čajevca (Xpel Marketing Ltd) je bilo uporabljeno v neredčeni obliki.

Tabela 3: Koncentracije testiranih pripravkov

Pripravek	Delovna raztopina
Soda bikarbona	0,25 g /ml
Čebula	Neredčen sok čebule
Cimet	0,1 g/ml na gojišče
Čajevec	Neredčen pripravek
sintetični fungicid	0,1 %

#### 4.7 Testiranje kaljivosti

V raziskovalni nalogi smo želeli preveriti tudi učinek fungicidov na kaljivost semen, saj je nesmiselno uporabljati fungicid, ki zavira klitje semen. To smo želeli testirati z naslednjim eksperimentom.

Plastično posodo smo oprali s 5% varikino , dvakrat sprali s pitno vodo in posušili. Vanjo smo nato položili filter papir, ki smo ga zložili v obliko harmonike, da smo dobili ločene kanale. Papirnato brisačo smo nato omočili s sterilno destilirano vodo, ki jo semena potrebujejo za klitje. Nato smo v vsako vrsto postavili deset semen, na katera je bil nanešen fungicid v razmaku 1 cm. Fungicidi za ta poskus so bili enaki, kot za antibiogram (Tabela 3 ), razen cimeta-cimet smo pri zrnih uporabili v obliki prahu. Pri eksperimentu smo imeli tudi kontrolo, pri kateri smo v kanal dali deset semen, na katera ni bil nanešen noben fungicid. Semena smo nato hranili na sobnih pogojih sedem dni in preverili tvorbo kalčkov.

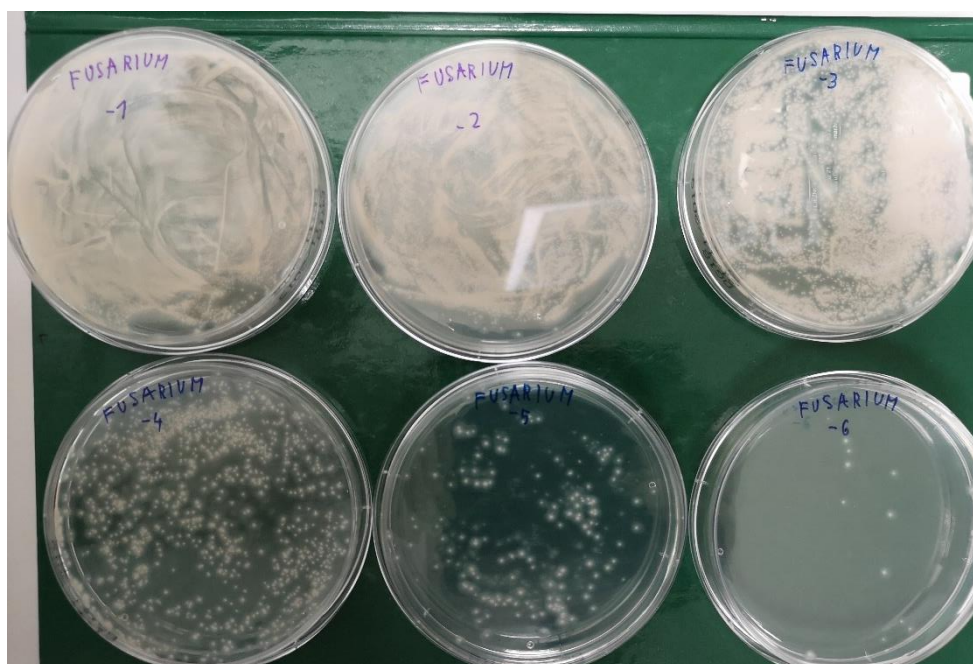
## 5. Rezultati

### 5.1 Določitev števila enot, ki tvorijo kolonije v suspenziji.

Za testiranje protimikrobnega delovanja naravnih učinkovin smo najprej morali pripraviti primerno suspenzijo glivnih celic (delovno suspenzijo). Želeli smo uporabiti suspenzijo, ki bo na plošči podala enakomerno porast CFU po celi plošči (Slika 15, razredčina  $10^{-4}$ ), ki se po inkubaciji 5 dni stikajo. To smo naredili s pripravo redčitvene vrste, na način, ki smo ga opisali v poglavju 4.3.

Prirpavili smo razredčine  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ .

Števne plošče so bile tiste, kjer smo po 3-5 dneh lahko ločili še posamezne kolonije, vendar niso presegale 300 kolonij/ploščo.



Slika 15: Razredčitvena vrsta *Fusarium sp.* (vir: lasten vir)

Tabela 4:Število poraslih kolonij pri redčitveni vrsti glivnih suspenzij in vrednost CFU v osnovni (založni) suspenziji.

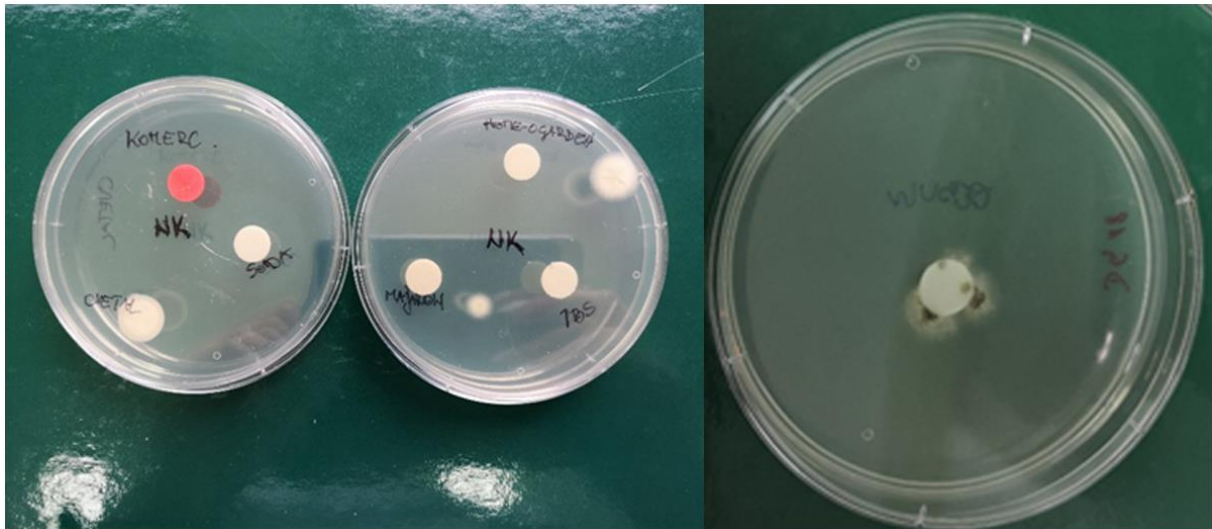
Redčina v epici		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	Število CFU/ml
Število CFU	<i>Fusarium sp</i>	neštevno	neštevno	neštevno	neštevno	135	12	$1,3 \times 10^8$
	<i>Alternaria alternata</i>	neštevno	15	0	0	0	0	$1,5 \times 10^4$

Na osnovi redčitvenih vrst vidimo, da je založna suspenzija *Fusarium sp.* bolj koncentrirana, kot suspenzija *Alternaria alternata*. Na osnovi dobljenih rezultatov smo za poskus pri *Fusarium* uporabljali redčino  $10^{-4}$ , pri *Alternaria alternata* pa  $10^{-1}$ , ki sta bili zadnji neštevni zaporedni redčini.

## 5.2 Inhibicijske cone

Učinek testiranih naravnih učinkovin je prikazan v Tabelah 5,6 in 7 ter Grafu 1.

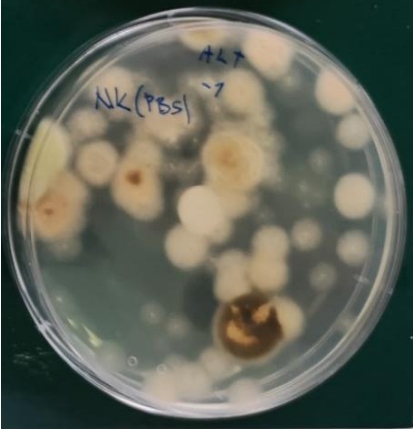


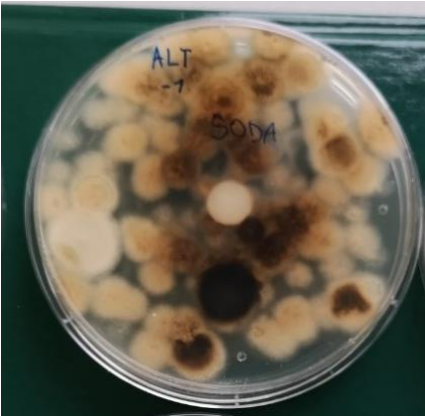
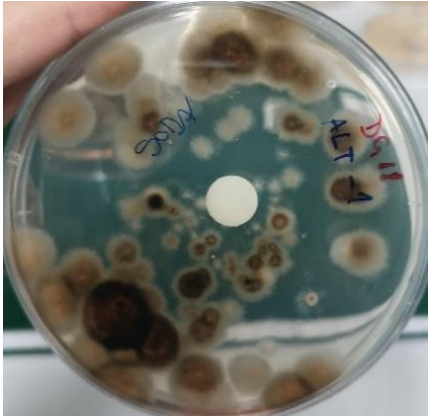
Pri testiranju sterilnosti diskov in suspenzij so glive v manjši meri porasle le iz soka čebule.



Slika 16: Testiranje sterilnosti pripravkov. Disk s sokom čebule na gojišču DG18- difuzijskega antibiogram (na desni)-okrog diska vidimo manjšo rast gliv.



Tabela 5: Slikovni prikaz rezultatov testiranja pripravkov z *Alternario alternato*

<p><i>Alternaria alternata</i>/naravna učinkovina</p>	<p>Učinek sredstva</p>	
	<p>1. Ponovitev</p>	<p>2. ponovitev</p>
<p>NK (disk s pufrom PBS- brez fungicida)</p>		<p>Ni delana</p>
<p>PK (sintetični fungicid)</p>		
<p>Soda bikarbona (0,25 g /ml)</p> <p>Učinek slikan na dan 7 in dan 5. Na dan 7 učinek ni več viden.</p>	<p>Dan 7</p> 	<p>Dan 5</p> 

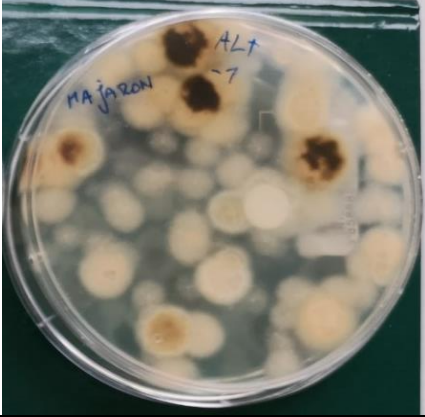

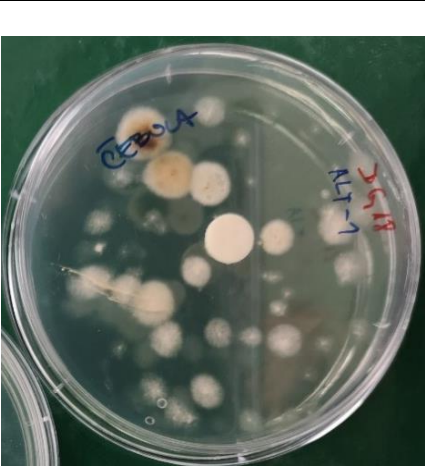

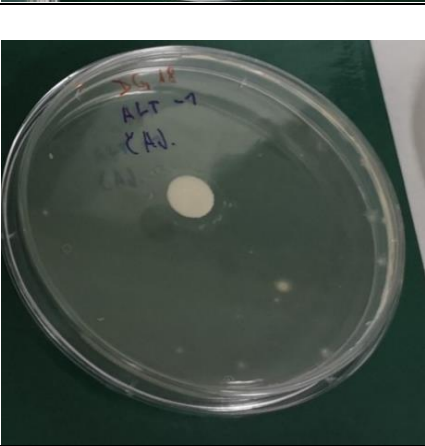
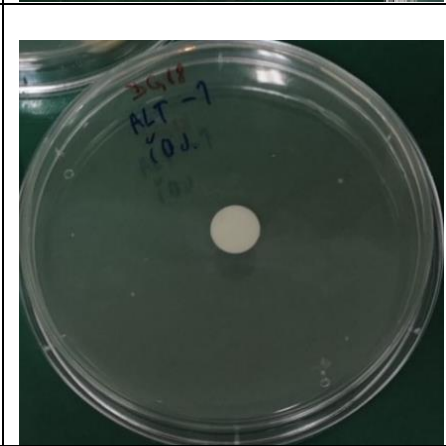
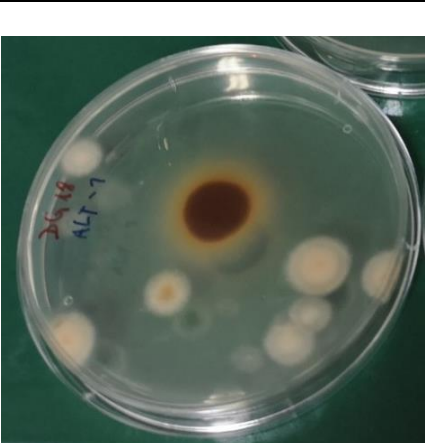
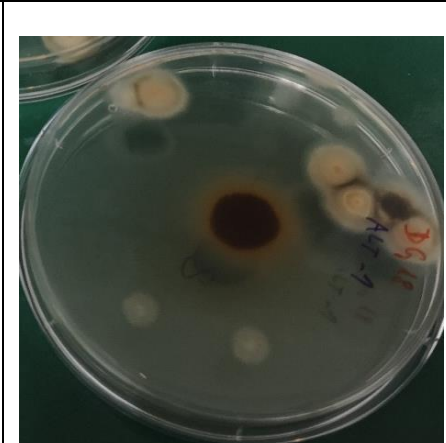
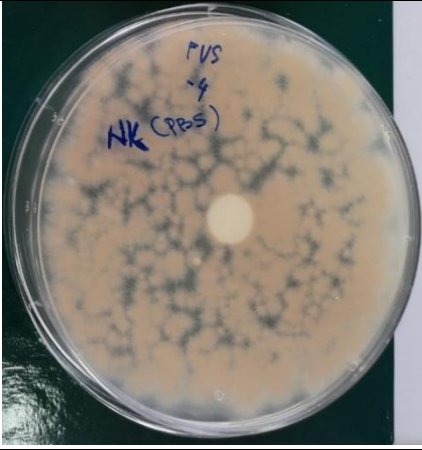


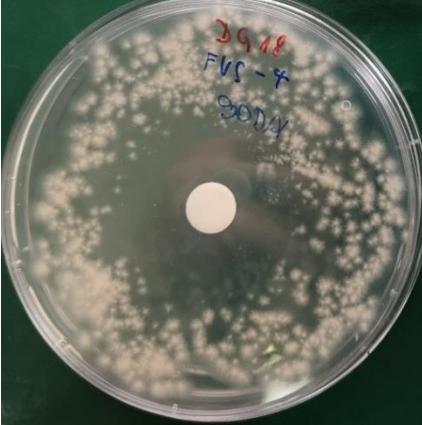
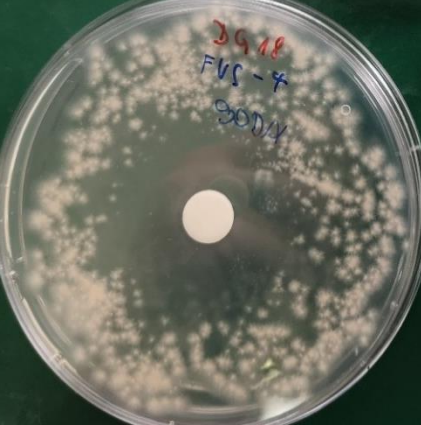
<p>Majaron (majaronov čaj)</p>		
<p>Čebula (neredčen sok čebule)</p>		
<p>Čajevec (neredčen pripravek)</p>		
<p>Cimet (0,1 g/ml na gojišče)</p>		


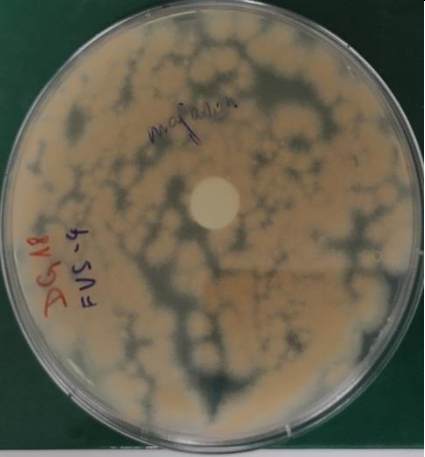
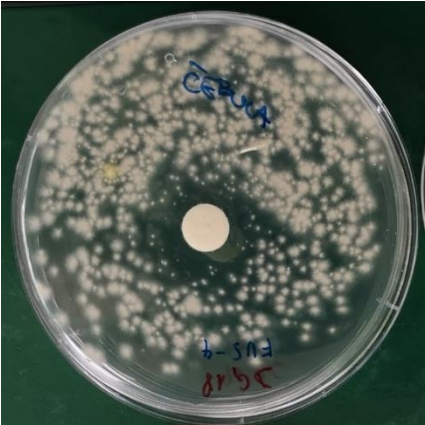
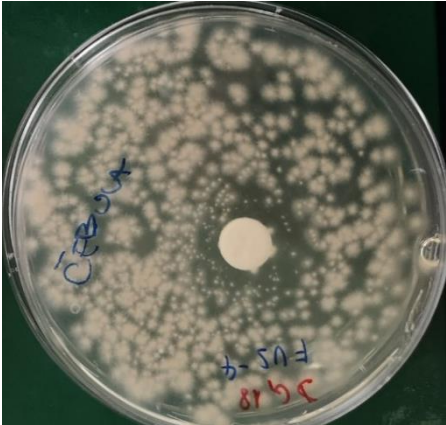
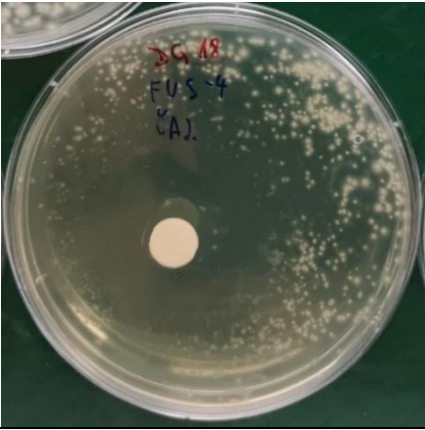
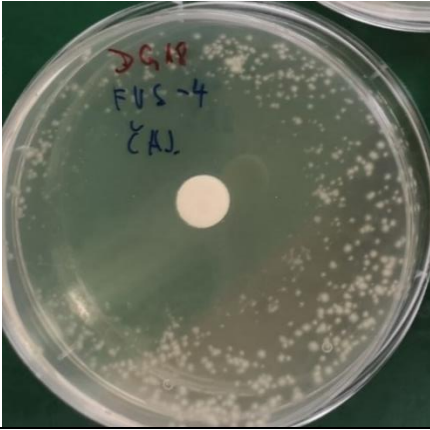

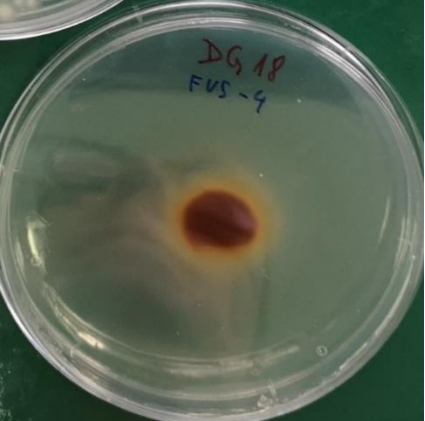
Tabela 6: Opisni prikaz rezultatov testiranja pripravkov z *Alternaria alternata*

Alternaria alternata/naravna učinkovina	Učinek naravne učinkovine
PK (sintetični fungicid)	V premeru približno 3 cm so kolonije manjše
Soda bikarbona	V premeru okrog 3 cm kolonije manjše
Majaron	Ni sprememb v rasti
Čebula	Ni omejene cone z večjo spremembo v rasti, vendar opazimo spremembe po celotni plošči- kolonije so nekoliko manjše, njihovo število nižje
Čajevec	V <b>coni &lt;4 cm</b> ni nobene rasti, v preostalem delu je rast močno okrnjena v številčnosti in velikosti kolonij
Cimet	V <b>coni &lt;1 cm</b> ni nobene rasti, v preostalem delu je število kolonij manjše, kolonije pa so enake velikosti kot pri negativni kontroli.

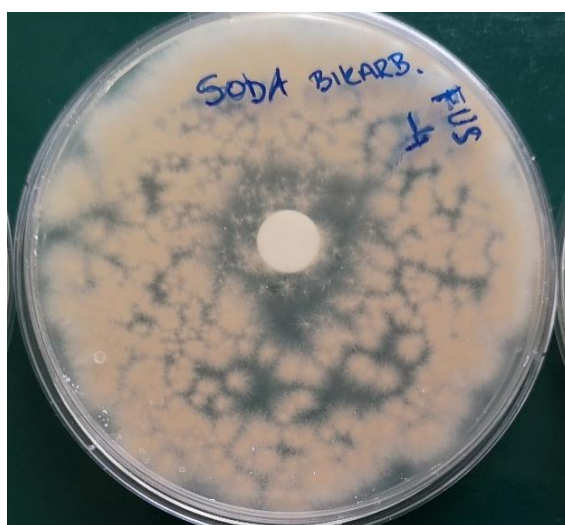
Inhibicijsko cono smo pri glivi *Alternaria alternata* določili le pri čajevcu in cimetu. Cimet in čajevec sta imela vpliv tudi na preostalo rast izven cone inhibicije (Tabela 5). Soda bikarbona je tako kot sintetični fungicid (pozitivna kontrola) okrog diska tvorila cono z očitno okrnjeno rastjo, saj so kolonije v premeru približno 3 cm bile manjše. Učinek sode bikarbone je na dan 5 bil viden, na dan 7 pa več ne. Kljub temu, da čebula ni tvorila nobene od prej opisanih con, pa je v primerjavi z negativno kontrolo rast bila okrnjena po celi plošči (Tabela 5). Čaj majarona na to glivo ni imel nobenega učinka.

Tabela 7: Slikovni prikaz rezultatov testiranja pripravkov s *Fusarium sp.*

<p><i>Fusarium sp.</i> /naravna učinkovina</p>	<p>Učinek sredstva</p>	
	<p>1. ponovitev</p>	<p>2. ponovitev</p>
<p>NK (disk s pufrom PBS- brez fungicida)</p>		<p>Ni delana</p>
<p>PK (sintetični fungicid)</p>		
<p>Soda bikarbona (0,25 g/ml)</p>		

<p>Majaron (majaronov čaj)</p>		
<p>Čebula (neredčen sok čebule)</p>		
<p>Čajevec (neredčen pripravek)</p>		
<p>Cimet (0,1 g/ml na gojišče)</p>		

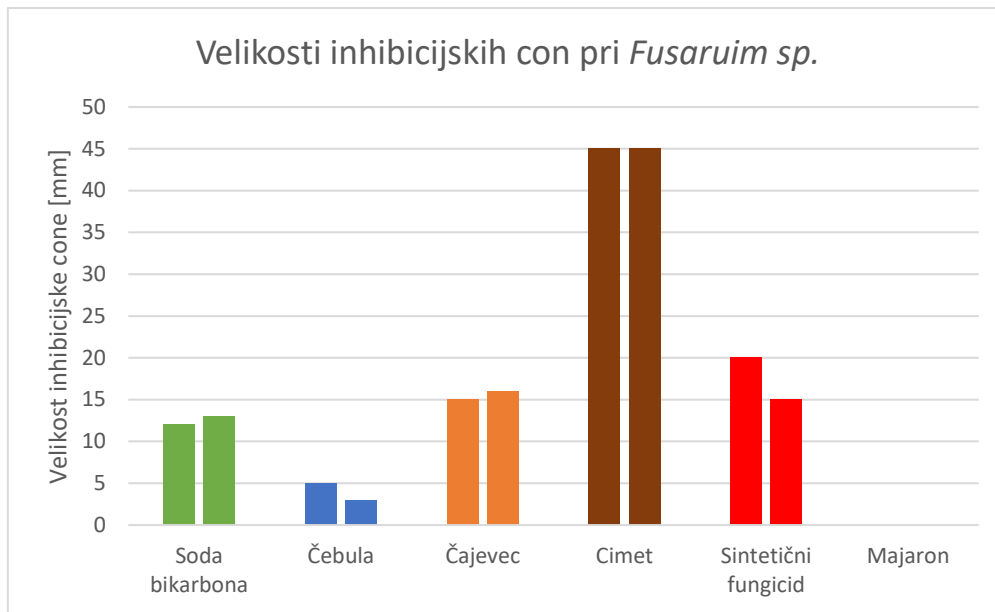
Iz zgornjih slik je razvidno, da so vsi pripravki razen majarona imeli učinek na rast glive do neke mere. Podatki so povzeti v Tabeli 8 in Grafikonu 2. Od vseh testiranih pripravkov je bil najbolj učinkoviti cimet, ki je onemogočal rast glivam po celotnem gojišču, najmanjšo cono inhibicije pri delujočih učinkovinah smo določili pri čebuli. Majaron ni imel nobenega učinka. Podobno kot pri testiranju z *Alternaria alternata* smo opazili, da je se pri sodi bikarboni pri dnevu 7 učinek na *Fusarium sp.* zmanjša. V coni inhibicije se pojavijo manjše kolonije (Slika 17).



Slika 17: Prikaz učinkovitosti sode bikarbone na dan 7 po nacepitvi.

Tabela 8: Velikost inhibicijskih con pri *Fusarium sp.*

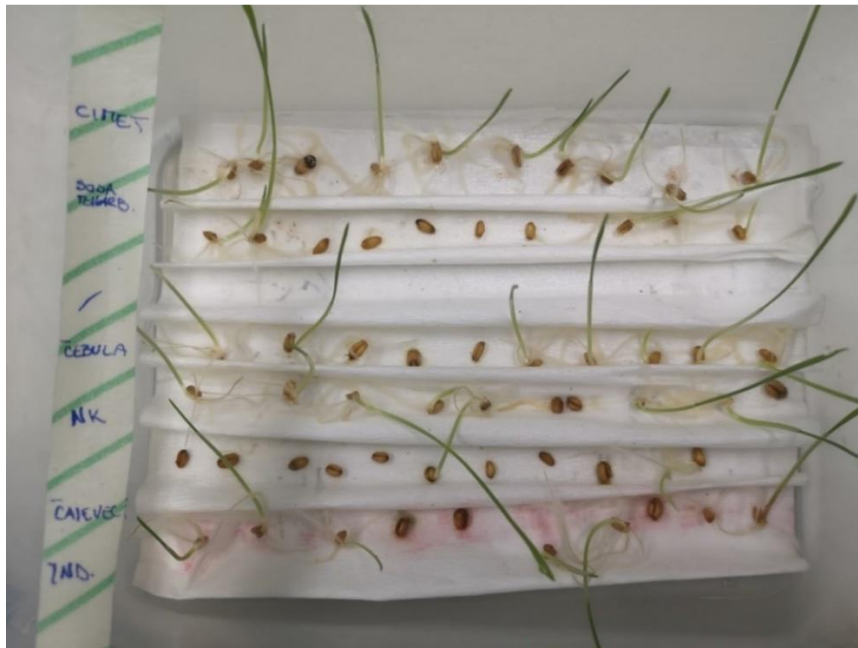
Pripravki	Inhibicijska cona [mm]		Povprečna inhibicijska cona [mm]
	1. ponovitev	2. ponovitev	
Soda bikarbona	12	13	12,5
Čebula	5	3	4
Cimet	45	45	45
Čajevac	15	16	15,5
Sintetični fungicid	20	15	17
Majaron	0	0	0



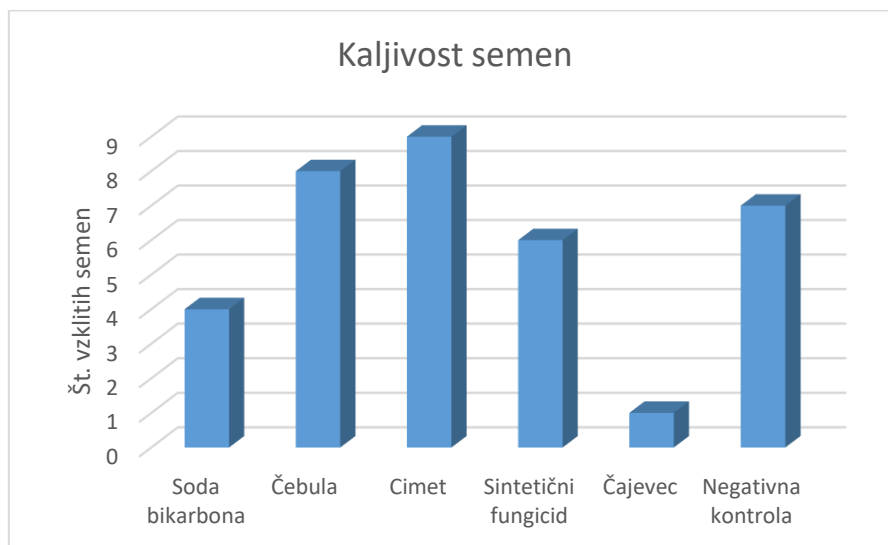
Graf 1: Inhibicijske cone (mm) pri *Fusarium sp.*

### 5.3 Kaljivost

Soda bikarbona in čajevec sta imela negativni učinek na kaljivost semen (Slika 18, Grafikon 2). Pri čajevcu je od desetih semen, ki so bila obdana s pripravkom, vzklilo samo eno. Pri semenih obdanih cimetom, pa je vzklilo kar devet od desetih semen, kar je dve več kot pri negativni kontroli. V tej fazi je nerazvidno, ali gre za statistično anomalijo, ali pa ima cimet pozitiven učinek na kaljivost semen.



Slika 18: Eksperiment kaljivosti semen, ki so bila tretirana s pripravki

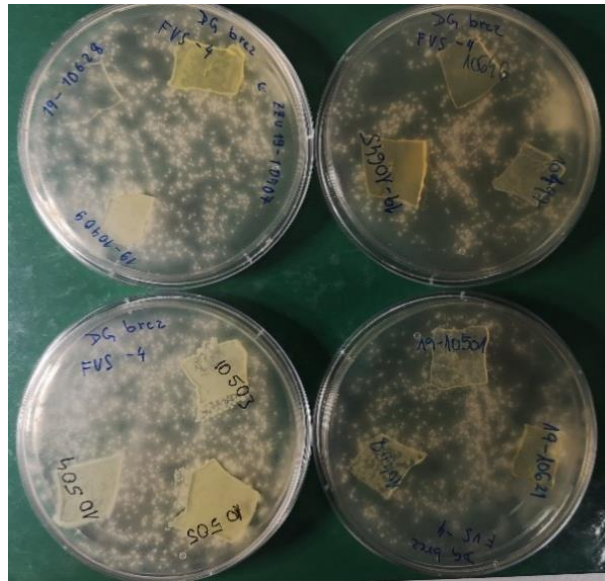


Graf 2: Kaljivost semen. Skupno je v testiranje s posamezno učinkovino bilo vključenih 10 semen.

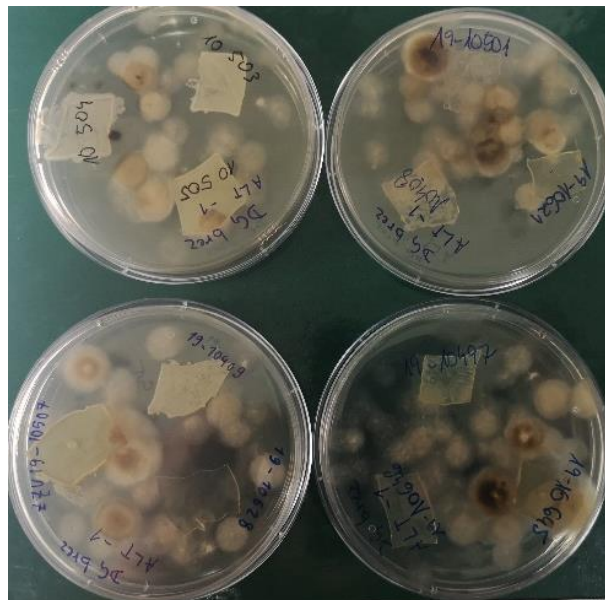


## 5.4 Vpliv bakterijskih izolatov na rast gliv

Nobeden od testiranih bakterijskih izolatov ni zaviral rasti nobene od izbranih gliv (Primer rasti *Fusarium sp.* slika 19, Primer *Alternaria alternata* Slika 20; ostale slike se nahajajo v Prilogah Slike 21, 22 in 23).



Slika 19: Primer rasti *Fusarium sp.* v prisotnosti bakterij



Slika 20: Primer rasti *Alternaria alternata* ob prisotnosti bakterij

## 6. Razprava

### 6.1 Ovrednotenje rezultatov antibiogramov in klitvenih poskusov

V raziskovalni nalogi smo ugotovili, da testni pripravki na rast glive *Alternaria alternata* vplivajo drugače, kot na *Fusarium sp.* To je bilo opaziti tudi pri sintetičnem fungicidu, ki imel večjo učinkovitost pri inhibiciji *Fusarium sp.* Cone inhibicije pri *A. alternata* niso bile tako izrazite, prav tako smo pri tej glivi opazili, da pripravek lahko vpliva na rast po celotni plošči, ne nujno samo v coni okrog diska, kamor predvidevamo, da je difundiral po agarju. Predvidevamo, da so v takih primerih vlogo igrale tudi določene hlapne spojine iz učinkovine. Pogosto izbrane učinkovine niso popolnoma inhibirale glive *A. alternata* ampak le zavirale pri rasti, saj so kolonije bile manjše, včasih tudi manj številne. Da bo sintetični fungicid učinkovito deloval na *Fusarium sp.* smo pričakovali, saj je poleg zatiranja nekaterih ostalih pomembnih žitnih glivnih boleznih (npr. snežne plesni) namenjen tudi zatiranju fuzarioz (Bayer, 2018). Za izredno učinkovita pripravka v obeh primerih sta se izkazala cimeta in olje čajevca. V nekaterih objavah so olje čajevca že omenili kot potencialno koristen pripravek pri zdravljenju človeku škodljivih dermatofitov (glive, ki povzročajo okužbe kože) in gliv kvasovk (Nenoff, 1996). Poleg tega so o njegovi učinkovitosti poročali že pri nekaterih drugih patogenih glivah žit, vključno s *Fusarium spp.* in nekaterih vrstah *Alternaria* (Terzi, 2007) (Nazzaro, 2017) (Riccioni, 2011). V našem poskusu smo čajevca uporabljali v neredčeni, originalni obliki. V nekaterih objavah smo zasledili, da na glive učinkujejo že manj kot 3 % raztopine (Aboo, 2009). V nadaljnjih poskusih bi določali minimalne inhibitorne koncentracije na izbrane glive. Na tak način bi določili koncentracijo čajevca, ki bi učinkovito zavirala rast gliv, vendar ne imela vpliva na kaljivost, saj smo videli v naši nalogi, da seme tretirano z neredčeno raztopino ne klije.

Tudi o cimetu lahko zasledimo objave, ki potrjujejo njegovo fungicidno vlogo (Nehal, 2007). V raziskovalni nalogi smo opazili, da bi kljub dobri učinkovitosti obeh, cimeta in čajevca, cimeta lahko imel to prednost, da pri tretiranju semen ni potrebna velika pozornost pri doziranju učinkovine, ki jo nanašamo na seme. Cimeta smo namreč nanесли direktno na seme, tako, da smo ga povaljali v prahu. Kljub obsežni količini praha na semenu je kaljivost bila nekoliko večja, kot pri kontroli. Objav o pozitivnem učinku cimeta na klitje semen nismo zasledili. Testiranje bi v nadaljnjih poskusih ponovili in v primeru ponovljenih rezultatov poskušali ugotoviti ali gre

za izboljšanje klitja zaradi fungicidnega učinka na semenu ali cimet vpliva na samo fiziologijo semena.

Ravno nasprotno, majaron v obliki čaja žal ni pokazal nobenega učinka. V predhodnih raziskavah so poročali o fungicidnem učinku esencialnega olja majarona (Wafa, 2018), tako, da sklepamo, da je koncentracija učinkovin v čaju preprosto prenizka oziroma aktivne učinkovine majarona niso topne v vodi, s katero smo pripravili čaj.

Čebula je imela mali fungicidni učinek na *Fusarium sp.* (povprečna inhibicijska cona je bila samo 4 mm) in še manjši na *Alternario alternato*. Objave raziskav opisujejo fungicidni učinek na *Fusarium oxysporum*, vendar je bil uporabljen ekstrakt čebule in ne čebulni sok (Rauf, 2012). Zaradi tega lahko sklepamo, da je koncentracija aktivnih snovi v čebulnem soku prenizka za izrazite rezultate. Objav, ki opisujejo fungicidni učinek na *Alternario alternata* nismo zasledili.

Zanimiv se nam je zdel tudi učinek sode bikarbone, kjer smo opazili, da s časom inkubacije učinkovitost zaviranja rasti gliv pada. Kot omenjeno v Poglavlju 2.2.2.1 bazično okolje uniči le malo gliv, te pa so pogosto sposobne nadaljevati z razmnoževanjem, ko se pH okolja zniža. Sklepamo, da s časom inkubacije pH v okolici diska začne padati, kar omogoči glivam, da se razrastejo. To se glede na naše rezultate zgodi že v manj kot enem tednu.

Ugotovitve bomo v nadaljevanju predstavili še po točkah postavljenih hipotez.

Postavljena Hipoteza 1 trdi, da bo vsaj eden od naravnih pripravkov imel primerljivi fungicidni učinek sintetičnemu fungicidu. Na glivo *Alternaria alternata* sta imela primerljiv oziroma celo večji učinek kar dva naravna pripravka, in sicer cimeti in olje čajevca. Noben od ostalih pripravkov ni imel stroge inhibicijske cone pri testiranju, vendar sta bili velikost in ponavadi število kolonij okrnjeni. Oba naravna fungicida sta imela vidni učinek na glivo *Fusarium sp.* Olje čajevca je imelo podobno inhibicijsko cono kot sintetični fungicid, medtem ko je cimeti imel 2,5-krat večjo inhibicijsko cono kot sintetični fungicid (enak rezultat je bil viden v ostalih dveh paralelkah). Zaradi primerljivega, v nekaterih primerih tudi boljšega, učinka teh dveh naravnih pripravkov na obe glivi s sintetičnim fungicidom, menimo, da je ta hipoteza potrjena.

Postavljena Hipoteza 2 trdi, da bodo imeli pripravki različni učinek na rast gliv in kaljivost semen. Iz testiranj z glivo *Fusarium sp.* (graf 1 in tabela 7) je dobro razvidno, da res pripravki res razlikujejo v fungicidnem učinku. Iz testiranja s glivo *Alternaria alternata* je ta razlika manj

opazna, vendar je med testiranimi pripravki bila še vedno razlika. Tudi v kaljivosti so bistvene spremembe, dve nasprotji, ki ju lahko omenimo sta olje čajevca in cimet. Zaradi tega menimo, da je ta hipoteza potrjena. Če povzamemo, več naravnih učinkovin je v *in vitro* pokazalo potencial za ekološko razkuževanje semen in imajo zato tudi potencial za testiranje *in vivo*, kjer bi se spremljal mladostni razvoj rastline ter na koncu količina pridelka, ki bi ga na tak način pridobili.

## 6.2 Vpliv izbranih bakterijskih izolatov na rast gliv

V literaturi najdemo precej podatkov o antagonizmu izolatov več bakterijskih vrst iz rodov *Bacillus* in *Paenibacillus*. Antagonizem pogosto ni vezan na določeno bakterijsko vrsto, ampak le na določeni sev iz neke bakterijske vrste. Zato je za najdbo določene bakterije, ki je sposobna zavirati rast določenih gliv potrebno testirati veliko število bakterijskih izolatov iz nekega vzorca. V eni od nedavnih raziskav so pri testiranju 12 000 bakterijskih izolatov iz pšenice določili sev *Pseudomonas piscium* ZJU60, ki antagonistično vpliva na *F. graminearum*, enega pomembnejših povzročiteljev fuzarioz (Slika antagonizma je prikazana v Poglavlju 2.3, Slika 13) (Arrebola, 2010), (Nielsen, 1997), (Zhao, 2014). Rast gliv naj bi bile sposobne zavirati tudi sevi bakterije *Pantoea agglomerans* (Town, 2016). To je bakterijska vrsta, ki so jo na raziskovalci OMR, NLZOH pri analizi bakterijskega mikrobioma pšenice pogosto osamili. Vendar smo zasledili tudi poročila, da ta bakterija lahko povzroča zdravstvene težave (predvsem na dihalih) pri človeku in živalih, zato ta vrsta ni najboljša izbira pri iskanju novih pristopov k alternativni zaščiti semen (Dutkiewicz, 2016). V naši raziskovalni nalogi smo zaradi omejenega obsega dela testirali le po en izolat posamezne vrste, katerih predstavniki glede na predhodna poročila lahko vršijo antagonizem na glive. Pri testiranju žal nismo zaznali nobenega učinka na izbrani glivi. Zato moramo Hipotezo 3, ki trdi, da bo eden od izbranih bakterijskih izolatov iz pšenice bo imel negativen vpliv na glivno rast, ovreči.

### 6.3 Pomen dobljenih rezultatov

Z raziskavo smo eksperimentalno dokazali, da obstajajo naravni pripravki, ki imajo fungicidni učinek in bi jih bilo mogoče uporabljati za nadzorovanje rasti gliv. Ugotovili smo, da imajo nekateri naravni pripravki primerljiv ali celo boljši učinek testiranemu sintetičnemu fungicidu pri testiranju *in vitro*. Zato vidimo v nadaljevanju te in podobnih raziskav velik potencial za razvijanje naravnih pripravkov, ki bodo delovali na za rastline patogene glive, ki ogrožajo pridelke v kmetijstvu. S tem bi lahko prišli do učinkovite naravne alternative za sintetične fungicide. Z uporabo tega bi pridelovali pridelke višje kvalitete z manjšim negativnim vplivom na okolje.

### 6.4 Možne izboljšave in nadaljnje študije

Za testiranje učinkovitosti naravnih pripravkov, bi lahko uporabili različne koncentracije teh pripravkov, da bi ugotovili, kako se spreminja fungicidni učinek s koncentracijo. S to metodo, bi lahko določili tudi minimalno inhibicijsko koncentracijo (MIC) in s tem določili optimalno koncentracijo pripravka, kjer dobimo željeni učinek z minimalno količino uporabljenega pripravka. Eksperiment bi lahko ponovili večkrat oz. imeli več paralelk. Prav tako bi lahko uporabili glive različnih sevov in vrst in razširili seznam testiranih gliv. S tem bi določili nabor škodljivih glivnih vrst na katere delujejo in morebiti učinek na glivne vrste, ki koristijo rastlini pri klitju in/ali razvoju.

Pri testiranju učinka bakterij na glive, bi morali testirati večjo število bakterijskih vrst, da bi našli vsaj eno, ki bi imela učinek na rast gliv. Prav tako bi želeli vključiti še pozitivno kontrolo, ki bi nam zagotavljala, da je metoda primerna in zanesljiva.

Preden bi se naravni pripravki začeli uporabljati za komercialno uporabi, bi bilo potrebno testirati njihovo učinkovitost na širokem spektru gliv. Najverjetneje bo najbolj učinkovita mešanica naravnih pripravkov. Prav tako bi se moralo preveriti, kakšna je učinkovitost teh pripravkov v *in vivo* pri različnih fizikalno-kemijskih pogojih (temperatura, relativna vlažnost, pH zemlje...).

## 7. Zaključek

Fungicidi se v kmetijstvu uporabljajo za preprečevanje rasti gliv. Te lahko namreč uničijo velik delež pridelka, zato je njihova uporaba v sodobnem kmetijstvu tako rekoč obvezna. Najpogosteje se uporabljajo sintetični fungicidi, zaradi njihove učinkovitosti, cene proizvodnje in ozkega spektra delovanja. Kljub tem dobrim lastnostim, niso idealna rešitev, saj dolgo ostanejo na rastlinah in v prsti tudi po tem, ko je njihovo delo opravljeno. To je slabo, ker imajo negativne učinke na zdravje ljudi, živali in na okolje. Potencialna rešitev teh slabosti bi bila uporaba naravnih fungicidov, ki bi imeli manj škodljivih lastnosti. V raziskovalni nalogi smo ugotovili, da sta najbolj obetavna kandidata, od testiranih naravnih pripravkov, čajevec in cimet, saj sta imela primerljivo učinkovitost s sintetičnim fungicidom. Preden bi začeli s komercialno uporabo, bi bilo potrebno še ugotoviti optimalno koncentracijo fungicida za uporabo in optimalen način nanosa tega, saj bi s tem povečali njihovo učinkovitost, zmanjšali ceno proizvodnje in minimalizirali negativne na rast rastlin. Raziskovanje na tem področju še daleč ni zaključeno, vendar je obetaven začetek.

## 8. Družbena odgovornost

V raziskovalni nalogi smo želeli najti naravne alternative sintetičnim fungicidom, ki se uporabljajo za nadzorovanje rasti gliv na rastlinah. Te glive v svojo okolje sproščajo mikotoksine, ki so nevarni za zdravje ljudi in živali, zato je uporaba fungicidov skorajda nujna, če želimo ohraniti uporaben pridelek. Sintetični fungicidi imajo dolgo razpadno dobo in so nevarni za zdravje ljudi, živali in okolje. Rešitev tega problema so naravni fungicidi, ki bi imeli manjši negativni učinek. Dva potencialna kandidata sta cimet in čajevec, kot smo potrdili raziskovalni nalogi. Uporaba naravnih fungicidov, bi pripomogla k višji kakovosti pridelkov in prav tako k ohranitvi okolja zato menimo, da je naša raziskovalna naloga prispevala novo znanje v dobro družbe. V prihodnosti bi lahko za zaščito pridelkov uporabljali tudi bakterije, ki so sposobne antagonizma z glivami. Uporaba teh bi pomenila, da ne bi bilo potrebe po večkratnem nanašanju zaščitnega sredstva, saj bi se bakterijske kolonije vzdrževale same.

Eksperimenti so potekali v laboratoriju na NLOZH, ki je primerno opremljen za delo s mikroorganizmi. Po izvedenih eksperimentih, so bila vsa gojišča in okuženi delovni pripomočki bili odstranjena na ustrezen način, da ni prišlo do okužbe zunanjega okolja s testiranimi glivami.

## Viri

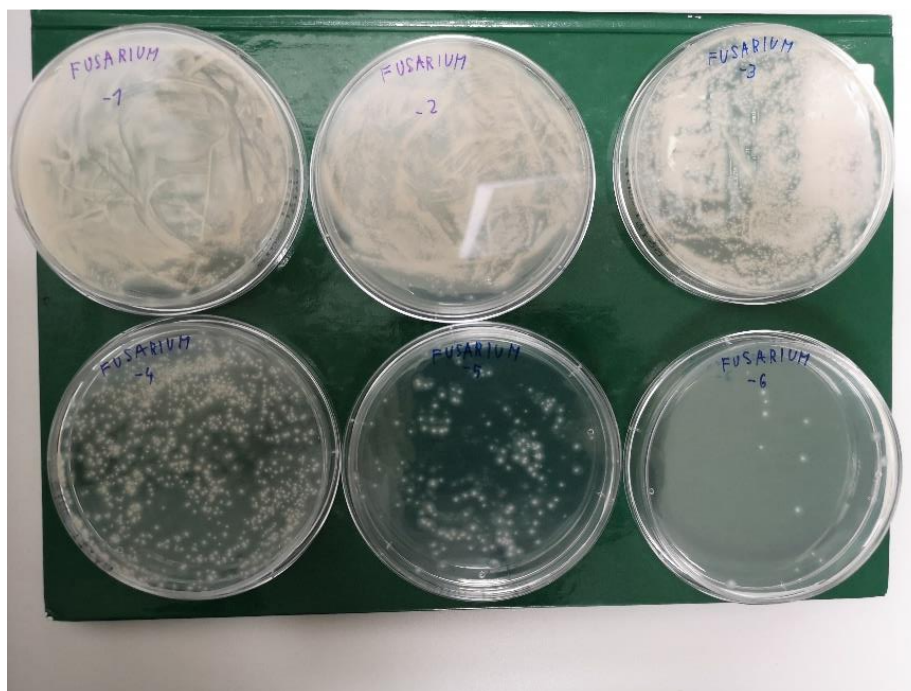
1. Aronson, J. K. (2014). Manson's Tropical Infectious Diseases 32. izdaja . Saunders .
2. Bayer. (2018). Pridobljeno iz Crop Science // Slovenija:  
[https://www.cropscience.bayer.si/sl-SI/Proizvodi/Pripravki\\_za\\_tretiranje/Redigo\\_Pro.aspx](https://www.cropscience.bayer.si/sl-SI/Proizvodi/Pripravki_za_tretiranje/Redigo_Pro.aspx)
3. Chalker-Scott. (2009). Baking soda will fungi fail and roses rejoice? Pridobljeno iz s3:  
<https://s3.wp.wsu.edu/uploads/sites/403/2015/03/baking-soda.pdf>
4. Chen, Y., Wang, J., Yang, N. et al. (2018) Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation. Nat Commun 9, 3429. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05683-7>
5. Chu, F. (2003). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, druga izada . Academic Press.
6. Early, R. (2009). Foodborne Pathogens, druga izdaja . Woodhead Publishing.
7. Encyclopaedia Britannica. (18. januar 2020). Fungicide. Pridobljeno iz Encyclopaedia Britannica: <https://www.britannica.com/science/fungicide>
8. Hammer. (9. september 2003). Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil. Pridobljeno iz SFAM:  
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x>
9. Hammer. (12. maj 2004). Antifungal effects of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its components on Candida albicans, Candida glabrata and Saccharomyces cerevisiae. Pridobljeno iz ResearchGate:  
[https://www.researchgate.net/publication/8564907\\_Antifungal\\_effects\\_of\\_Melaleuca\\_alternifolia\\_tea\\_tree\\_oil\\_and\\_its\\_components\\_on\\_Candida\\_albicans\\_Candida\\_glabrata\\_and\\_Saccharomyces\\_cerevisiae](https://www.researchgate.net/publication/8564907_Antifungal_effects_of_Melaleuca_alternifolia_tea_tree_oil_and_its_components_on_Candida_albicans_Candida_glabrata_and_Saccharomyces_cerevisiae)
10. KIS. (18. januar 2020). Preverjanje in upravljanje odpornosti škodljivih organizmov na FFS. Pridobljeno iz Integrirano vrststvo rastlin: <https://www.ivr.si/podrocja-delovanja/sredstva-in-metode-varstva-rastlin/preverjanje-in-upravljanje-odpornosti-skodljivih-organizmov-na-ffs2/>
11. Kobert. (1906). Lehrbuch der Intoxilmtionen. Stuttgart: Ferdinand.
12. Martínez, D. D. (2012). Natural Fungicides Obtained from Plants. Pridobljeno iz <http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/natural-fungicides-obtained-from-plants>
13. NIJZ. (20. december 2017). aflatoksini B1. Pridobljeno iz NIJZ:  
<https://www.nijz.si/sl/aflatoksini-v-zivilih>
14. Ogorelec, K. -z. (26. avgust 2015). ZELENJAVNI VRT –Naravni insekticid. Pridobljeno iz <https://www.ljubljana.si/assets/Uploads/11-naravni-pripravki.pdf>



15. Park, E. J. (22. junij 2015). Negative effects of pesticides on wild bee communities can be buffered by landscape context. Pridobljeno iz The royal society publishing: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rspb.2015.0299>
16. Pečan, U. (2015). Ugotavljanje okuženosti zrnja različnih vrst žit iz prekmurja z glivami iz rodov fusariumin alternariater onesnaženost z mikotoksini; diplomsko delo. Ljubljana. Pridobljeno iz [http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/agronomija/dv1\\_pecan\\_ursa.pdf](http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/agronomija/dv1_pecan_ursa.pdf)
17. Steyn, B. D. (1933). Fungi 1n Relation to Health 1n Man. Onderstepoort.
18. Šarc, L. (18. januar 2020). VPLIV FFS NAZDRAVJE LJUDI. Pridobljeno iz Biotehnična fakulteta Ljubljana : <http://www.bf.uni-lj.si/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=20301&token=268592469a680862239bd830e05696448c696354>
19. Troncoso-Rojas, M. E.-H. (2014). Postharvest Decay. Academic Press.
20. RosalbaTroncoso-Rojas & Martín ErnestoTiznado-Hernández (16. april 2014) *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot), 147-187; <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00005-3>
21. Toshiaki Ohara, Iori Inoue, Fumio Namiki, Hitoshi Kunoh & Takashi Tsuge (1. januar 2004)REN1 Is Required for Development of Microconidia and Macroconidia, but Not of Chlamydospores, in the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* pog. 166 izvod 1 str. 113-124; <https://doi.org/10.1534/genetics.166.1.113>
22. V. Terzi, C. Morcia, P. Faccioli, G. Vale, G. Tacconi & M. Malnati (15. januar 2007) In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens, 613–618; doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02128.x
23. Chen, Y., Wang, J., Yang, N. et al. (24. avgust 2018) Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation. *Nat Commun* 9, 3429 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05683-7>
24. Pathak, N., & Zaidi, R. K. (2013). Studies on seed-borne fungi of wheat in seed health testing programme. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 46(4), 389–401. doi:10.1080/03235408.2012.741978
25. Nenoff P., Haustein U. F., Brandt W. (1996) Antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against pathogenic fungi in vitro, 9(6):388-94., DOI: 10.1159/000211450
26. Terzi V., Morcia C., Faccioli P., Valè G., Tacconi G., Malnati M. ( junij 2007) In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens, 44(6):613-8., DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02128.x
27. el-mougy, Nehal & Abdel-Kader, Mokhtar. (2007). Antifungal effect of powdered spices and their extracts on growth and activity of some fungi in relation to damping-off disease control. *J. Plant Prot. Res.* 47.

28. Wafa, Rouissi & Nasraoui, Bouzid & hamdane, amira. (2018). Antifungal Activity of Essential Oils of *Origanum majorana* and *Lavender angustifolia* against *Fusarium Wilt* and Root Rot Disease of Melon Plan. *Tunisian Journal of Plant Protection*. 13.
29. Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals (Basel, Švica)*, 10(4), 86. doi:10.3390/ph10040086
30. L. Riccioni & L. Orzali (december 2011) Activity of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*, Cheel) and thyme (*Thymus vulgaris*, Linnaeus.) Essential Oils against Some Pathogenic Seed Borne Fungi. Pridobljeno iz:  
<http://www.sinab.it/sites/default/files/UO%204%20CRA-PAV%207.pdf>
31. Azza Siddig Hussien Abbo, Mohamed Osman Idris & Mustafa M. A. ElBalla (8 oktober 2009) The Response of Tea Tree Oil as a Biofungicide Against Early Blight Disease in Tomato Crop (*SolanumLycopersicum*) in Sudan. Pridobljeno iz:  
<https://pdfs.semanticscholar.org/214c/1e2d6d21dcf6c474197fa86b0fcac88c3131.pdf>
32. Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F, et al. (20 marec 2014) Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS One*. 2014;9(3):e92486. doi:10.1371/journal.pone.0092486
33. Preben Nielsen & Jan Sørensen (1 marec 1997) Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere, *FEMS Microbiology Ecology*, poglavje 22, 3. izdaja, str. 183–192, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00370.x>
34. E. Arrebola, R. Jacobs & L. Korsten (4 januar 2010) Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x>
35. Town J, Links M & Dumonceaux TJ. (3 maj 2016) High-quality draft genome sequences of *Pantoea agglomerans* isolates exhibiting antagonistic interactions with wheat seed-associated fungi. *Genome Announc* 4(3):e00511-16. doi:10.1128/genomeA.00511-16.
36. Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Lemieszek M. K., Golec M., Skórska C., Góra-Florek A., Milanowski J.(2016) *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part II--Deleterious effects: Dust-borne endotoxins and allergens--focus on grain dust, other agricultural dusts and wood dust. ;23(1):6-29. doi: 10.5604/12321966.1196848.
37. Rauf, S. & A. Javaid, (2013) Antifungal activity of different extracts of *Chenopodium album* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, the cause of onion basal rot. *Int. J. Agric. Biol.*, 15: 367–371

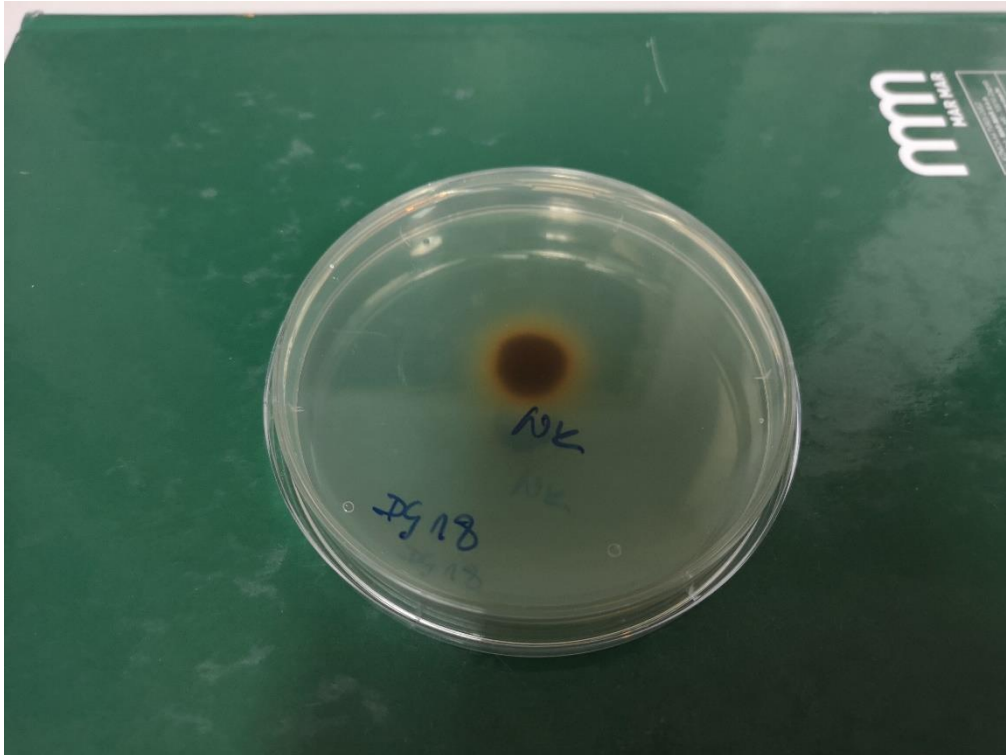
## Priloga



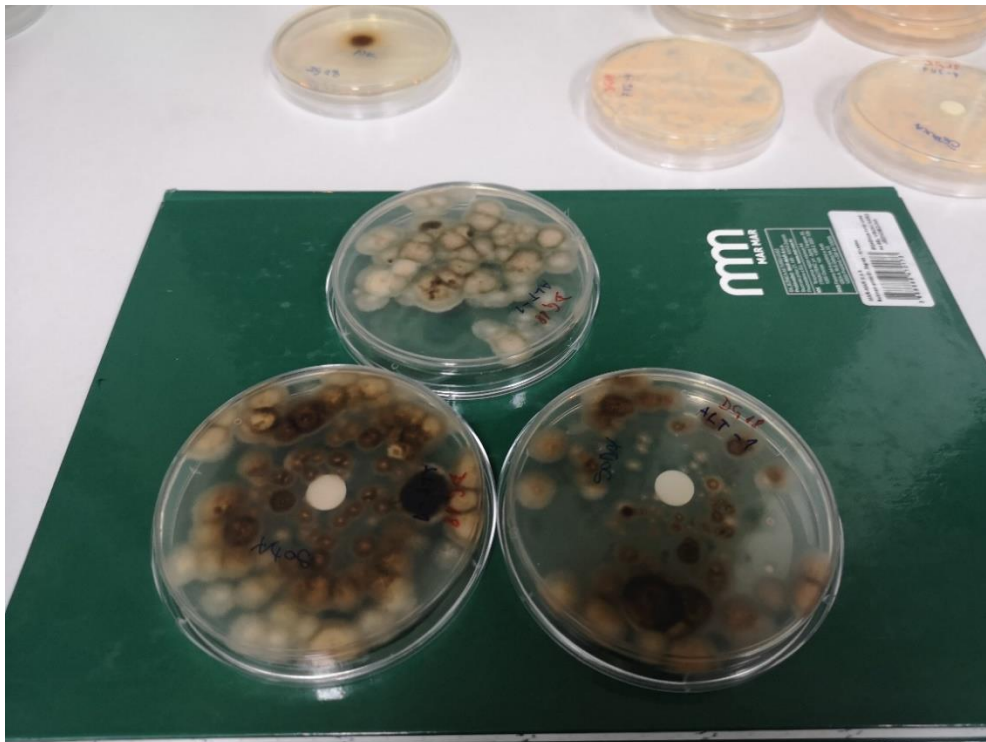
Slika1: Redčitvena vrsta *Fusarium* sp. (zgoraj) in *Alternaria alternata* (spodaj)



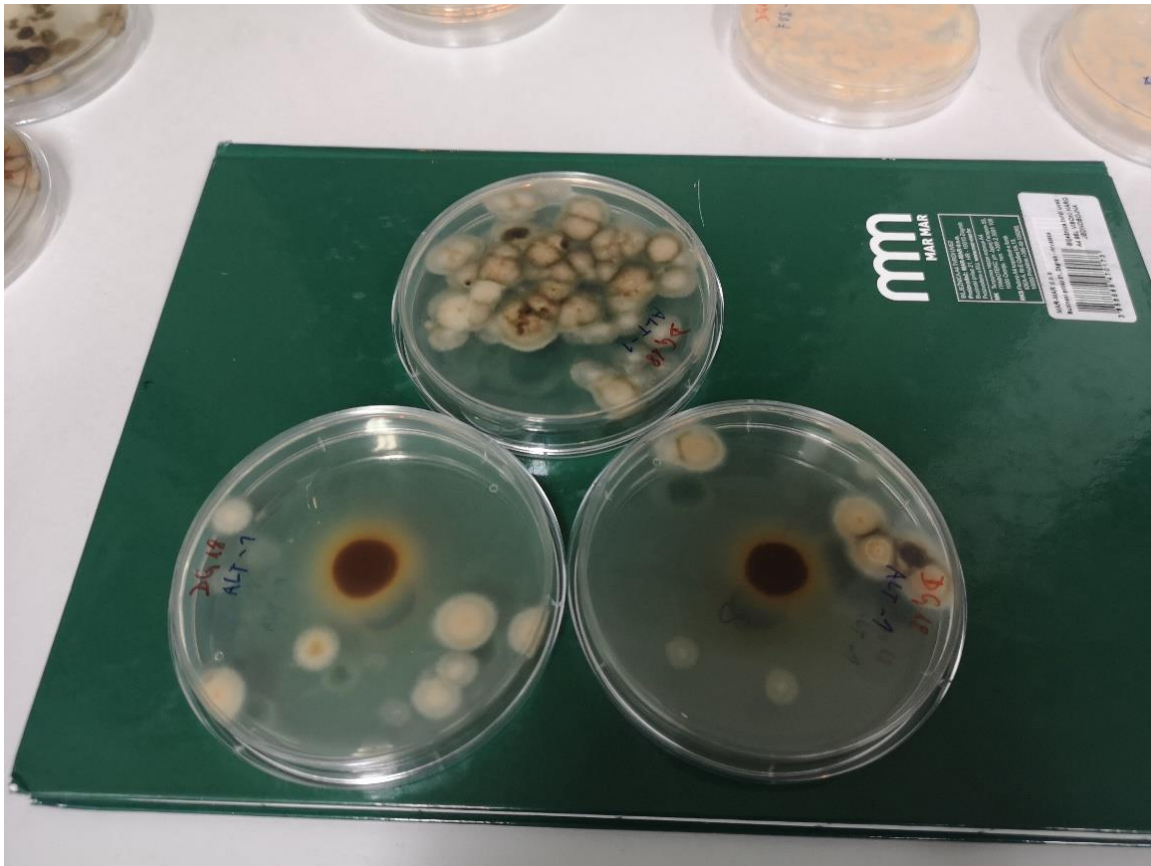
Slika 2: Kontrola sterilnosti pripravkov



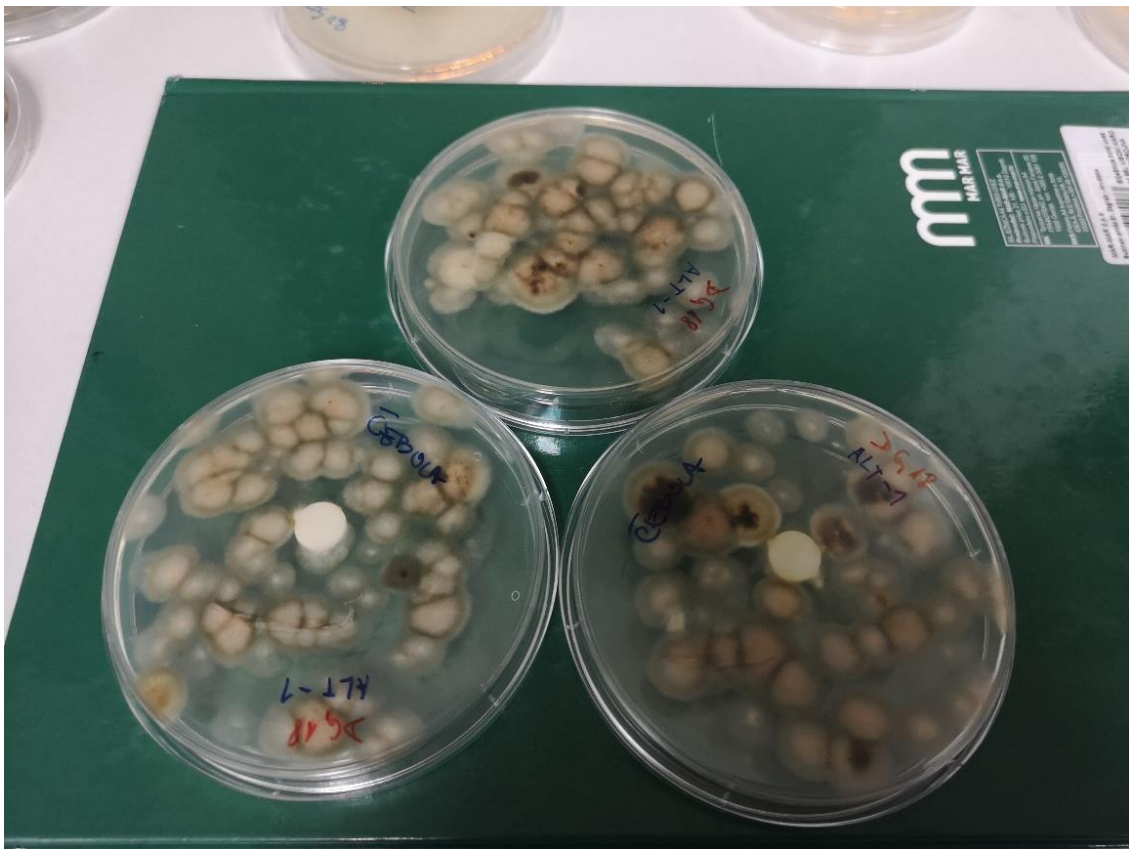
Slika 3: Kontrola sterilnosti cimeta



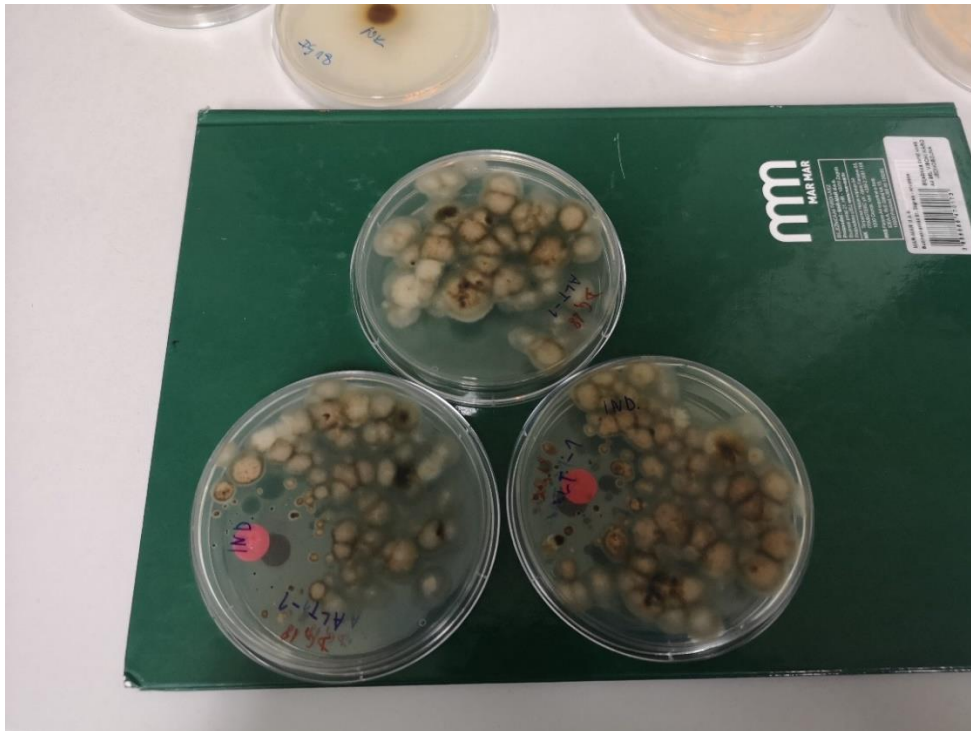
Slika 4: Antibiogram sode bikarbone pri *Alternaria alternata* (zgoraj negativna kontrola za primerjavo)



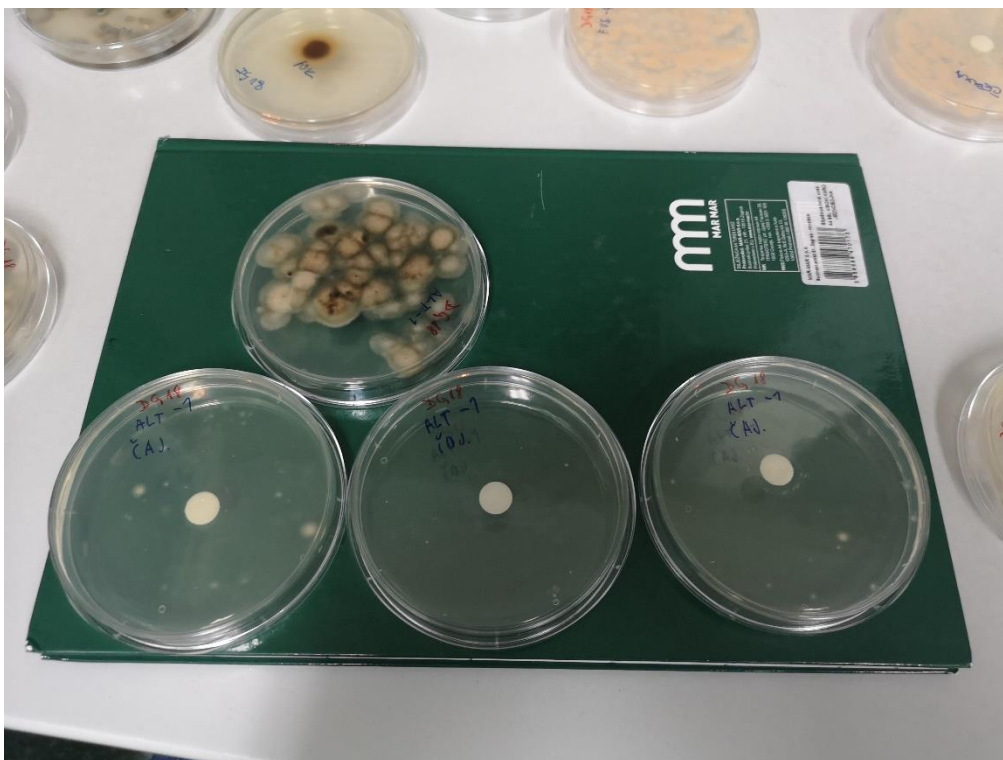
Slika 5: : Antibiogram cimeta pri *Alternaria alternata* (zgoraj negativna kontrola za primerjavo)



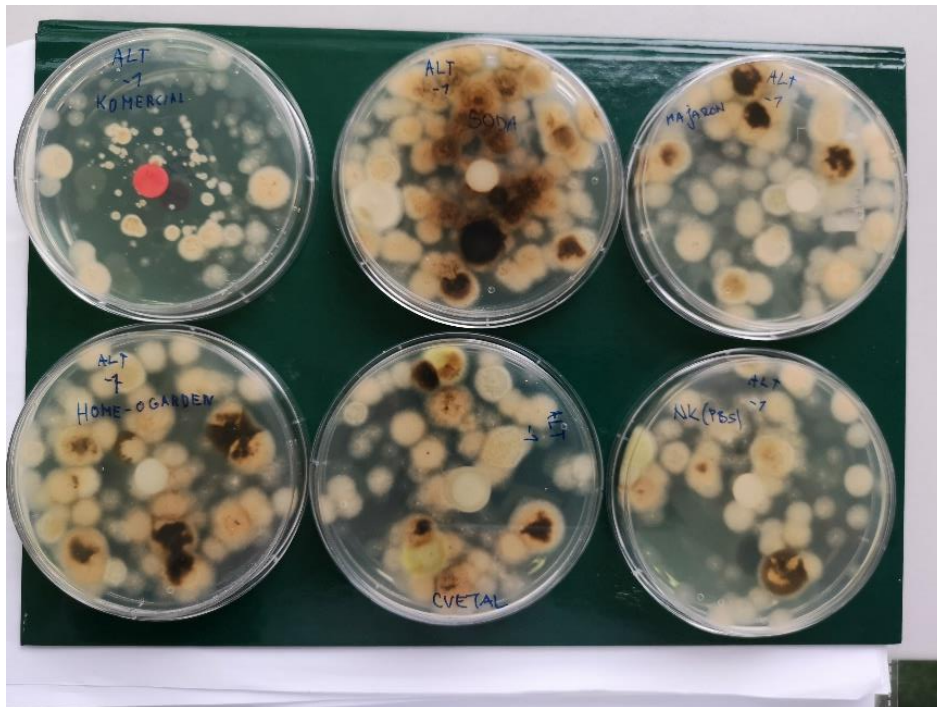
Slika 6: Antibiogram čebule pri *Alternaria alternata* (zgoraj negativna kontrola za primerjavo)



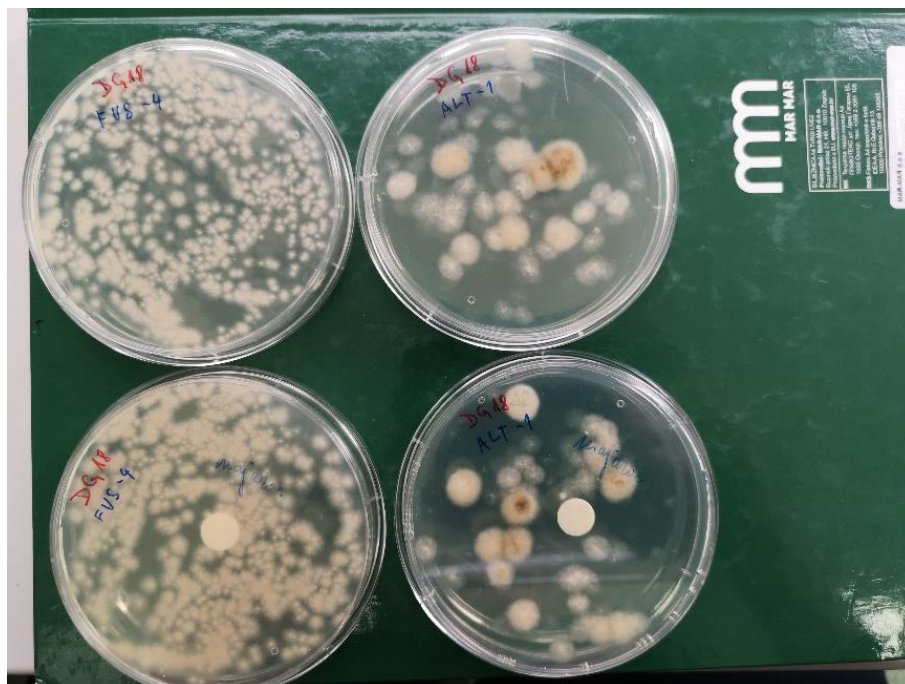
Slika 7: Antibiogram sintetičnega fungicida pri *Alternaria alternata* (zgoraj negativna kontrola za primerjavo)



Slika 8: Antibiogram olja čajevca pri *Alternaria alternata* (zgoraj negativna kontrola za primerjavo)



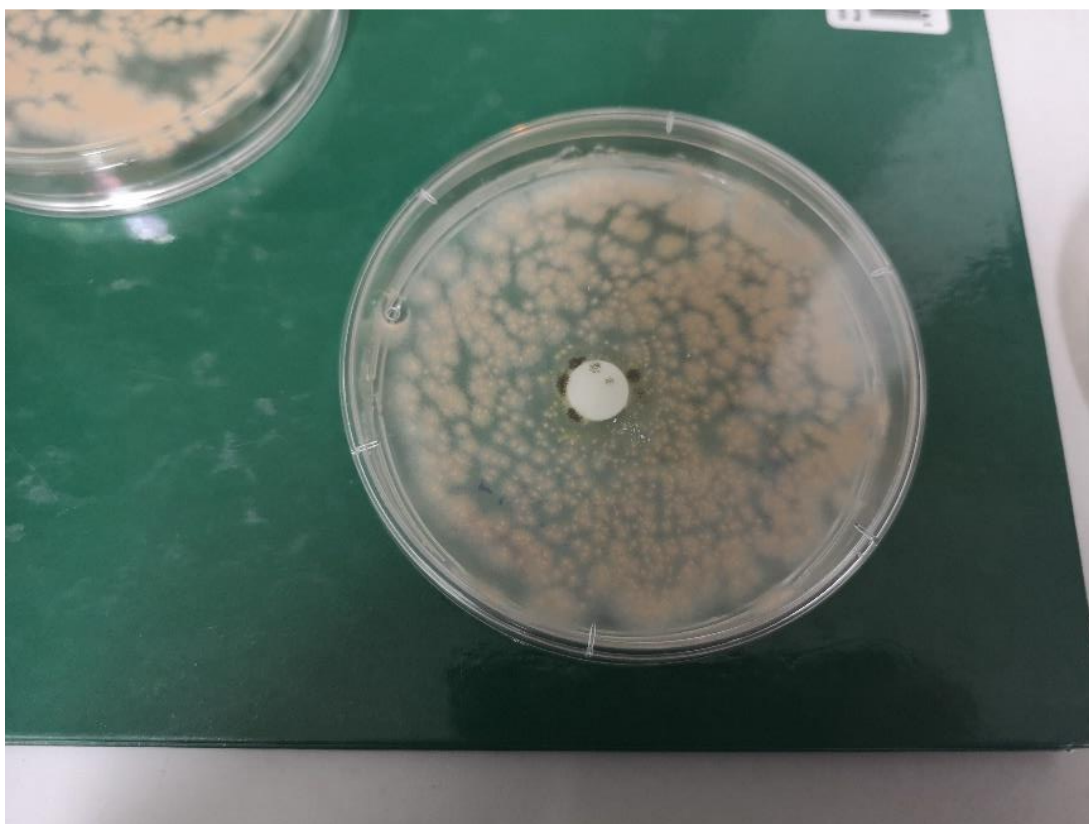
Slika 9: Antibiogram sintetičnega fungicida (desno zgoraj), sode bikarbone (zgoraj na sredini), majarona (zgoraj desno) in negativna kontrola (spodaj desno) pri *Alternaria alternata*



Slika 10: Antibiogram majarona pri *Fusarium* sp. (levo spodaj) in *Alternaria alternata* (desno spodaj). NK *Fusarium* sp. (levo zgoraj) in NK *Alternaria alternata* (desno zgoraj)

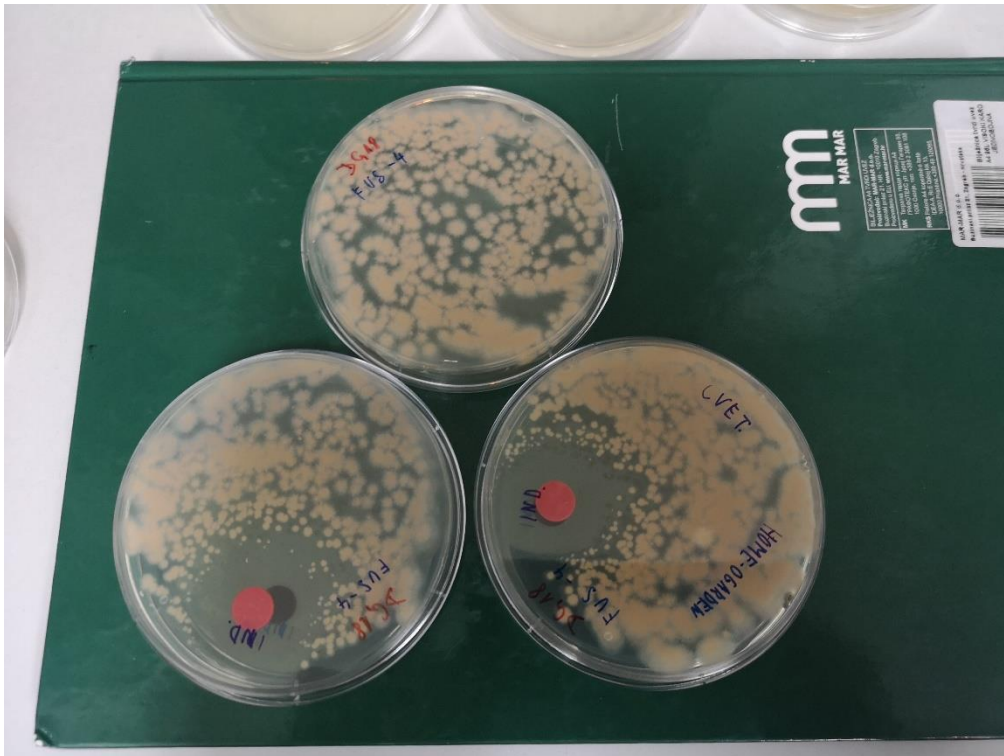


Slika 11: Test sterilnosti čebule

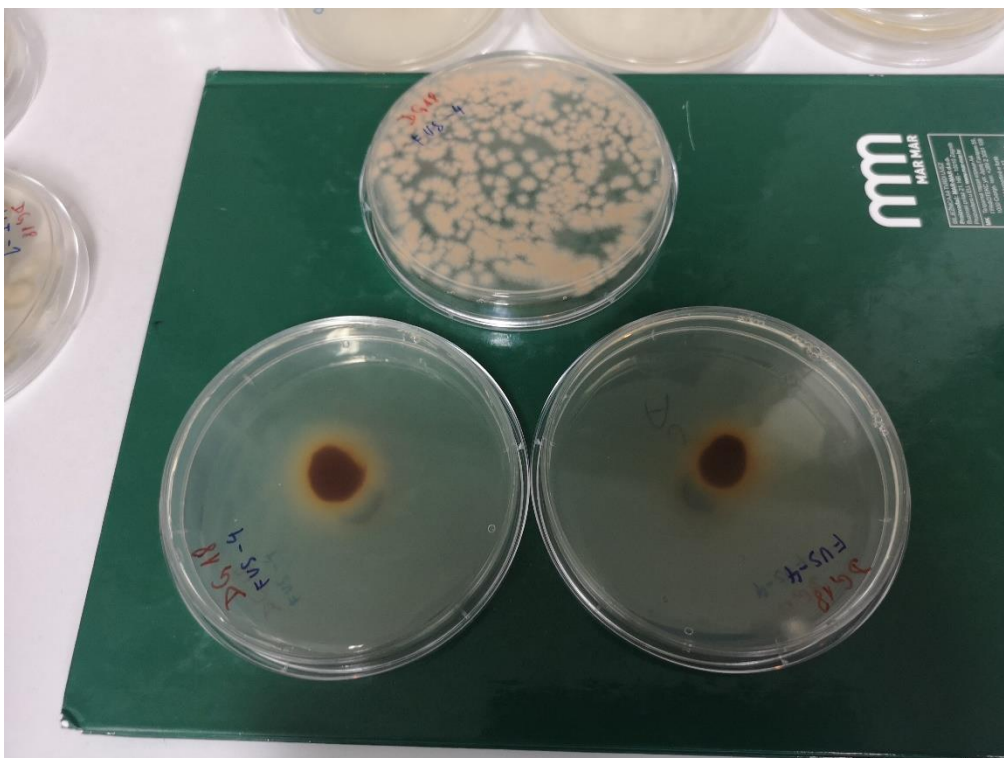


Slika 12: Antibiogram čebule pri *Fusarium* sp.

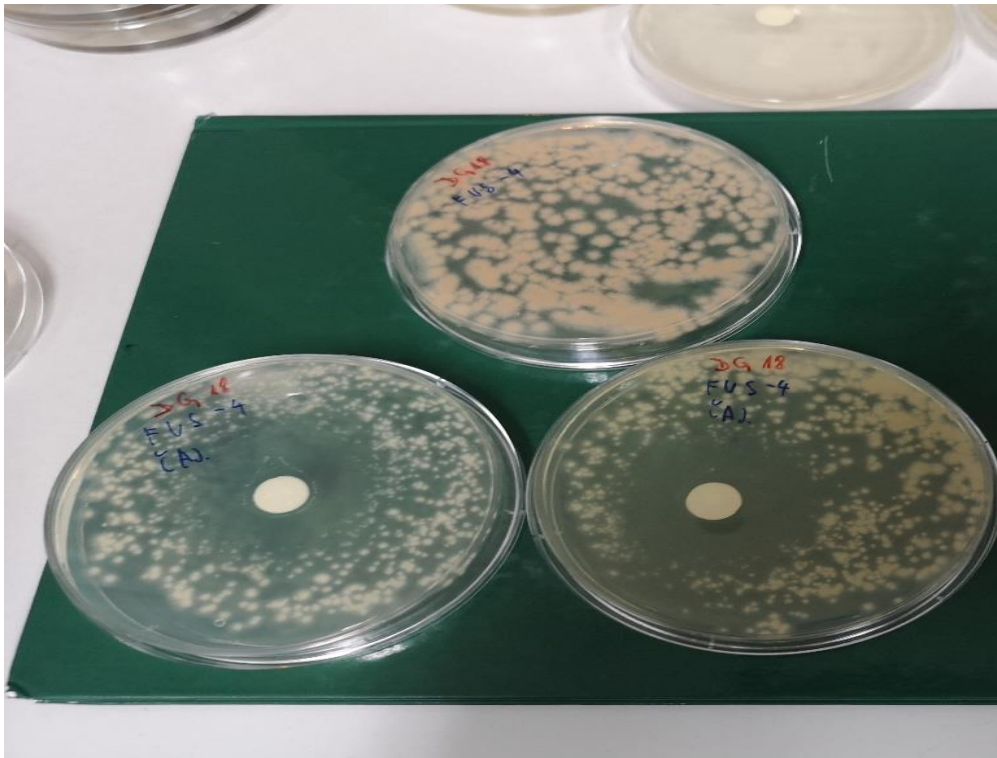




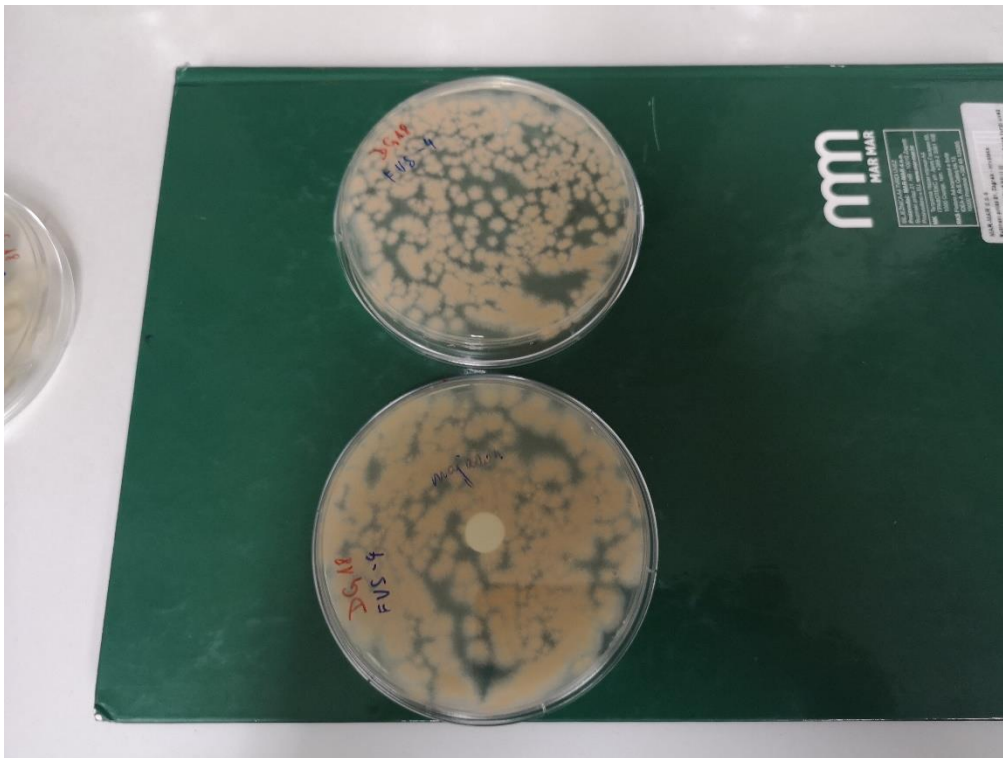
Slika 13: Antibiogram sintetičnega fungicida pri *Fusarium* sp. (zgoraj negativna kontrola)



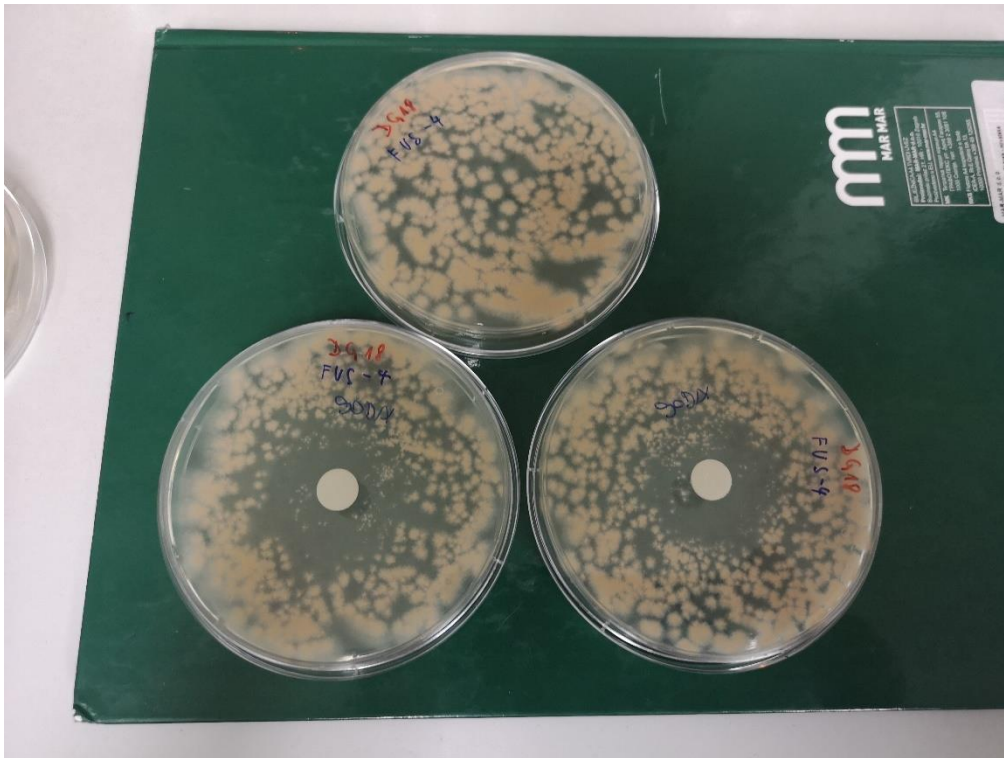
Slika 14: Antibiogram cimeta pri *Fusarium* sp. (zgoraj je negativna kontrola)



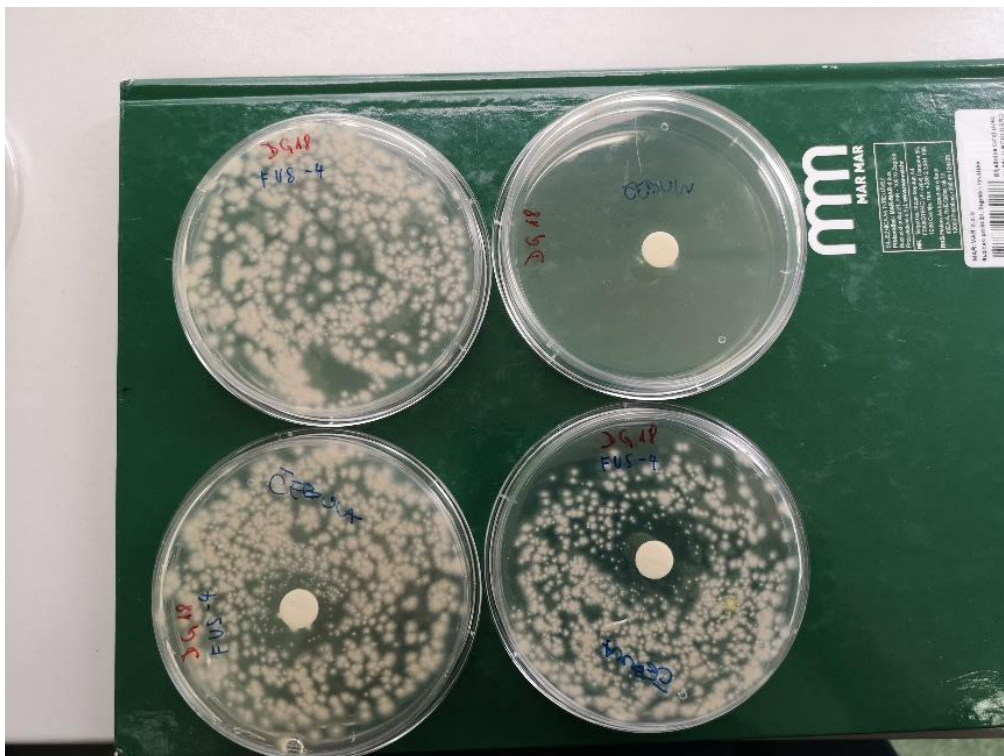
Slika 15: Antibiogram čajevca pri *Fusarium* sp. (zgoraj je negativna kontrola)



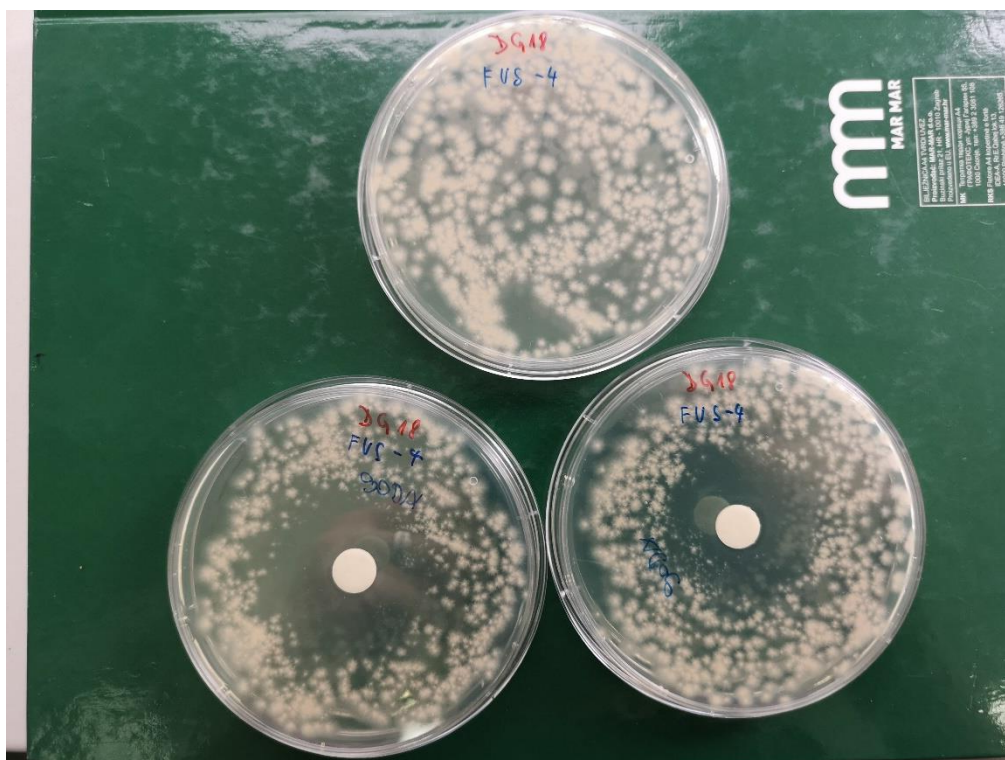
Slika 16: Antibiogram majarona pri *Fusarium* sp. (zgoraj je negativna kontrola)



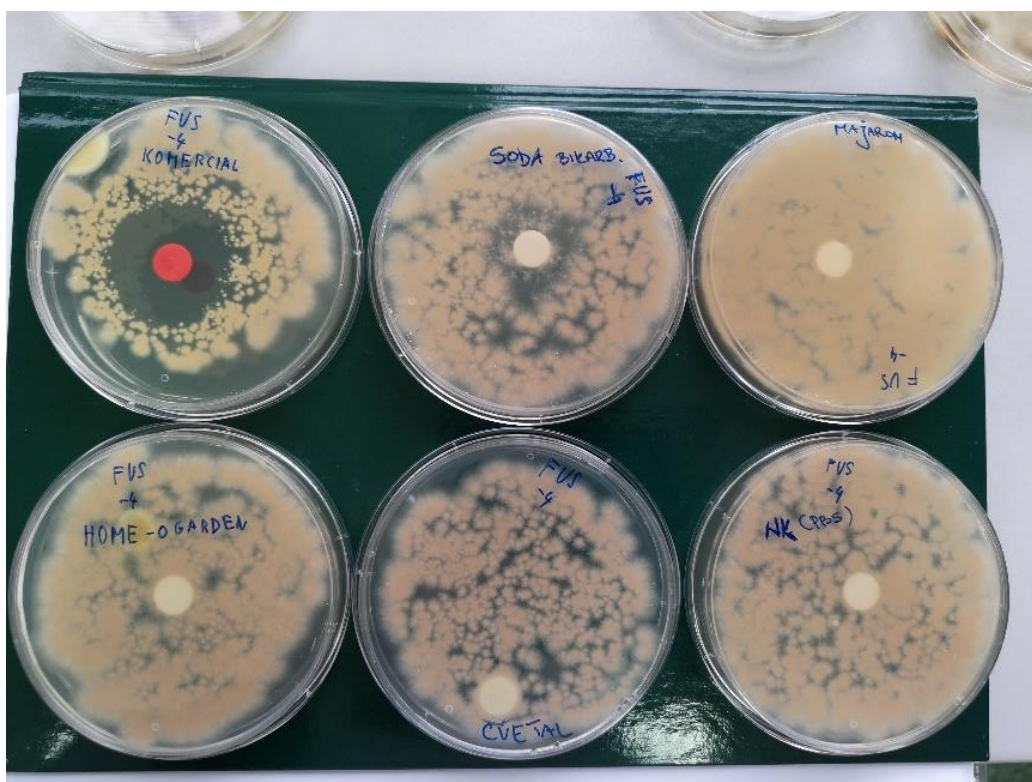
Slika 17: Antibiogram soda pri *Fusarium* sp. (zgoraj je negativna kontrola)



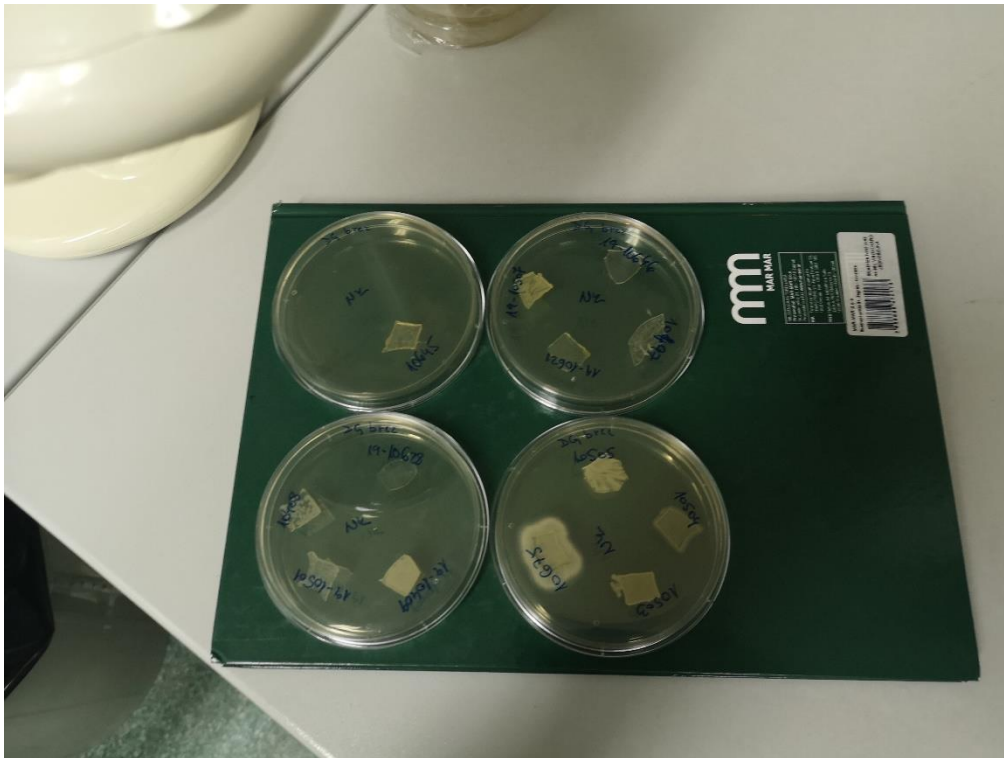
Slika 18: Antibiogram čebule pri *Fusarium* sp. (levo zgoraj je negativna kontrola, plošča brez diska, desno preverjanje sterilnosti diska in raztopin, kjer je plošča brez nacepljene glive)



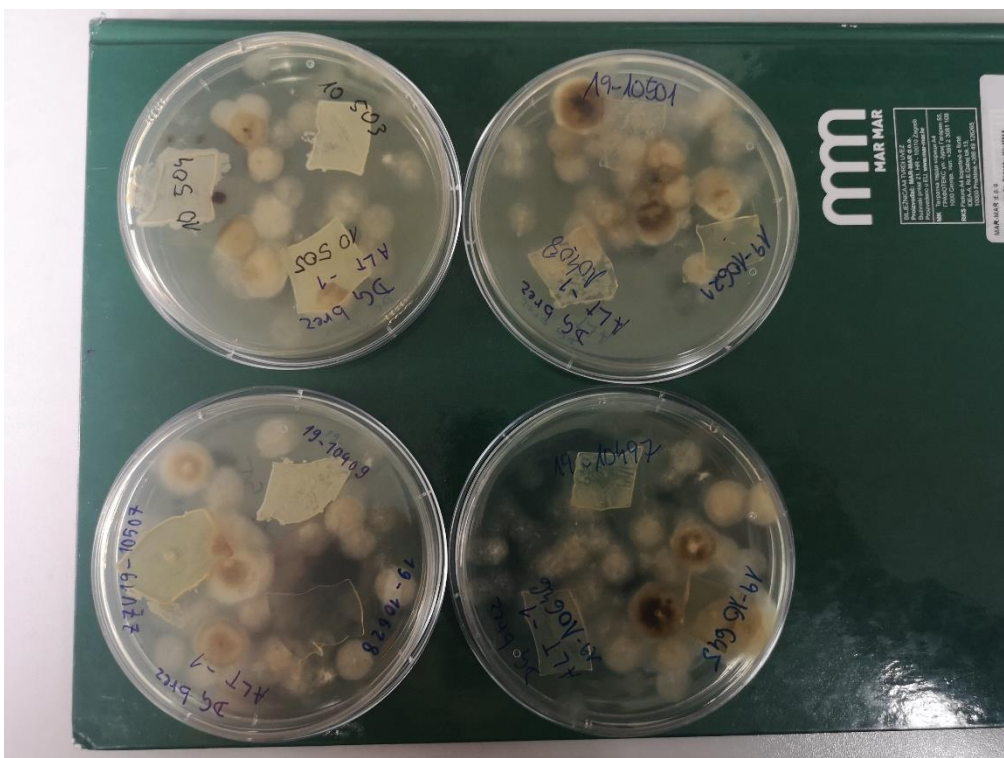
Slika 19: Antibiogram sode bikarbone pri *Fusarium* sp. zgoraj je negativna kontrola)



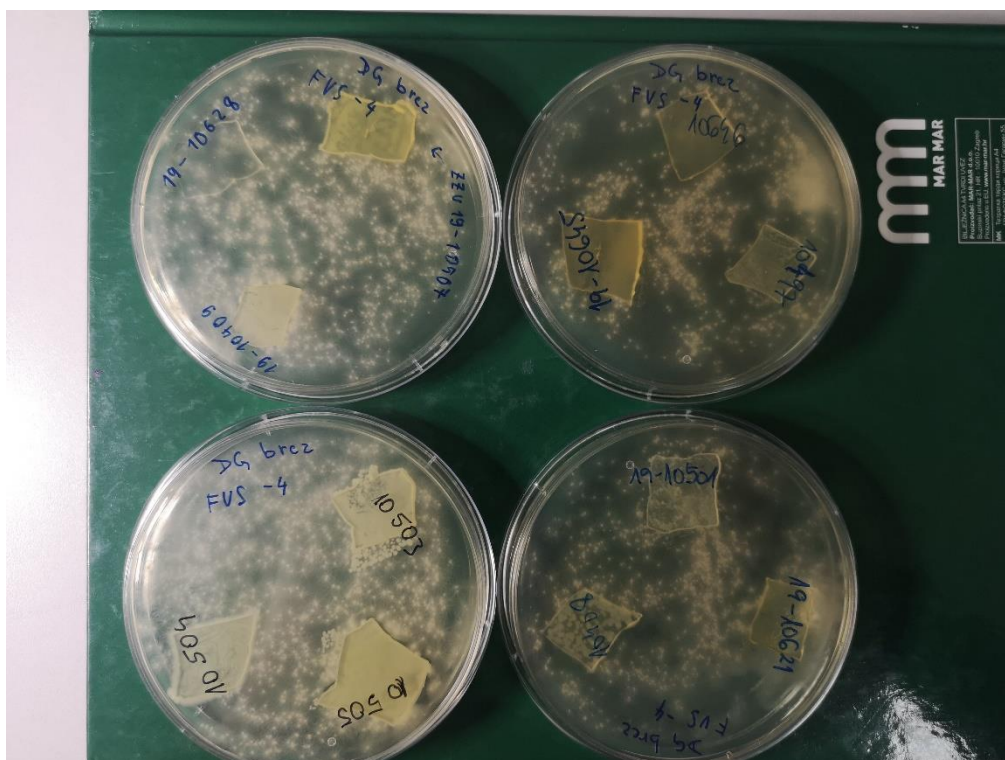
Slika 20: Antibiogram sintetičnega fungicida (levo zgorja), sode bikarbone (zgoraj na sredini), majarona (desno zgorja) pri *Fusarium* sp. in NK (desno spodaj)



Slika 21: Negativna kontrola pri eksperimentu z bakterijskimi izolati



Slika 22: Učinek bakterijskih izolatov na *Alternaria alternata*



Slika 23: Učinek bakterijskih izolatov na *Fusarium* sp.