

Izolacija i identifikacija plijesni iz žitarica s područja Republike Hrvatske

Uzelac, Tamara

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:513857>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Tamara Uzelac

7828/BT

**IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA PLIJESNI IZ ŽITARICA
S PODRUČJA REPUBLIKE HRVATSKE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Izolacija i identifikacija plijesni iz žitarica s područja Republike Hrvatske

Tamara Uzelac, 0058215633

Sažetak:

Plijesni su velika skupina mikroorganizama koje pripadaju carstvu Gljiva, a u prirodi su naširoko rasprostranjene u obliku aktivno živućih vegetativnih tijela ili u obliku spora. Općenito, dijele se na plijesni s polja, plijesni u skladištu, te plijesni uznapređovalog kvarenja. Žitarice su jedan od najvažnijih poljoprivrednih proizvoda u svijetu, a kvarenje žitarica najčešće je uzrokovano neučinkovitim sušenjem, što pogoduje rastu plijesni i može rezultirati povećanom razinom mikotoksina. Izolacija i identifikacija plijesni kultiviranjem, ključni su postupci za identifikaciju plijesni koje su prirodno prisutne u/na raznim sirovinama, pa tako i žitaricama. Stoga je cilj ovog rada bio izolirati i identificirati plijesni u uzorcima žitarica (pšenica, kukuruz i ječam) s područja Sjeverne, Istočne i Središnje Hrvatske, odrediti broj kolonija plijesni i ustvrditi koji je rod plijesni najzastupljeniji kako na pojedinoj žitarici tako i u pojedinoj regiji.

Ključne riječi: izolacija, identifikacija, plijesni, žitarice

Rad sadrži: 26 stranica, 15 slika, 1 tablicu, 39 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

Pomoć pri izradi: Željko Jakopović, mag.ing.techn.aliment.

Datum obrane: rujan, 2021

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology**

Isolation and identification of molds from cereals from the territory of the Republic of Croatia

Tamara Uzelac, 0058215633

Abstract:

Molds are large group of microorganisms that belong to the Fungus kingdom and in nature they are widespread in the form of actively vegetative bodies or in the form of spores. In general, they are divided into field fungi, storage fungi and advanced spoilage fungi. Cereals are one of the most important agricultural products worldwide, and their spoilage is most often caused by inefficient drying, which favors mold growth and can result in increased levels of mycotoxins. Isolation by cultivation and mold identification by microscopy are classified as key processes for the accurate identification of molds naturally present in/on food products including cereals. The aim of this study was to isolate and identify molds in cereal samples (wheat, corn and barley) from Northern, Eastern and Central Croatia, determine the number of grown mold colonies but also to see which genus of mold is most prevalent in individual region.

Keywords: isolation, identification, molds, grains

Thesis contains: 26 pages, 15 figures, 1 table, 39 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph.D. Ksenija Markov, Full professor

Technical support and assistance: Željko Jakopović, M.Sc.

Defence date: September, 2021

Izrada ovog završnog rada omogućena je uz sredstva Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj u sklopu projekta „*Istraživanje utjecaja klimatskih promjena na razvoj plijesni, mikotoksina i kvalitetu žitarica s prijedlogom mjera*“ (KK.05.1.1.02.0023.).

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. PLIJESNI.....	2
2.1.1. Plijesni i žitarice	3
2.1.2. Plijesni iz roda <i>Aspergillus</i>	4
2.1.3. Plijesni iz roda <i>Penicillium</i>	4
2.1.4. Plijesni iz roda <i>Fusarium</i>	5
2.2. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA PLIJESNI.....	5
3. MATERIJALI I METODE.....	8
3.1. MATERIJALI	8
3.1.1. Uzorci	8
3.1.2. Hranjiva podloga.....	8
3.1.3. Pribor i aparatura.....	8
3.2. METODE RADA	9
3.2.1. Priprema hranjivih podloga	9
3.2.2. Određivanje broja kolonija plijesni	9
3.2.3. Izolacija plijesni	10
3.2.4. Identifikacija plijesni.....	12
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	13
4.1. REZULTATI.....	13
4.1.1. Rezultati određivanja broja kolonija plijesni.....	13
4.1.2. Rezultati pojavnosti plijesni	18
4.2. RASPRAVA	20
5. ZAKLJUČAK	22
6. POPIS LITERATURE.....	23

1. UVOD

Plijesni su eukariotski, mikroskopski, filamentozni mikroorganizmi koji pripadaju carstvu *Funga*, koje broji više od 100 000 vrsta. Plijesni razgrađuju mrtve organizme i recikliraju važne biogene elemente kako bi ih biljke mogle ponovno koristiti. Pozitivni učinci plijesni najviše su izraženi u farmaceutskoj industriji gdje se koriste za proizvodnju lijekova (penicilin), vitamina i organskih kiselina. Također, koriste se u prehrambenoj industriji gdje služe za oplemenjivanje sireva (sirevi poput kamembera, danskog plavog sira, gorgonzole i mnogih drugih, formirajući specifičan miris i okus) (Giraud i sur., 2010). Osim svojih pozitivnih učinaka, plijesni su česti patogeni na biljkama i insektima pa tako svoje stanište pronalaze i na žitaricama, te utječu na njihovu kvalitetu i sastav, te posljedično i na kvalitetu proizvoda na bazi žitarica, a mogu uzrokovati i bolesti kod kralježnjaka. Osim narušavanja nutritivne kvalitete sirovina, te značajnih ekonomskih problema, proizvodnjom toksičnih sekundarnih metabolita – mikotoksina, kod ljudi izazivaju bolesti nazvane mikotoksikoze, te tako narušavaju zdravlje ljudi (Drčelić, 2011). Sve se to odražava i na međunarodnu trgovinu i na odnose među pojedinim zemljama, od kojih najviše štete imaju one koje su stjecajem okolnosti fokusirane na monokulturnu proizvodnju (nerazvijene zemlje i zemlje u razvoju) uz primitivna tehnološka rješenja (Milićević i sur., 2014). Kako bi spriječili negativne učinke plijesni, potrebno je spriječiti njihov rast u svim fazama proizvodnje. Od velike je važnosti pravilno uzorkovanje sirovina i prehrambenih proizvoda, te na posljetku izolacija i identifikacija plijesni. Točnom identifikacijom plijesni dobiva se informacija o potencijalnoj štetnosti plijesni, što u konačnici ima ulogu na ljudsko zdravlje. Cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati plijesni iz žitarica – pšenice, kukuruza i ječma, prikupljenih iz tri hrvatske regije – istočne, sjeverne i središnje te odrediti njihovu pojavnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PLIJESNI

Plijesni su skupina mikroorganizama koje pripadaju carstvu Gljiva, široko su rasprostranjene u prirodi bilo u obliku aktivno živućih vegetativnih tijela ili u obliku spora (Duraković i Duraković, 2000). Tijelo plijesni je građeno od gustih razgranatih ili nerazgranatih vlaknastih niti, obično bezbojnih i bez klorofila. Hife (guste vlaknaste niti) tvore isprepletenu masu koja se naziva micelij, a micelij se rasprostire po podlozi te može biti zračni (iznad podloge) ili supstratni (u podlozi) (Markov, 2005).

Plijesni su široko rasprostranjene, te rastu na raznolikim staništima (Sekar i sur., 2008), uključujući pustinje, mora, područja s ekstremno niskim/visokim temperaturama, a pokazale su i sposobnost preživljavanja jakih UV zračenja (Atanda i sur, 2011). Zbog svoje izdržljivosti, vrlo lako kontaminiraju i uništavaju svježe i obrađene proizvode prehrambene industrije, te time uzrokuju velike ekonomske gubitke (Atanda i sur., 2011).

Određeni sojevi plijesni svoju primjenu pronalaze u biotehnologiji i prehrambenoj industriji tijekom proizvodnje lijekova, enzima, antibiotika, prehrambenih proizvoda i pića. Uz svoje dobre strane, plijesni su i uzročnici raznih bolesti u ljudi i životinja – uzrokuju razne alergijske reakcije, ali i bolesti uzrokovane mikotoksinima (mikotoksikoze). Mikotoksini, kao česti onečišćivači hrane, uz brojne značajne štete u gospodarstvu, uzrokuju bolesti najčešće putem hrane (Domaćinović i sur., 2012; HAH, 2013).

U ekonomski važne rodove plijesni ubrajaju se rodovi *Penicillium* i *Aspergillus*. Ova dva roda plijesni uzrokuju kvarenje i propadanje namirnica, a kao neke od produkata sekundarnog metabolizma sintetiziraju i mikotoksine. Svojim metabolizmom, plijesni još proizvode i različite kemijske spojeve – jednostavne organske kiseline, te velike i složene molekule (Čvek i sur., 2010).

Plijesni se mogu prenositi i zrakom, što omogućava njihovo brzo širenje. Na namirnicama izazivaju različite stupnjeve raspadanja i vidljivih pogoršanja. Njihov rast se može uočiti pojavom točkastih mjesta, paučinastog pokrova (micelij), ili obojanom kolonijom plijesni s puno spora. Uz vidljive promjene, plijesni mogu uzrokovati i promjenu mirisa i okusa zbog fermentativnih, lipolitičkih i proteolitičkih promjena izazvanih enzimskim reakcijama s ugljikohidratima, proteinima i mastima u hrani (Marriott i Gravani, 2006).

Prema općenitoj klasifikaciji plijesni, dijele se na plijesni s polja, plijesni u skladištu, te plijesni uznapređovalog kvarenja (Duraković i Duraković, 2003). Glavna razlika između plijesni s polja i plijesni u skladištu je vremenski period u kojem kontaminiraju zrnje, no razlika između plijesni s polja i skladišnih plijesni nije apsolutna. Utvrđeno je da iako neke plijesni napadaju zrna na polju, one i dalje mogu rasti u uvjetima skladištenja. Slično, neke plijesni koje se klasificiraju kao plijesni u skladištu, mogu napasti zrna u ranijim fazama razvoja žitarica (Pitt i Hocking, 2009).

2.1.1. Plijesni i žitarice

Žitarice su jedan od najvažnijih poljoprivrednih proizvoda u svijetu, korištene za prehranu ljudi i životinja. Svjetski značaj i opsežna uporaba žitarica i njihovih proizvoda čini očuvanje i dekontaminaciju žitarica jednim od najvažnijih pitanja sigurnosti hrane. Mikroba kontaminacija zrnja žitarica događa se tijekom uzgoja, berbe, nakon berbe i skladištenja (Magan i Aldred, 2006), a potječe iz nekoliko izvora, uključujući zrak, prašinu, vodu, tlo, insekte, izmet ptica i glodavaca, kao i kontaminirane površine, opremu i nehigijensko rukovanje.

Kvarenje žitarica filamentoznim gljivicama tijekom skladištenja najčešće je uzrokovano neučinkovitim sušenjem, što pogoduje rastu mikroba i može rezultirati povećanjem razine mikotoksina (Magan i Aldred, 2006). Ako je sušenje odgođeno i udio vlage u sjemenu prikladan, može doći do rasta plijesni s polja, kao na primjer *Fusarium* sp.

Plijesni koje kao svoje stanište imaju sjemenke žitarica, odgovorne su za prigušivanje rasta zrna prije i nakon nicanja, što uzrokuje smanjenu klijavost (Amadi i Adeniyl, 2009). Također, mogu uzrokovati već spomenute mikotoksikoze kod stoke, peradi i ljudi. Patogeni koji se prenose sjemenom mogu uzrokovati pobačaj, truljenje i nekrozu sjemena, te proizvodnju metabolita (poput toksina) koji mogu promijeniti sastav ili metabolizam zrna ili ga učiniti neprikladnim za prehranu ljudi i životinja (Abdullah i sur., 2014).

Svjetska proizvodnja žitarica uvelike se oslanja na unos kemijskih agensa, uključujući fungicide, herbicide i insekticide kako bi se pristupilo boljoj zaštiti sirovina. Primarne prednosti primjene pesticida su zaštita usjeva od negativnih utjecaja štetočina, veći prinosi i bolja kvaliteta žitarica. Međutim, upotreba pesticida izaziva nekoliko zabrinutosti, posebno povezanih s njihovim utjecajima na okoliš, poput smanjenja biološke raznolikosti, zagađenja površinskih i podzemnih voda, zagađenja tla i smanjenja plodnosti, kao i izravnog štetnog utjecaja na ljude i druge neciljane organizme (Los i sur., 2018; Tatsadjieu i sur., 2016).

2.1.2. Plijesni iz roda *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* obuhvaća vrste čija su obilježja od visokog patološkog, poljoprivrednog, industrijskog, farmaceutskog, znanstvenog i kulturnog značaja (Goldman i Osmani, 2008). Vrste plijesni koje pripadaju rodu *Aspergillus*, rasprostranjene su širom svijeta, uglavnom u tropskim i suptropskim klimama, u tlu i raznim uskladištenim proizvodima poput žitarica, orašastih plodova, začina te na suhomesnatim proizvodima. Tako se i ove plijesni ubrajaju u plijesni iz skladišta, iako vremenski uvjeti i povoljan okoliš mogu pripomoći njihovom rastu na polju (Jedidi i sur., 2018).

Aspergilli uzrokuju širok spektar infekcija uključujući kožne manifestacije, otomikozu i invazivne infekcije poput plućne aspergiloze i endokarditisa (Balajee i sur., 2007), pozitivni učinci ovog roda plijesni je uloga u sintezi brojnih kemijskih spojeva, proizvodnji enzima, no također, sudjeluju u razgradnji velikog broja prehrambenih proizvoda te sintezi mikotoksina (Zadravec i sur., 2019).

Najvažnije vrste su *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* i *Aspergillus niger*, te one kod ljudi i životinja izazivaju bolesti – aflatoksikoze (Kuveždić i sur., 2021). U biotehnologiji se koriste za proizvodnju različitih vrsta metabolita kao što su antibiotici, organske kiseline, lijekovi, enzimi ili pomoćna sredstva u procesima proizvodnje fermentirane hrane (Samson i sur., 2014).

2.1.3. Plijesni iz roda *Penicillium*

Penicillium je jedan od najvećih i najvažnijih rodova mikroskopskih gljiva, s preko 400 opisanih vrsta rasprostranjenih širom svijeta (Visagie i sur., 2014) na različitim staništima kao što su zemlja, biljke, zrak i brojni prehrambeni proizvodi. Plijesni roda *Penicillium* također su klasificirane u skupinu plijesni u skladištu, te predstavljaju opasnost prilikom pojave na prehrambenim proizvodima zbog moguće proizvodnje mikotoksina. Vrste roda *Penicillium* imaju važnu ulogu u razgradnji organskih spojeva (Visagie i sur., 2014).

Penicillium vrste prepoznatljive su po proizvodnji konidija u strukturi nazvanoj prema latinskoj riječi „penicillus“ što znači „mali kist“. Plijesni roda *Penicillium* sastoje se od grana koje na sebi imaju metule, a metule sadrže fialide, noseći jednostanične, male konidije u lancima. Razlikovanje vrsta plijesni roda *Penicillium* je teško, a mnoge vrste pokazuju određenu varijabilnost unutar pojedine vrste. Kada se kolonije uzgoje najčešće su zeleno-plave, sivo-plave

ili bijele boje, sa ili bez eksudata (Pitt i Hocking, 2009) pa je tako naziv „plava plijesan“ uobičajen naziv kojim se opisuju većina vrsta roda *Penicillium*.

2.1.4. Plijesni iz roda *Fusarium*

Plijesni roda *Fusarium* rastu na određenim usjevima prije žetve biljke i nakon spremanja u silose (Katalenić, 2004), te su jedni od najvažnijih patogena na žitaricama (Erler i sur., 2020). Također, direktno izazivaju bolesti u biljaka, ljudi i domaćih životinja, te proizvode znatnu količinu sekundarnih metabolita koji su povezani sa bolestima poput raka i poremećaja u rastu ljudi. Neki od tih sekundarnih metabolita se koriste direktno ili kao starter materijal za kemijsku sintezu biljnih i životinjskih promotora rasta (Leslie i Summerell, 2008). Količina toksina ovisi o zemljopisnoj lokaciji, agronomskoj praksi, načinu spremanja žitarica u silose te podložnosti i osjetljivosti biljke na plijesan (Katalenić, 2004).

Morfološka identifikacija zahtijeva znatnu stručnost, osobito u razlikovanju blisko povezanih vrsta *Fusariuma*, jer se njihove morfološke značajke mogu preklapati. Plijesni roda *Fusarium* se najčešće identificiraju kombinacijom morfoloških, bioloških i molekularnih podataka (Sever i sur., 2012).

Fusarium vrste formiraju tri vrste spora: makrokonidije, mikrokonidije i hlamidospore, a neke gljive formiraju i sve tri vrste spora odjednom. Mikrokonidije su jednostanične, ovalne, nastaju na monofijalidama u lažnim glavicama. Makrokonidije su višestanične, blago srpastog oblika s bazalnom stanicom u obliku stopice, nastaju na monofijalidama u sporodohijama krem boje (Nelson i sur., 1994.).

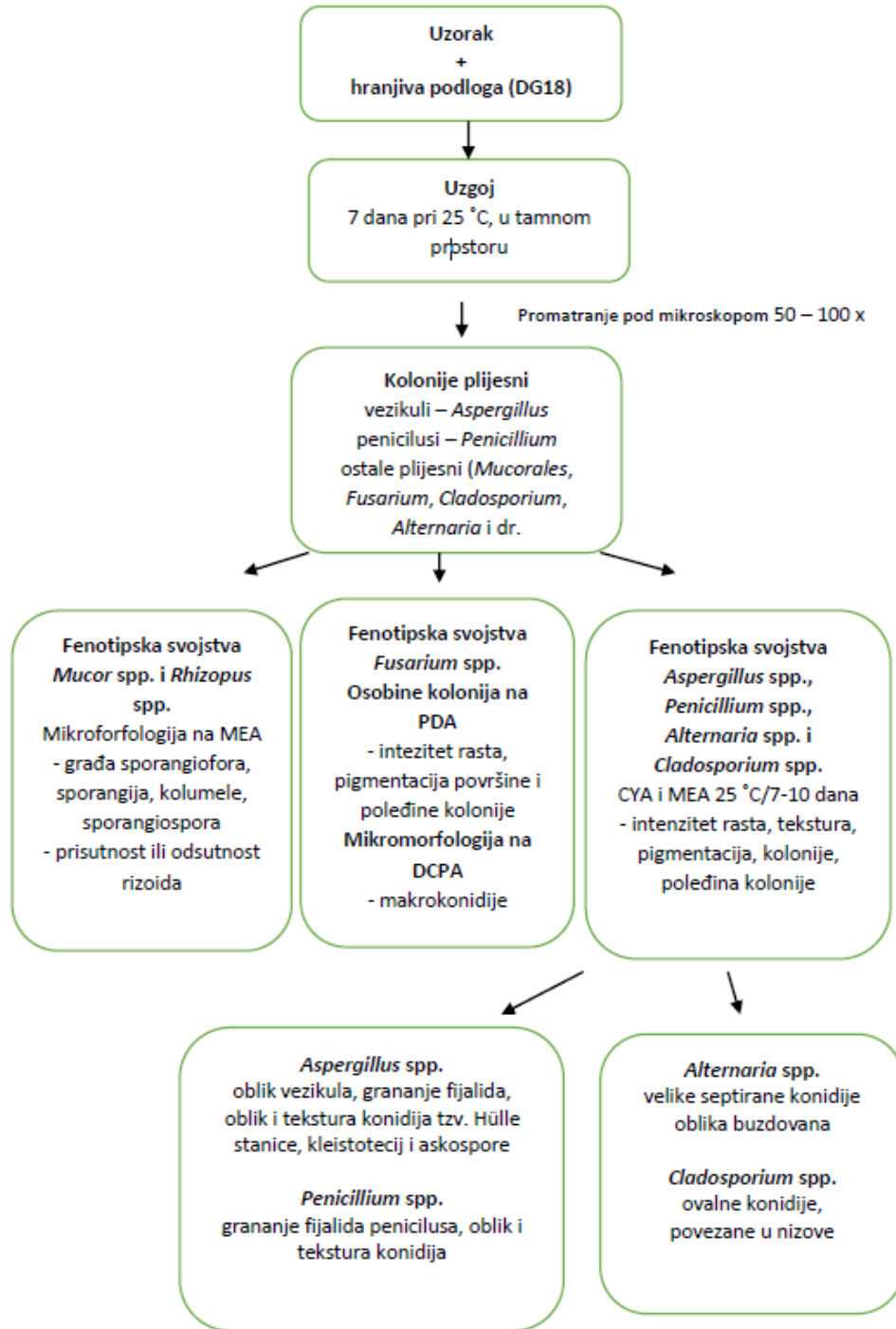
2.2. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA PLIJESNI

Kako bi se mogla provesti identifikacija plijesni potrebno je pravilno provesti izolaciju čiste kulture s odabrane namirnice, te nakon toga odrediti vrstu plijesni prema odgovarajućim identifikacijskim ključevima. Za samu izolaciju se mogu koristiti klasične mikrobiološke metode koje podrazumijevaju izolaciju plijesni s uzorka, te nacjepljivanje na hranjivu podlogu. Uzorkovanje se provodi ovisno o tome kako je plijesan porasla na površini namirnice, te u kojoj je mjeri prisutna. Važno je da se uzorkovanje provodi u aseptičnim uvjetima, popraćeno dezinfekcijom opreme alkoholom. Načini uzorkovanja plijesni ovisno o njihovom porastu:

- Ako plijesni rastu difuzno, na površinu namirnice se nalijepi ljepljiva traka koja se zatim prenese na hranjivu podlogu (ljepljiva strana s plijesnima na površinu hranjive podloge), traka se uklanja nakon 2 dana kako bi plijesni mogle rasti.
- U slučaju ako plijesni nisu vidljive na površini namirnice, namirnica se prebriše vatom uronjenom u fiziološku otopinu te se nacijepi na hranjivu podlogu.
- Ukoliko je porast plijesni jasno vidljiv, kolonije se mogu odvojiti od površine namirnice koristeći oštar skalpel, te pažljivo položiti na hranjivu podlogu.

Nakon provedenog uzorkovanja i inkubacije plijesni tijekom 5 - 7 dana pri 25 °C slijedi izolacija plijesni. Porasle kolonije plijesni se nacijepljuju, pomoću sterilizirane mikrobiološke igle, na izabranu hranjivu podlogu. Cilj ponovnog nacijepljivanja je izolirati pojedine kulture plijesni kako bi identifikacija bila što preciznija. Inkubacija ponovno traje 5 - 7 dana pri 25 °C. Ukoliko se nakon inkubacije ne dobije potpuno čista kultura plijesni, potrebno je ponoviti postupak izolacije čiste kulture. Čiste kulture plijesni podrazumijevaju prisutnost jedne vrste plijesni bez vanjskih kontaminacija, a same porasle kolonije moraju biti ujednačenog oblika, teksture i boje što je pokazatelj uspješne izolacije.

Prilikom identifikacije plijesni, potrebno je uzeti u obzir mnogo parametara – boju micelija, dimenzije, izgled kolonije s donje strane (revers), stupanj rasta, teksturu, izgled vezikula i konidija. Na slici 1 shematski je prikazan uzgoj i identifikacija najznačajnijih rodova plijesni.



Slika 1. Shematski prikaz uzgoja i identifikacije najznačajnijih rodova plijesni (Hajsig i Delaš, 2016)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za izolaciju i identifikaciju plijesni, korišteni su mljeveni uzorci zrnja pšenice (P), kukuruza (K) i ječma (J), dobavljeni s područja tri hrvatske regije – istočne, sjeverne i srednje. Za potrebe analize, uzorci su transportirani u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica te čuvani na 4 °C do provođenja analize.

3.1.2. Hranjiva podloga

Za uzgoj i izolaciju čiste kulture plijesni u laboratorijskim uvjetima korišten je sladni agar čiji je sastav prikazan u tablici 1.

Tablica 1. Sastav podloge (sladni agar)

SASTAV	KONCENTRACIJA
Sladni ekstrakt (praškasti)	20 g/L
Pepton	6 g/L
Glukoza	20 g/L
Agar	15 g/L

3.1.3. Pribor i aparatura

Tijekom eksperimentalnog rada, korišten je sljedeći laboratorijski pribor i aparatura:

- Petrijeve zdjelice (ϕ 10 cm)
- Epruvete (16 × 160 mm)
- Štapići po Drigalskom
- Mikrobiološka ušica
- Mikrobiološke igle
- Bunsenov plamenik
- Pipetman 1000 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Vibromikser V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)

- Brojač kolonija BZG30 (WTW, Weilheim, Njemačka)
- Autoklav (Sutjeska, Beograd)
- Termostat (Sutjeska, Beograd)
- Pokrovna stakalca
- Predmetna stakalca
- Svjetlosni mikroskop (Olympus, Japan, CX21)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema hranjivih podloga

Dehidrirana hranjiva podloga se suspendira u 1000 mL hladne destilirane vode, zagrijava do vrenja uz često miješanje, te potom sterilizira autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 minuta.

Hranjive podloge su nakon pripreme, sterilizacije i hlađenja razlivene (10 mL) u Petrijeve zdjelice te ostavljene na sobnoj temperaturi kako bi se stvrdnule. Nakon toga, čuvane su pri 4 °C do upotrebe.

3.2.2. Određivanje broja kolonija plijesni

Kako bi se odredio broj plijesni prisutnih u ispitivanom uzorku, korištena je metoda neizravnog naciepljivanja serije decimalnih razrjeđenja (u omjeru 1:10).

Devedeset uzoraka žitarica (deset uzoraka za svaku žitaricu po regiji, npr. deset uzoraka pšenice s područja sjeverne Hrvatske) dobavljeno je grubo usitnjeno u plastičnim bočicama. Od svakog uzorka, odvagana je masa od 1 g, te homogenizirana u epruveti s deioniziranom vodom (10 mL), te su zatim napravljena po dva decimalna razrjeđenja za svaki uzorak. Zatim je po 0,1 mililitar drugog razrjeđenja svakog uzorka naciepljen na površinu sladnog agara u Petrijevima zdjelicama i inkubiran pri temperaturi od 25 °C. Rast plijesni praćen je tijekom sedam dana uzgoja, a kolonije plijesni porasle na sladnom agaru prebrojane su pomoću brojača kolonija, te izražene kao CFU vrijednost (eng. *Colony Forming Units*). Konačan broj kolonija plijesni u pojedinom uzorku izračunat je prema jednadžbi (1) i preračunat na gram uzorka:

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija (N)}}{\text{upotrijebljeni volumen uzorka (mL)}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja /mL} \quad (1)$$

3.2.3. Izolacija plijesni

U mikologiji se primjenjuje mnogo različitih metoda i postupaka kojima se provodi izolacija plijesni, a ovisno o vrsti uzorka odabire se pogodna metoda, izravno naciepljivanje uzoraka na hranjivu podlogu ili neizravno naciepljivanje serije decimalnih razrjeđenja.

Nakon što je neizravnom metodom naciepljivanja serije decimalnih razrjeđenja određen broj poraslih kolonija plijesni u svakom uzorku, svaka pojedina kolonija je zatim naciepljena na novu ploču sa sladnim agarom upotrebom mikrobiološke igle kako bi bilo moguće identificirati čistu kulturu plijesni. Mikrobiološke igle su neposredno prije korištenja sterilizirane u plamenu, ohlađene uz površinu ili u dubini agara, te su lagano prslonjene na koloniju porasle plijesni kako bi se uzele spore i/ili micelij s ciljem izolacije čiste kulture, a plijesan se na novu hranjivu podlogu naciepljuje u tri točke (slika 2). Petrijeve zdjelice s naciepljenim kulturama plijesni su inkubirane pri 25 °C tijekom sedam dana, nakon čega se pristupilo identifikaciji čistih kultura plijesni.

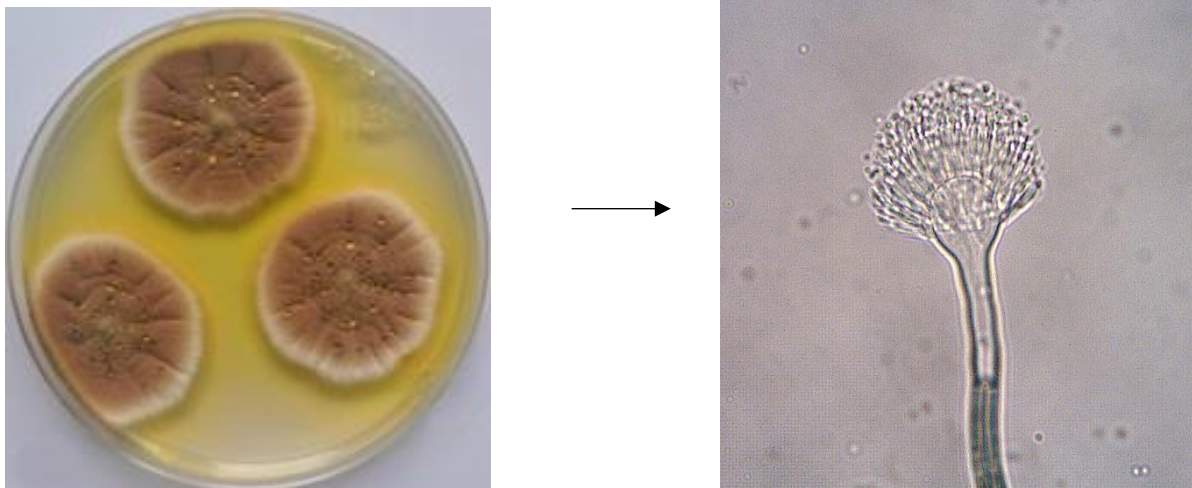


Slika 2. Shema izolacije čiste kulture plijesni (vlastita fotografija)

3.2.4. Identifikacija plijesni

Klasična ili tradicionalna identifikacija plijesni bazira se na makroskopskim i mikroskopskim karakteristikama plijesni poraslih na hranjivim podlogama pod različitim uvjetima inkubacije (slika 3). Identifikacija filamentoznih funga temelji se na karakteristikama kolonija i mikroskopskoj morfologiji. Vizualno ispitivanje kolonija brzo otkriva važne podatke poput pigmentacije, teksture, eksudata, makroskopske strukture, zone rasta, zračne i supstratne hife, kao i brzinu rasta.

Iako molekularne metode identifikacije svakodnevno napreduju i postaju sve dostupnije, mikroskopija i uzgoj kultura na hranjivim podlogama su najčešće korištene i vrlo važne metode za identifikaciju plijesni. Treba napomenuti da je za točnu identifikaciju plijesni na osnovu morfoloških karakteristika potrebno puno iskustva, vremena i strpljenja (Markov i sur., 2021).



Slika 3. Identifikacija plijesni mikroskopskim i makroskopskim pretraživanjem (vlastita fotografija)

4. REZULTATI I RASPRAVA

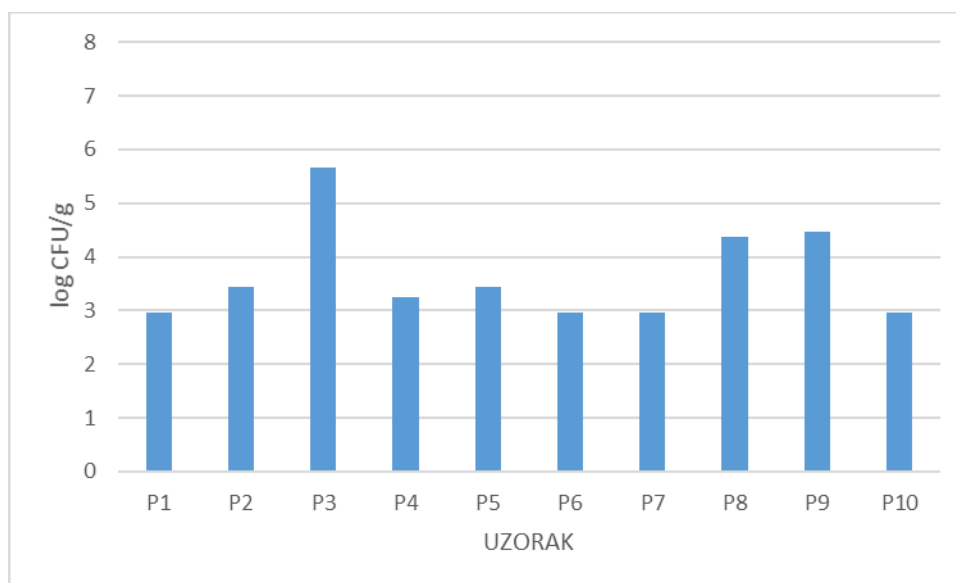
4.1. REZULTATI

Klasičnim mikrobiološkim metodama, na sladnom agaru je određen broj prisutnih kolonija plijesni koje su zatim identificirane u svrhu određivanja pojavnosti pojedinih rodova na žitaricama.

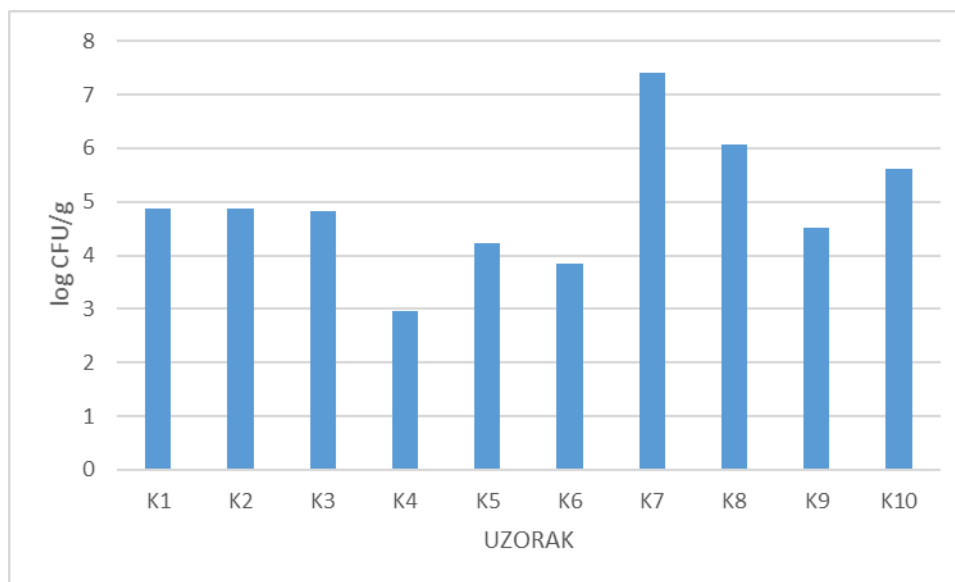
4.1.1. Rezultati određivanja broja kolonija plijesni

Rezultati određivanja broja kolonija plijesni u uzorcima žitarica (pšenica, kukuruz i ječam) s područja tri hrvatske regije – istočne, sjeverne i srednje prikazan je na slikama 4 – 12.

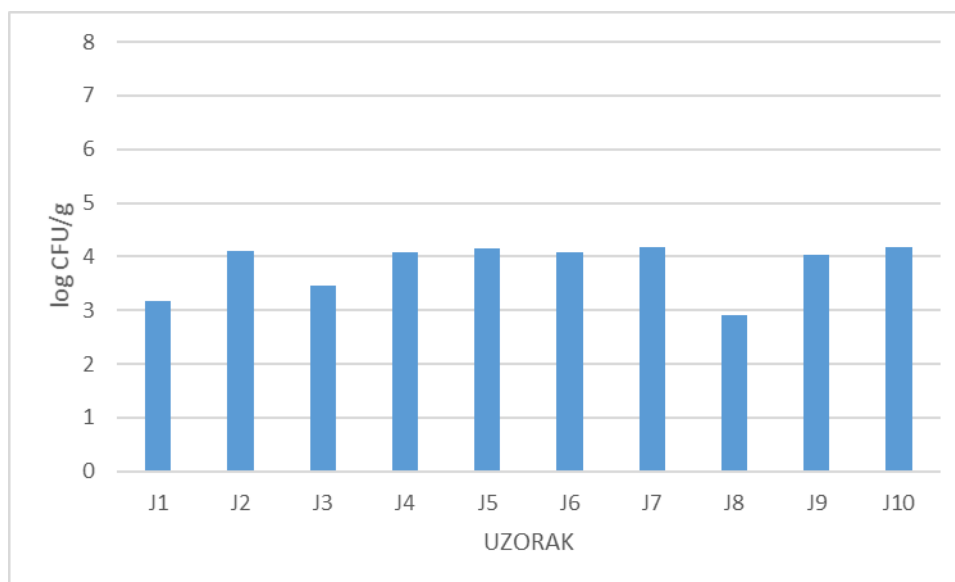
Na slikama 4 - 6 prikazan je broj kolonija plijesni u uzorcima žitarica s područja Sjeverne Hrvatske.



Slika 4. Broj kolonija plijesni izražen kao log CFU/g u uzorcima pšenice s područja Sjeverne Hrvatske

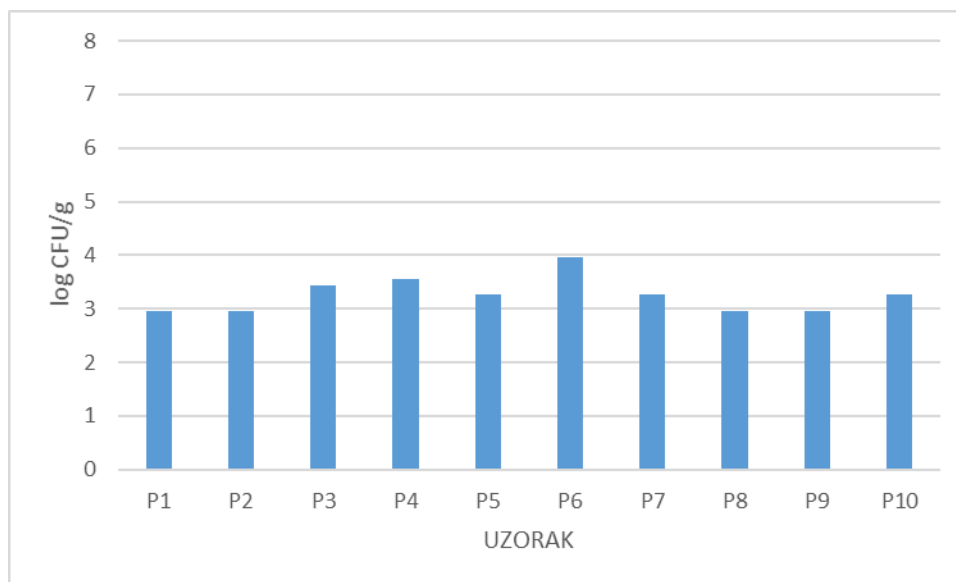


Slika 5. Broj kolonija plijesni izražen kao log CFU/g u uzorcima kukuruza s područja Sjeverne Hrvatske

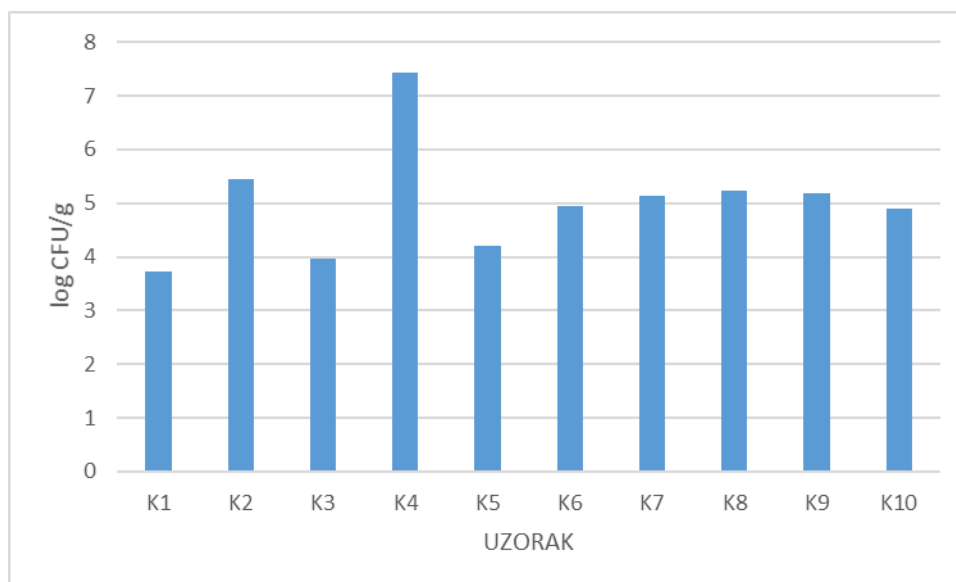


Slika 6. Broj kolonija plijesni izražen kao log CFU/g u uzorcima ječma s područja Sjeverne Hrvatske

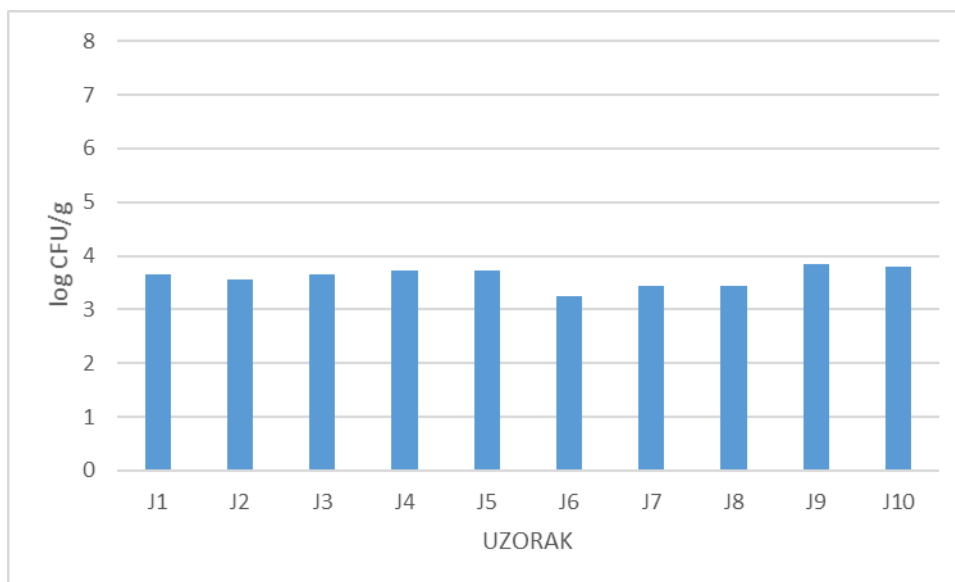
Na slikama 7 - 9 prikazan je broj kolonija plijesni u uzorcima žitarica s područja Istočne Hrvatske.



Slika 7. Broj kolonija plijesni izražen kao log CFU/g u uzorcima pšenice s područja Istočne Hrvatske

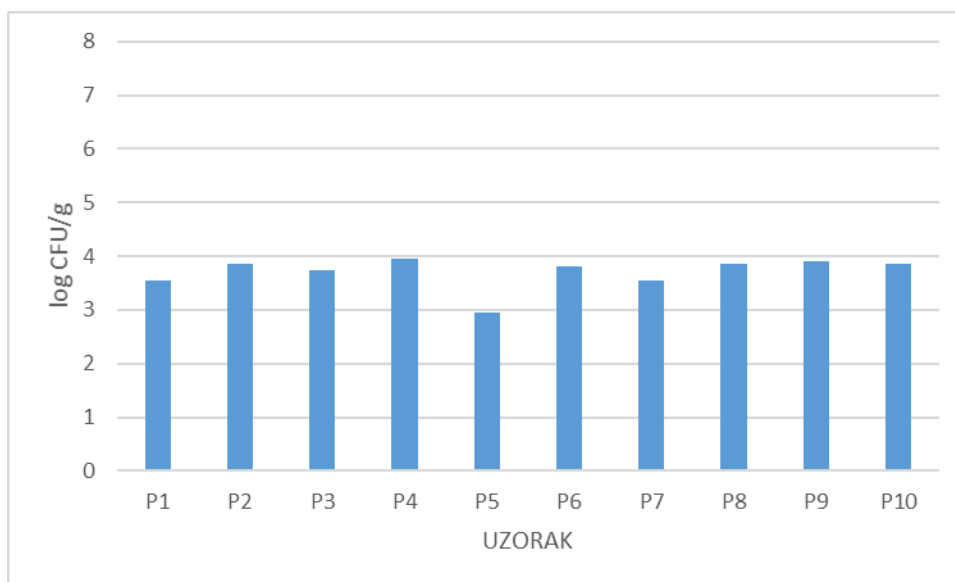


Slika 8. Broj kolonija plijesni izražen kao log CFU/g u uzorcima kukuruza s područja Istočne Hrvatske

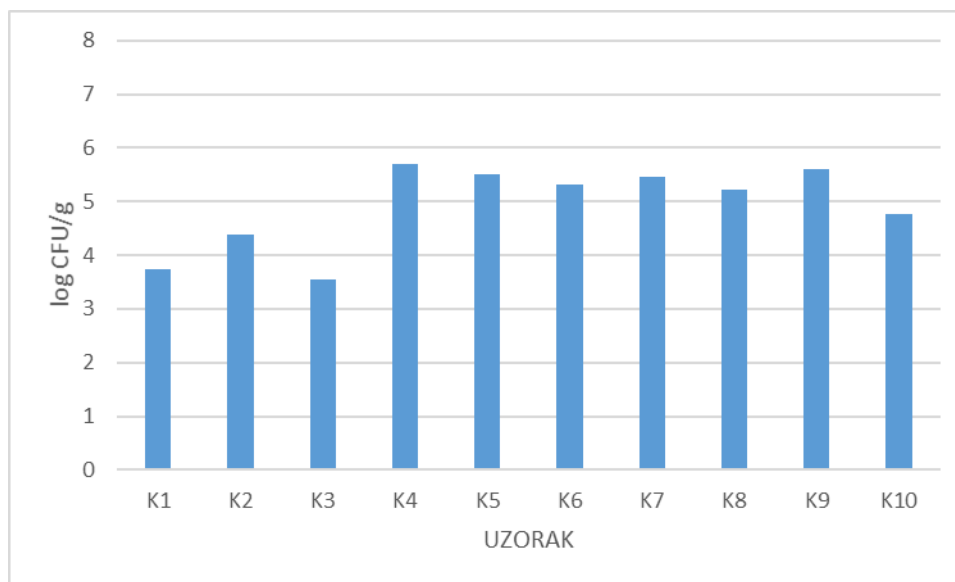


Slika 9. Broj kolonija plijesni izražen kao log CFU/g u uzorcima ječma s područja Istočne Hrvatske

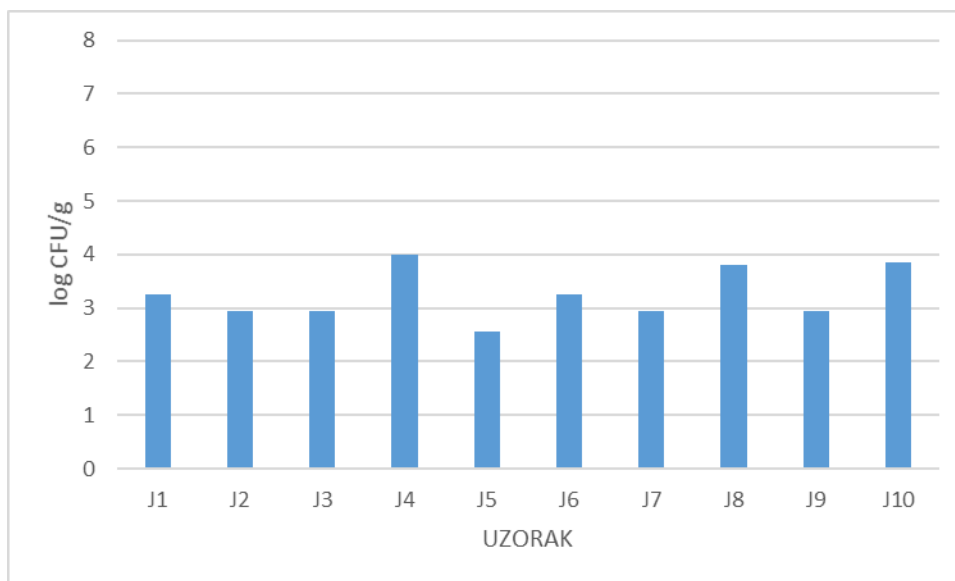
Na slikama 10 - 12 prikazan je broj kolonija plijesni u uzorcima žitarica s područja Središnje Hrvatske.



Slika 10. Broj kolonija plijesni izražen kao log CFU/g u uzorcima pšenice s područja Središnje Hrvatske



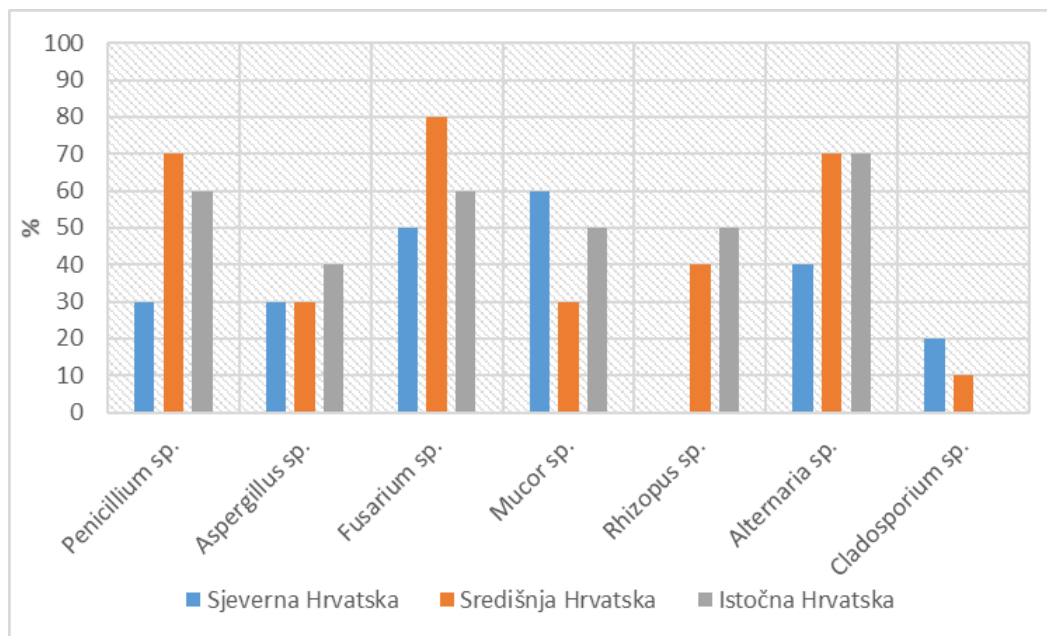
Slika 11. Broj kolonija plijesni izražen kao log CFU/g u uzorcima kukuruza s područja Središnje Hrvatske



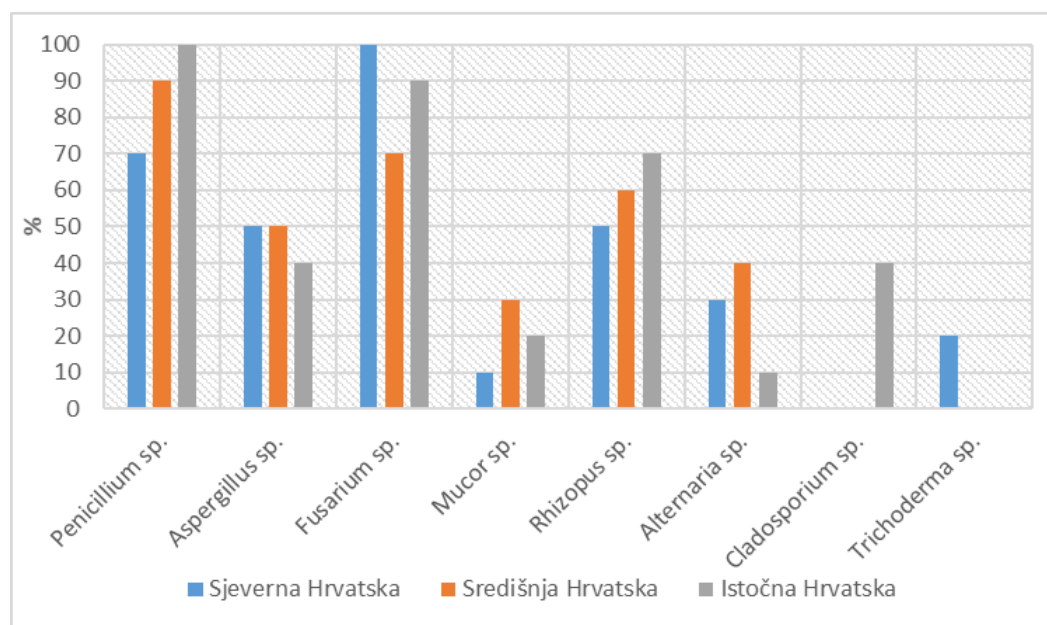
Slika 12. Broj kolonija plijesni izražen kao log CFU/g u uzorcima ječma s područja Središnje Hrvatske

4.1.2. Rezultati pojavnosti plijesni

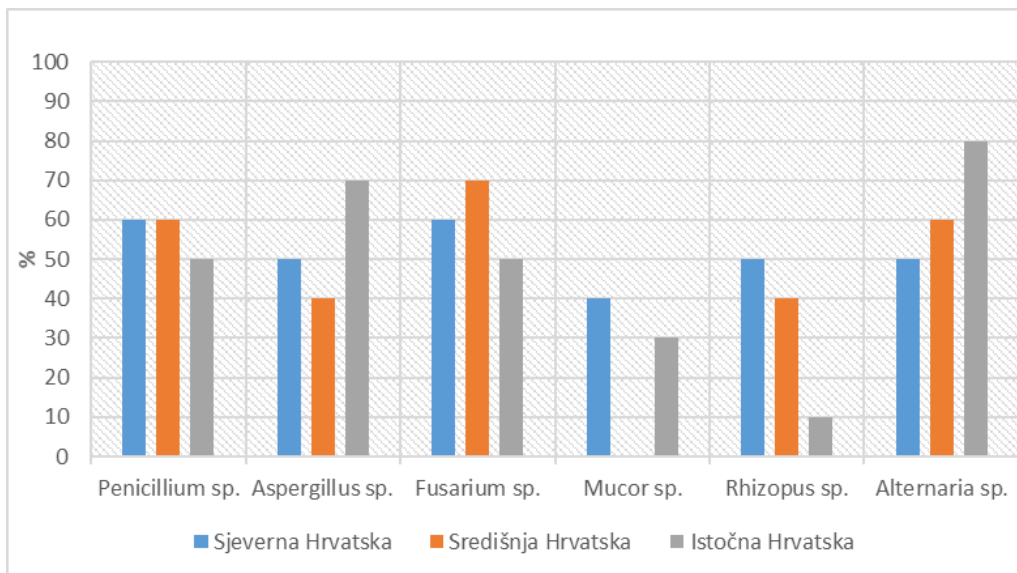
Na slikama 13 - 15 prikazan je udio pojedinih rodova plijesni poraslih na žitaricama – pšenici, kukuruзу i ječmu, s područja tri hrvatske regije – sjeverne, istočne i središnje.



Slika 13. Udio pojedinih rodova plijesni u uzorcima pšenice



Slika 14. Udio pojedinih rodova plijesni u uzorcima kukuruza



Slika 15. Udio pojedinih rodova plijesni u uzorcima ječma

4.2. RASPRAVA

Dobiveni rezultati govore o pojavnosti pojedinih rodova plijesni i njihovoj brojnosti. Plijesni su izolirane iz tri tipa žitarica – kukuruza, pšenice i ječma, a navedene žitarice dobavljene su s područja tri hrvatske regije – istočne, sjeverne i srednje. Za svaku žitaricu dobavljeno je po deset uzoraka iz jedne regije.

Neizravnom metodom nacjepljivanja decimalnih razrjeđenja uzoraka, utvrđen je ukupan broj poraslih kolonija plijesni svakog uzorka žitarice iz svake regije te je izražen kao CFU/g.

Iz priloženih rezultata na slikama 4 - 6, vidljivo je da se među uzorcima sjeverne Hrvatske, najveći broj kolonija plijesni pojavljuje na uzorcima kukuruza i u prosjeku iznosi 5,5 log CFU/g, dok je u uzorcima ječma zabilježen najmanji broj kolonija plijesni (slika 6). Plijesni se najčešće pojavljuju na oštećenim dijelovima klipa, a manifestiraju se u obliku presvlaka – crne ili zelenožute koje izazivaju plijesni roda *Aspergillus* ili ako ih izazove plijesan roda *Penicillium* onda će to biti presvlake plavozelene boje. Spomenute plijesni najčešće se javljaju u uvjetima vlažnih i hladnih vremenskih prilika. Vidljivo je kako na uzorcima žitarica iz sjeverne Hrvatske (slike 13 - 15) dominira plijesan iz roda *Fusarium*. Iako njoj više pogoduje vlažnija i toplija klima (Los i sur., 2018), pojava *Fusariuma* u sjevernoj Hrvatskoj vjerojatno je rezultat klimatskih promjena, te sve viših temperatura zraka i veće vlažnosti koje pogađaju područje sjeverne Hrvatske.

Na području Istočne Hrvatske, najveći broj kolonija plijesni također je izbrojan na uzorcima kukuruza, a najmanji na uzorcima ječma, što se može vidjeti na slikama 7 - 9. Na uzorcima žitarica iz istočne Hrvatske, koju karakterizira umjerena klima koja pogoduje rastu većine rodova plijesni, najviše se pojavljuju plijesni iz rodova *Penicillium* i *Fusarium* (slike 13 - 15). Prema istraživanju Defieryija i suradnika (2015), plijesni roda *Penicillium* i *Fusarium* bolje rastu pri višim temperaturama, ali isto tako, prilagodljive su na veće razlike u temperaturi. Uz to, rod *Penicillium* se smatra jednim od najvećih i najvažnijih rodova mikroskopskih gljiva (Visagie i sur., 2014). Također, zabilježena je i veća pojavnost plijesni iz roda *Alternaria* sp. u odnosu na druge regije (slike 13 - 15). Ovaj rod plijesni najbolje raste u okolišu velike vlažnosti, posebice ako je prije same žetve pala obilna količina kiše. Tada se na zrnu i ispod omotača pojavljuje diskolorcija u obliku crnih mrlja (Los i sur., 2018).

Kao i u prethodnim slučajevima, na području središnje Hrvatske, najveći broj kolonija plijesni izbrojan je na uzorcima kukuruza (slika 11), dok je broj kolonija plijesni na uzorcima pšenice i ječma podjednak, što je vidljivo na slikama 10, odnosno 12. Sve tri žitarice s područja središnje Hrvatske su u podjednakoj mjeri dobar domaćin za rast plijesni iz rodova *Fusarium* i

Penicillium, iako su jasno uočljive razlike u rodovima plijesni koje u većoj mjeri rastu u drugim regijama (slike 13 – 15). Također, rezultati eksperimenta su pokazali da na žitaricama središnje Hrvatske svi identificirani rodovi plijesni rastu podjednako dobro, uz iznimke plijesni iz roda *Mucor* i *Cladosporium* sp., što govori da klimatski uvjeti središnje Hrvatske najbolje pogoduju rastu velikog broja različitih plijesni.

Tijekom ovog rada, određena je pojavnost plijesni na žitaricama iz tri regije Republike Hrvatske. Uočeno je kako se s najvećim udjelom, u sve tri regije pojavljuju plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* (slike 13 – 15). Ove plijesni mogu proizvoditi mikotoksine i na taj način ugrožavaju zdravlje potrošača i kvalitetu namirnica. Na slikama 13 - 15, vidljivo je da se uz navedena tri roda plijesni, pojavljuju još i plijesni iz roda *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp te *Cladosporium* sp., a među uzorcima sjeverne Hrvatske, uz navedene plijesni, identificirana je i plijesan *Trichoderma* sp., što govori o velikoj raznolikosti plijesni i promjenama u klimatskim uvjetima.

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti:

- Na uzorcima žitarica iz tri regije Hrvatske (sjeverna, istočna i središnja) prevladavaju plijesni iz rodova *Fusarium*, *Penicillium* i *Aspergillus*.
- Najveći broj kolonija plijesni detektiran je na uzorcima kukuruza u sve tri regije u odnosu na pšenicu i ječam.
- Pojavnost određenog roda plijesni na žitaricama varira ovisno o regiji uzgoja, a na pojavnost također uvelike utječu i klimatski čimbenici poput vlage zraka, temperature, sunčeve svjetlosti i slično.

6. POPIS LITERATURE

Abdullah S.K., Atrosh H.I.M. (2014) New records of fungi on wheat grains from Iraq. *Science Journal of University of Zakho* **2(2)**: 256-265.

Al-Defiery M. E., Merjan A. F. (2015) Mycoflora of mold contamination in wheat flour and storage wheat flour. *Mesopotamia Environmental Journal* **1(2)**: 18-25.

Al-Hindi R.R., Al-Najada A.R., Mohamed S.A. (2011). Isolation and identification of some fruit spoilage fungi: Screening of plant cell wall degrading enzymes. *African Journal of Microbiology Research* **5(4)**: 443-448.

Amadi J. E., Adeniyl D.O. (2009) Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. *African Journal of Biotechnology* **8(7)**: 1219-1221.

Anonymus1 (2019) Morphology and General Properties of Fungi <<https://nios.ac.in/media/documents/dmlt/Microbiology/Lesson-51.pdf>> Pristupljeno 25. srpnja 2021.

Atanda S.A., Pessu P.O., Agoda S., Isong I.U., Adekalu O.A., Echendu M.A., Falade T.C. (2011) Fungi and mycotoxins in stored foods. *African Journal of Microbiology Research* **5(25)**: 4373-4382.

Balajee S. A., Houbraken J., Verweij P. E., Hong S. B., Yaghuchi T., Varga J., Samson R. A. (2007). *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Studies in mycology* **59**: 39-46.

Čvek D., Frece J., Markov K., Friganović M., Delaš F. (2010) Antifungalni učinak bakterije *Lactobacillus plantarum* K1 na rast plijesni *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **5**: 43-47.

Domaćinović M., Ćosić J., Klapac T., Peraica M., Mitak M. (2012) Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje. *Hrvatska agencija za hranu*.

Drčelić, M. (2011). Plijesni i toksini (Seminarski rad, Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički Fakultet. Preddiplomski studij biologije).

Duraković S., Duraković L. (2000) Specijalna mikrobiologija, Durieux, Zagreb. str. 3-56.

Duraković S., Duraković L. (2003) Mikologija u biotehnologiji, Kugler, Zagreb. str. 19-97.

Erlar A., Riebe D., Beitz T., Löhmannsröben H.G., Grothusheitkamp D., Kunz T., Methner F.J. (2020). Characterization of volatile metabolites formed by molds on barley by mass and ion mobility spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **55(5)**: e4501.

Giraud F., Giraud T., Aguilera G., Fournier E., Samson R., Cruaud C., Lacoste S., Ropars J., Tellier A., Dupont J. (2010) Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. *International Journal of Food Microbiology* **137**: 204–213.

Goldman G. H., Osmani S. A. (2008) *The Aspergilli – Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods*, CRC Press, New York. str. 3-11.

HAH - Hrvatska agencija za hranu (2013) Što su mikotoksini?, <<https://www.hah.hr/sto-sumikotoksini/>> Pristupljeno 25. srpnja 2021.

Hajsig D., Delaš F. (2016) Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije. Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, 99-109.

Jedidi I., Soldevilla C., Lahouar A., Marín P., González-Jaén M. T., Said S. (2018). Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. *Saudi journal of biological sciences* **25(5)**: 868-874.

Katalenić M. (2004) Toksini *Fusarium* plijesni i drugi toksini (II.dio). *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu* **6(5)**: 31-35

Kuveždić T., Duvnjak M., Tanuwidjaja I., Mrkonjić Fuka M. (2021). Prognoza pojavnosti mikotoksikotvornih plijesni na poljoprivrednim kulturama. *Glasiilo biljne zaštite* **21(4)**: 430-442.

Leslie J.F., Summerell B.A. (2008) *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley and Sons.

Los A., Ziuzina D., Bourke P. (2018) Current and future technologies for microbiological decontamination of cereal grains. *Journal of food science* **83(6)**: 1484-1493.

Magan N., Aldred D. (2006) Managing microbial spoilage in cereals and baking products. *Food spoilage microorganisms*, 194.

Markov K. (2005) Utjecaj odabranih parametara na rast plijesni u mješovitim kulturama i biosintezi patulina i zearalenona, doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Markov K. (2017) Interna skripta iz kolegija „Mikrobiologija“, prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.

Markov K., Pleadin J., Jakopović Ž., Zdravec M., Frece J. (2021) Plijesni - odabrane značajke, izolacija i identifikacija. 119-120. (U postupku objave)

Marriott N.G., Gravani R.B. (2006) Principles of Food Sanitation. New York.

Miličević D., Nedeljković-Trailović J., Mašić Z. (2014) Mikotoksini u lancu ishrane—analiza rizika i značaj za javno zdravstvo. *Scientific journal" Meat Technology"* **55(1)**: 22-38.

Nelson P. E., Dignani M.C., Anaissie E.J. (1994.) Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species. *Clinical microbiology reviews* **7(4)**: 479-504.

Pejić S. (2015) Kontrola mikrobiološke ispravnosti prostora i nekih namirnica (Završni rad, Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku. Prehrambeno-tehnološki Fakultet. Zavod za prehrambene tehnologije. Katedra biologije i mikrobiologije).

Perković, I. (2019). Utjecaj površinske plijesni na sigurnost i kvalitetu tradicionalnih fermentiranih kobasica (Doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku. Prehrambeno-tehnološki Fakultet. Zavod za prehrambene tehnologije. Katedra tehnologije mesa i ribe).

Pitt J.I. (2000) Toxigenic fungi: Which are important?. *Medical Mycology* **38**: 17-22.

Pitt J.I., Hocking A.D. (2009) Fungi and food spoilage (Vol.519, p.388) New York: Springer.

Samson R. A., Visagie C. M., Houbraken J., Hong S. B., Hubka V., Klaassen C. H. W., Perrone G., Seifert K. A., Susca A., Tanney J. B., Varga J., Kocsube S., Szigeti G., Yaguchi T., Frisvad J. C. (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology* **78**: 141-173.

Sekar P., Yumnam N., Ponmurugan K. (2008) Screening and Characterization of Mycotoxin Producing Fungi from Dried Fruits and Grains. *Advanced Biotech* **7(1)**: 12-15.

Sever Z., Ivić D., Kos T., Miličević T. (2012). Identification of Fusarium species isolated from stored apple fruit in Croatia. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **63(4)**: 463-469.

Tatsadjieu L.N., Tchikoua R., Funtong C.M.M. (2016) Antifungal activity of lactic acid bacteria against molds isolated from corn and fermented corn paste. *American Journal of Microbiological Research* **4**: 90-100.

Visagie C. M., Houbraeken J., Frisvad J. C., Hong S. B., Klaassen C. H. W., Perrone G., Seifert K. A, Varga J. A., Yaguchi T., Samson R. A. (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology* **78**: 343-371.

Zadravec M., Markov K., Frece J., Perković I., Jakopović Ž., Lešić T., Mitak M., Pleadin J. (2019) Toxigenic moulds and the occurrence of mycotoxin in traditional meat products. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **11**: 187-197.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Tamara Uzelac

Tamara Uzelac