

Izolacija i identifikacija plijesni klasičnim mikrobiološkim metodama

Čuljak, Klara

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:381376>

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

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

Klara Čuljak

7402/BT

**IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA PLIJESNI KLASIČNIM
MIKROBIOLOŠKIM METODAMA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: prof. dr. sc. *Ksenija Markov*

Zagreb, 2019.

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 klasičnim mikrobiološkim metodama

Klara Čuljak, 0058210600

Sažetak:

Izolacija kultiviranjem i identifikacija plijesni mikroskopiranjem ključni su postupci za identifikaciju plijesni koje su prirodno prisutne u/na prehrambenim proizvodima. Ovisno o sastavu hranjive podloge, plijesni sintetiziraju različite pigmente, što je uz morfološke karakteristike važno obilježje za njihovu identifikaciju. Cilj ovog istraživanja bio je izolirati plijesni s tradicionalnih mesnih proizvoda te ih identificirati na temelju njihovih fenotipskih karakteristika tj. makromorfologije (izgled i boja kolonije na hranjivoj podlozi) i mikromorfologije (spore i hife). Izolacija čistih kultura plijesni provedena je na pet različitih hranjivih podloga: Czapekov agar, Sabouraudov agar, krumpirov dekstrozni agar (komercijalni), krumpirov dekstrozni agar (napravljen u laboratoriju) i sladni agar tijekom pet do sedam dana na 28 °C. Kolonije poraslih plijesni mikroskopski su pretražene i identificirane prema identifikacijskim ključevima. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da izolirane plijesni pripadaju rodovima *Penicillium* i *Aspergillus*, a identificirane su dvije vrste plijesni iz roda *Penicillium* i jedna vrsta plijesni iz roda *Aspergillus*.

Ključne riječi: (*identifikacija, izolacija, klasične mikrobiološke metode, plijesni*)

Rad sadrži: 31 stranica, 19 slika, 6 tablica, 36 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. preh. ing.

Datum obrane: 2. rujna, 2019.

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 by classical microbiological methods

Klara Čuljak, 0058210600

Abstract:

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. Depending on the composition of the nutrient medium, molds synthesize various pigments which is an important characteristic for their identification. The aim of this study was to isolate molds from traditional meat products and to identify them based on their phenotypic characteristics i.e. macromorphology (appearance and color of the colony) and micromorphology (spores and hyphae). The isolation of pure mold cultures was carried out on five different nutrient media: Czapek agar, Sabouraud agar, potato dextrose agar (commercial), potato dextrose agar (made in the laboratory) and malt agar for five to seven days at 28 ° C. Mold colonies were examined microscopically and identified by identification keys. From the obtained results, it can be concluded that isolated molds belong to *Penicillium* genera (2 species) and *Aspergillus* genera (1 species).

Keywords: (*identification, isolation, classical microbiological methods, molds*)

Thesis contains: 31 pages, 19 figures, 6 tables, 36 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 2, 2019

Izrada ovog završnog rada omogućena je uz sredstva Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta „*Mikotoksini u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima: molekularna identifikacija plijesni producenta i procjena izloženosti potrošača*“ (IP-01-2018-9017).

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PLIJESNI	2
2.1.1. Plijesni iz roda <i>Aspergillus</i>	2
2.1.2. Plijesni iz roda <i>Penicillium</i>	3
2.1.3. Pozitivni učinci plijesni	4
2.1.4. Negativni učinci plijesni.....	6
2.2. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA PLIJESNI.....	7
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. Uzorci za analizu	11
3.1.2. Podloge za uzgoj plijesni	11
3.1.3. Kemikalije.....	13
3.1.4. Pribor i aparatura	13
3.2. METODE RADA.....	13
3.2.1. Priprema hranjivih podloga.....	13
3.2.2. Izolacija plijesni.....	13
3.2.3. Priprema preparata za mikroskopiranje.....	14
3.2.4. Identifikacija plijesni	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. REZULTATI	16
4.2. RASPRAVA	25
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. POPIS LITERATURE	28

1. UVOD

Plijesni su eukariotski mikroorganizmi koji pripadaju carstvu gljiva, koje broji više od 100 000 vrsta, uključujući jestive gljive, plijesni i kvasce. Mnoge vrste plijesni imaju važnu ulogu u prehrambenim lancima - razgrađuju mrtve organizme te recikliraju važne elemente kako bi ih biljke mogle ponovno koristiti. Neke vrste plijesni žive u simbiozi s biljkama i pomažu im da uzimaju hranjive tvari iz tla, dok su neke vrste plijesni paraziti. Pozitivni učinci plijesni najviše se očituju u farmaceutskoj industriji gdje služe za proizvodnju lijekova (penicilin), organskih kiselina, vitamina, ali i u prehrambenoj industriji gdje se koriste za oplemenjivanje sireva (sirevi brie, kamember, danski plavi sir, gorgonzola, rokfor i mnogi drugi koji imaju specifičan okus jer su im prilikom proizvodnje dodane izabrane vrste plijesni iz roda *Penicillium*) (Giraud i sur., 2010) i suhomesnatih proizvoda (Ludemann i sur., 2010). Samo stotinjak vrsta plijesni štetno je po zdravlje ljudi i životinja, a najvažniji negativni učinak plijesni je njihova mogućnost proizvodnje toksičnih sekundarnih metabolita, odnosno mikotoksina. Mikotoksini su posebno opasni zbog visoke toksičnosti u malim količinama i odsutnosti bilo kakvog senzorskog upozorenja prilikom konzumacije kontaminirane hrane (Markov i sur., 2010; Markov i sur., 2013). Budući da su stabilni spojevi, često se nalaze i u gotovom proizvodu koji je prošao tehnološku obradu poput suhomesnatih proizvoda, a mogu biti prisutne i u voću, povrću, orašastim plodovima te žitaricama. Na važnost pojave plijesni i mikotoksina upozorava nas europski RASFF sustav (eng. *Rapid Alert System for Food and Feed*). Kako bi spriječili negativne učinke plijesni, potrebno je spriječiti rast plijesni u svim fazama proizvodnje. Nadalje, od velike je važnosti uzorkovati prehrambene proizvode te izolirati i identificirati vrste plijesni budući da je samo ograničen broj plijesni toksičan, odnosno može sintetizirati mikotoksine i na taj način ugroziti ljudsko zdravlje. Stoga točnom identifikacijom plijesni dobivamo informaciju radi li se o štetnim ili korisnim vrstama što ima važnu ulogu u očuvanju zdravlja ljudske populacije. Iako se svrstavaju u isto carstvo, plijesni se međusobno razlikuju te ih je moguće identificirati na temelju morfoloških karakteristika. Iako molekularne metode svakodnevno napreduju i postaju dostupnije, mikroskopija i kultiviranje plijesni ostaje ključan alat za identifikaciju plijesni, posebice iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* (Diba i sur., 2007). Cilj ovog rada je klasičnim mikrobiološkim metodama izolirati te na temelju rasta i morfoloških karakteristika na različitim hranjivim podlogama identificirati različite vrste plijesni poraslih na istarskom pršutu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PLIJESNI

Plijesni su velika skupina mikroorganizama unutar carstva gljiva, široko rasprostranjena u prirodi bilo u obliku aktivno živućih vegetativnih tijela ili u obliku latentnih spora (Frisvald i Filtenborg, 1989; Duraković i Duraković, 2000). Tijelo plijesni građeno je od gustog sustava obično bezbojnih i cjevastih stanica bez klorofila. Nitaste su građe, a niti (hife) rastu kao isprepletana masa koja se naziva micelij. Micelij se, kao prašnjava ili paučinasta (pahuljasta) prevlaka, rasprostire po podlozi (Markov, 2005). Micelij može biti zračni (nalazi se iznad podloge) i supstratni (nalazi se u podlozi).

Kontaminacija plijesnima uzrokuje kvarenje hrane i krmiva, a time posljedično može imati negativan učinak na zdravlje ljudi i životinja (Miller, 1995; Sweeney i Dobson, 1998). U velike i ekonomski važne rodove plijesni svrstavaju se rodovi *Aspergillus* i *Penicillium*. Rodovi *Aspergillus* i *Penicillium* sveprisutni su, uzrokuju kvarenje i propadanje hrane te mogu sintetizirati mnogo različitih mikotoksina. Svojim metabolizmom plijesni proizvode različite kemijske spojeve, od jednostavnih organskih kiselina do velikih i složenih molekula (Čvek i sur., 2010).

Primjena određenih sojeva plijesni ima važnu ulogu u biotehnologiji i prehrambenoj industriji prilikom proizvodnje prehrambenih namirnica, pića, antibiotika, lijekova i enzima. Nasuprot tome, pojedine bolesti u ljudi i životinja mogu biti uzrokovane određenim plijesnima: od alergijskih reakcija na spore plijesni do bolesti uzrokovanih mikotoksinima (sekundarnim metabolitima plijesni) koji uzrokuju bolesti pod nazivom mikotoksikoze. Mnoge plijesni koje proizvode mikotoksine česti su kontaminanti hrane i krmiva, uključujući i velik broj plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*.

Prema općenitoj klasifikaciji, plijesni se dijele na plijesni s polja, plijesni u skladištima (od kojih su najvažnije plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*) te plijesni naprednog kvarenja (Duraković i Duraković, 2003).

2.1.1. 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), a svemu tome doprinijela je njegova uloga u sintezi brojnih kemijskih spojeva, proizvodnji

enzima, razgradnji velikog broja prehrambenih proizvoda te sintezi mikotoksina, napose aflatoksina B₁ (AFB₁) i okratoksina A (OTA) (Zadravec i sur., 2019). 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. Nadalje, rod *Aspergillus* je i humani i životinjski patogen, a najvažnije vrste su *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* te *Aspergillus niger*. 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).

Aspergillus vrste manje su brojem i raznolikošću u odnosu na *Penicillium* vrste, ali imaju sposobnost rasta na višim temperaturama i kod niže a_w vrijednosti. *Aspergillus* vrste obično rastu brže nego *Penicillium* vrste, iako im treba duže da sporuliraju i općenito proizvode spore koje su otpornije na svjetlo i kemikalije. Rod *Aspergillus* okarakteriziran je po formiranju konidiofora koje završavaju proširenjem ovalnog ili eliptičnog oblika - vezikulom. Iako su vezikule uglavnom sferičnog oblika, kod određenih vrsta mogu biti izduženije. Na vezikulu se nadovezuju fialide ili sterigme koje nose lance konidija, što karakteristično razlikuje rodove *Aspergillus* i *Penicillium* (Pitt i Hocking, 2009).

Generalno, identifikacija roda *Aspergillus* temelji se na morfološkim karakteristikama kolonija te mikroskopskim ispitivanjima (McClenny, 2005).

2.1.2. 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. Vrste koje mu pripadaju imaju važnu ulogu u razgradnji organskih spojeva. Također, predstavljaju opasnost kada se pojave u/na proizvodima prehrambene industrije zbog destruktivnog djelovanja i mogućnosti proizvodnje mikotoksina. Ostale vrste smatraju se „enzimskim tvornicama" i čestim alergenima u zatvorenim vlažnim prostorima (Visagie i sur., 2014).

Penicillium vrste prepoznatljive su po proizvodnji konidija u strukturi nazvanoj prema latinskoj riječi „penicillus" što znači „mali kist". *Penicillium* vrste sastoje se od grana koje na sebi imaju metule, a metule sadrže fialide (sterigme) noseći male, jednostanične konidije u lancima. Fialide su pričvršćene ili direktno na metule, ili preko jednog ili više članka metule. Razlikovanje pojedinih vrsta plijesni iz roda *Penicillium* je teško, a mnoge vrste pokazuju veliku

varijabilnost unutar pojedinih vrsta (Hawksworth, 1990; Samson i sur., 2004). 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 opisuje većina vrsta roda *Penicillium* (Jurick i sur., 2016; Kim i sur., 2007).

2.1.3. Pozitivni učinci plijesni

Plijesni imaju brojne pozitivne učinke što i dokazuje njihova velika primjena u gotovo svim granama industrije. Prema Arori (2004) plijesni imaju pozitivne učinke u području agronomije, okoliša, farmaceutske te prehrambene industrije. Pojedine plijesni upotrebljavaju se:

- za biotehnološku proizvodnju ergot alkaloida zbog njihovog terapijskog djelovanja,
- kao promotori rasta biljaka,
- pri kontroliranju razmnožavanja nematoda u prirodi,
- za obogaćivanje namirnica posebnim aromama (sirevi te fermentirani mesni proizvodi),
- za biorazgradnju lignoceluloze,
- za razgradnju eksploziva,
- za biorazgradnju azo-boja i
- za proizvodnju lijekova, primjerice penicilina.

U prehrambenoj se industriji mikroorganizmi upotrebljavaju svakodnevno u većini fermentiranih prehrambenih proizvoda. Plijesni imaju pozitivan učinak u doprinosu arome i okusa specifičnih namirnica. Stoga je uloga plijesni u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda (López-Díaz i sur., 2001) od velike važnosti zato što one:

- imaju antioksidativni učinak i omogućavaju održavanje boje zahvaljujući njihovoj katalaznoj aktivnosti i potrošnji kisika,
- razvijaju mikrokolinu na površini i sprečavaju nastajanje ljepljivih slojeva,
- uključene su u stvaranje arome i okusa proizvoda laktat oksidacijom, proteolizama, degradacijom aminokiselina, lipolizama i beta oksidacijom,
- mogu imati zaštitnu ulogu tako da sprečavaju razvoj pojedinih bakterija, kvasaca i plijesni i
- doprinose slabijem isparavanju i gubitku vode.

Najčešće izolirane vrste plijesni s tradicionalnih mesnih proizvoda iz rodova su *Penicillium*, *Aspergillus* i *Erotium* (Zdolec, 2016) (tablica 1).

Tablica 1. Plijesni izolirane iz fermentiranih kobasica i suhomesnatih proizvoda (Zdolec, 2016)

ZEMLJA PORIJEKLA	TRADICIONALNI PROIZVOD	PLIJESNI IZOLIRANI IZ TOG PROIZVODA	UČESTALOST IZOLACIJE (%)	REFERENCE
Španjolska	„chorizo de Cantimpalos"	<i>Penicillium chrysogenum</i>	3,7	López-Díaz i sur., 2001
		<i>Penicillium commune</i>	33,3	
		<i>Penicillium olsonii</i>	24,1	
		Mucorales	29,6	
Argentina	suhe fermentirane kobasice	<i>Penicillium nalgiovense</i>	59,8	Canel i sur., 2013
		<i>Aspergillus ochraceus</i>	16,8	
Grčka	suhe fermentirane kobasice	<i>Penicillium commune</i>	15,7	Papagianni i sur., 2007
		<i>Penicillium nalgiovense</i>	18,8	
		<i>Penicillium solitum</i>	26,1	
Slovenija	suhe kobasice	<i>Penicillium nalgiovense</i>	51,1	Sonjak i sur., 2011
		<i>Penicillium nordicum</i>	43,5	
Španjolska	sušena šunka	<i>Penicillium olsonii</i>	nije određeno	Acosta i sur., 2009
		<i>Penicillium verrucosum</i>		
		<i>Penicillium cameberti</i>		
		<i>Penicillium chrysogenum</i>		
		<i>Penicillium commune</i>		
	iberijski pršut	<i>Penicillium commune</i>	27,4	Nunez i sur., 1996
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	9,2	
		<i>Penicillium expansum</i>	11,9	
		<i>Erotium repens</i>	25,2	
Hrvatska	istarski pršut	<i>Penicillium verrocosum</i>	5,5	Comi i sur., 2004
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	5,5	
		<i>Penicillium commune</i>	5,5	
		<i>Aspergillus repens</i>	7,8	
		<i>Erotium repens</i>	22,8	
Italija	pršut Sveti Danijel	<i>Aspergillus fumigatus</i>	20,0	Comi i Iacumin, 2013
		<i>Aspergillus niger</i>	6,0	
		<i>Erotium amstelodami</i>	10,0	
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	12,0	

Učestalost pojave pojedinih rodova na površini proizvoda ovisi o temperaturi, vlažnosti mesa i relativnoj vlažnosti u klimatiziranim komorama za zrenje. *Penicillium* vrste su dominantne vrste u mikopopulaciji tradicionalnih sušenih mesnih proizvoda i fermentiranih kobasica. Osim temperature i a_w vrijednosti, jedan od najvažnijih čimbenika koji utječu na pojavljivanje vrsta roda *Penicillium* je količina soli odnosno natrijevog korida (López-Díaz i sur., 2001).

2.1.4. Negativni učinci plijesni

Osim što plijesni imaju brojne pozitivne učinke, mogu uzrokovati i negativne učinke koji uvelike mogu utjecati na život i zdravlje čovjeka. Plijesni i njihove spore, koje ljudi mogu udahnuti ako obitavaju u vlažnim prostorijama, mogu uzrokovati brojne alergijske reakcije te time i poteškoće u dišnom sustavu čovjeka. Plijesni uzrokuju dermatomikoze koje se pojavljuju na koži, kosi, bradi, noktima, a javljaju se u obliku crvenila, ljuštenja i pucanja kože. Ukoliko se u/na prehrambenim proizvodima razviju neželjene plijesni koje stvaraju toksične produkte, one mogu uzrokovati štetne učinke kao što su promjena tehnoloških svojstava, promjena nutritivnih vrijednosti proizvoda, a mogu i proizvoditi mikotoksine (Tabuc i sur., 2004).

Mikotoksini su sekundarni proizvodi metabolizma plijesni, koji često dospijevaju u organizam putem kontaminirane hrane, a zatim uzrokuju različite bolesti (HAH, 2013). Među stotinama poznatih mikotoksina, aflatoksin B₁, zearalenon, fumonizini i okratoksin A ističu se kao najčešći onečišćivači hrane i hrane za životinje, primarno žitarica i njihovih proizvoda. Poznato je da se većina mikotoksigenih plijesni ili njihovi sekundarni metaboliti, ako su prisutni u stočnoj hrani koja se koristi u hranidbi domaćih životinja, prenese u namirnice životinjskog podrijetla tzv. „carry-over“ efektom (Markov i sur. 2013; Pleadin i Kovačević, 2016). Stoga mikotoksini u malim količinama predstavljaju veliku opasnost za ljude budući da zbog njihove stabilnosti ne dolazi do inaktivacije tijekom tehnološke obrade (Markov i sur., 2010). Zbog varijabilnosti u kemijskoj strukturi širok je raspon toksičnih učinaka koje izazivaju. Njihova biološka aktivnost obuhvaća akutnu i kroničnu toksičnost, citotoksičnost, hepatoksičnost, neurotoksičnost, teratogenost, mutagenost, karcinogenost i antimikrobne osobine. Kao potencijalni proizvođači mikotoksina u namirnicama značajne su plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichothecium*, *Cladosporium*, *Bissochlamys* i *Sclerotinia*. Te plijesni mogu rasti na supstratima biljnog i životinjskog podrijetla, a za rast i sintezu toksina odgovaraju im ekološki uvjeti stalne visoke relativne vlažnosti i umjerenih do visokih temperatura (Markov, 2005).

Kako bismo spriječili rast nepoželjnih plijesni, koje stvaraju toksične produkte i time utječu na ljudsko zdravlje, uz dobru proizvođačku praksu (*eng.* GMP – Good Manufacturing Practice) ponekad je namirnicama potrebno dodavati starter kulture određenih mikroorganizama. Starter kulture su pripravci koji sadrže žive mikroorganizme, a sadrže barem jedno funkcionalno svojstvo s krajnjim ciljem poboljšanja kvalitete konačnog proizvoda koji će imati pozitivan učinak na zdravlje potrošača (Šušković, 2018). Primjer upotrebe starter kulture

plijesni kako bi se spriječio rast toksičnih plijesni je upotreba komercijalne starter kulture plijesni *Penicillium nalgiovense* u proizvodnji suhih fermentiranih kobasica „salchichón" koja je suprimirala rast toksičnih plijesni, a time i proizvodnju mikotoksina (Bernáldez i sur., 2013; Zdolec, 2016). Najčešće starter kulture plijesni korištene u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda su *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium crysogenum* te *Penicillium camemberti*.

2.2. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA PLIJESNI

Za identifikaciju plijesni potrebno je pravilno izolirati čiste kulture s određene namirnice, a nakon toga odrediti vrstu prema odgovarajućim identifikacijskim ključevima. Za to se mogu koristiti klasične mikrobiološke metode koje uključuju izolaciju plijesni s uzorka te njihovo naciepljivanje na hranjive podloge. S obzirom na prisutnost i poraslost plijesni na površini namirnica, uzorkovanje se obavlja na odgovarajući način:

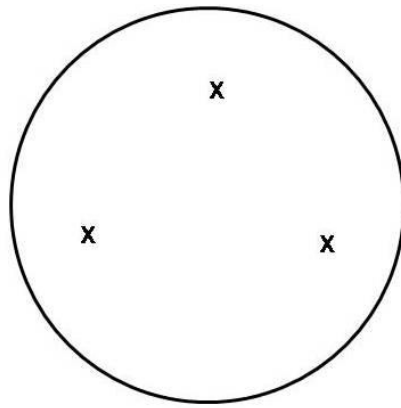
1. Jasno vidljive kolonije plijesni mogu se pažljivo odvojiti od površine koristeći oštar skalpel te položiti na površinu hranjive podloge.

2. U slučaju difuznog rasta plijesni, na površinu namirnice nalijepi se ljepljiva traka te se zatim nalijepi na površinu hranjivog agara i nakon 2 dana ukloni kako bi plijesni lakše rasle.

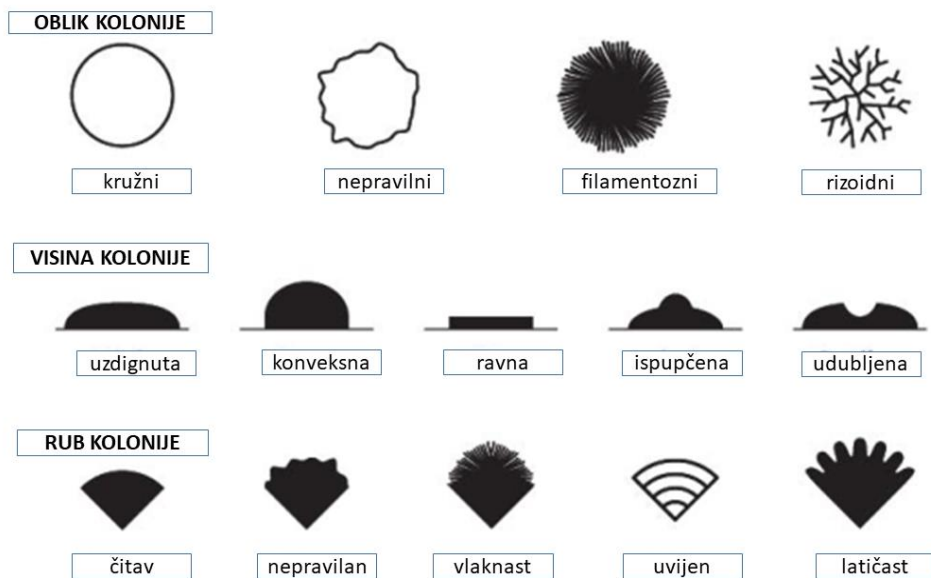
3. Ukoliko plijesni nisu jasno vidljive na površini namirnice, vatom uronjenom u fiziološku otopinu prebriše se površina namirnice te se naciepi na površinu hranjive podloge.

Uzorkovanje se obavlja u aseptičnim uvjetima, uz dezinfekciju aparature alkoholom.

Nakon uzorkovanja jednom od navedenih metoda i inkubacije plijesni tijekom pet do sedam dana pri 25-28 °C slijedi postupak izolacije plijesni. Jasno vidljive, porasle kolonije plijesni naciepljuju se na izabranu hranjivu podlogu u tri točke (slika 1). Nakon naciepljivanja slijedi inkubacija, koja prema Pittu i Hockingu (2009) obično traje pet do sedam dana na optimalnoj temperaturi od 25 °C. Ukoliko su nakon postupka izolacije vidljive različite kolonije plijesni koje mogu biti kružnog, nepravilnog, filamentoznog i rizoidnog oblika (slika 2), postupak izolacije ponavlja se dok se ne dobiju potpuno čiste kulture plijesni. Nakon izolacije porasle kolonije plijesni, točkasto naciepljene, trebaju biti ujednačenih dimenzija, boja i oblika što je pokazatelj uspješno izolirane čiste kulture. Kolonija plijesni također može biti ravna, uzdignuta, konveksna s laticastim, uvijenim ili vlaknastim rubovima (slika 2).



Slika 1. Inokulacija plijesni u tri točke (vlastita fotografija)



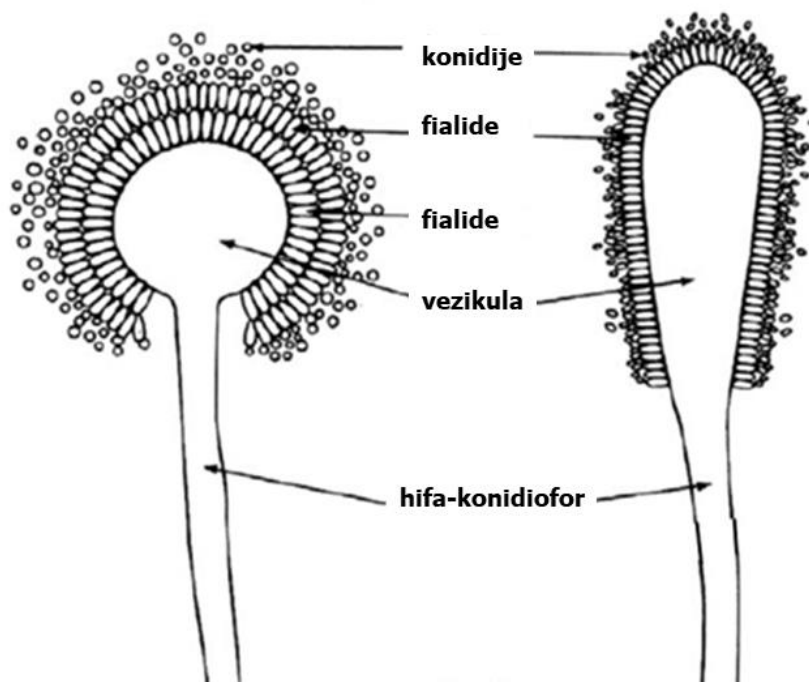
Slika 2. Različiti oblici, visine i rubovi kolonija plijesni (Anonymus 1)

Zbog raznolike makromorfološke građe plijesni, u svrhu identifikacije potrebno je provesti postupak mikroskopsiranja. Mikroskopsiranje se obavlja pomoću svjetlosnog mikroskopa odnosno optičke naprave za promatranje sitnih predmeta, nevidljivih golom oku, pod puno većim vidnim kutom, nego što je to vidni kut oka (Markov, 2017).

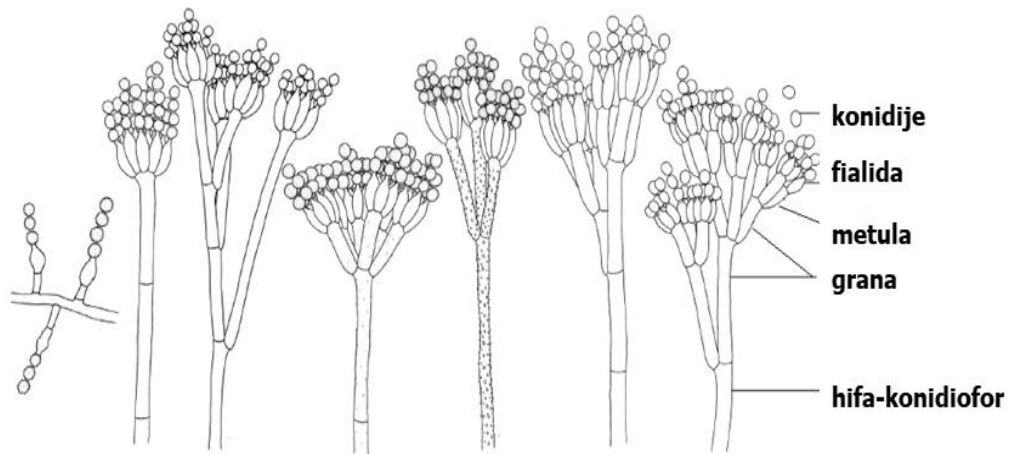
Morfologija ima važnu ulogu u taksonomiji plijesni te predstavlja fizičke oblike kroz koje organizam funkcionira i prilagođava se okolini, no neki morfološki aspekti mogu varirati ili predstavljati odgovor na specifične podražaje okoliša. Stoga, sojevi okarakterizirani u jednom laboratoriju mogu izgledati drukčije kada se uzgoje u drugom laboratoriju zbog npr. razlike u

temperaturi, osvjetljenju, vlažnosti ili u hranjivim tvarima što otežava usporedbu između dva različita istraživanja (Visagie i sur., 2014). Djelovanje navedenih čimbenika moguće je smanjiti strogo standardiziranim tehnikama pripreme medija, inokulacije i inkubacije (Okuda i sur., 2000).

Karakteristike kolonija koje se koriste za identifikaciju vrsta uključuju stupanj rasta, teksturu, dimenzije, proizvodnju sklerocija, boju micelija, sporulaciju, topljive pigmente, eksudat te izgled kolonija s donje strane (revers). Budući da se neke plijesni mogu razmnožavati spolno i nesporno, pri točnoj identifikaciji plijesni potrebno je te značajke uzeti u obzir. Prilikom promatranja mikroskopskih preparata važno je uočiti oblik, boju i dimenzije stijenki, vezikula i metula (u slučaju da su prisutne), fialida te konidija. Slike 3 i 4 prikazuju karakteristične izgled konidiofora mikroskopskih preparata plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*.



Slika 3. Morfološke strukture u roda *Aspergillus* (Klich, 2009)



Slika 4. Morfološke strukture i različiti uzorci razgranatosti konidiofora u roda *Penicillium* (Visagie i sur., 2014)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci za analizu

Za izolaciju i identifikaciju plijesni, korišteni su uzorci pršuta dobavljeni od različitih proizvođača tradicionalnih mesnih proizvoda s područja Istarske županije. Za potrebe analize, uzorci su transportirani u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica neposredno nakon proizvodnje i čuvani na temperaturi od 4 °C do provođenja analize.

3.1.2. Podloge za uzgoj plijesni

Za uzgoj i izolaciju čiste kulture plijesni u laboratorijskim uvjetima korištene su hranjive podloge čiji je sastav prikazan tablicama 2-6.

a) Czapekov agar

Tablica 2. Sastav podloge (Czapekov agar)

SASTAV	KONCENTRACIJA
Saharoza	30 g/L
Natrijev nitrat	2 g/L
Kalijev hidrogenfosfat	1 g/L
Magnezijev sulfat	0.5 g/L
Kalijev klorid	0.5 g/L
Željezov(II) sulfat	0.01 g/L
Agar	15 g/L

Suspendira se 49 g Czapekovog agara u 1000 mL hladne destilirane vode, zagrijava se do vrenja uz često miješanje i sterilizira autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 minuta.

b) Sabouraudov agar

Tablica 3. Sastav podloge (Sabouraudov agar)

SASTAV	KONCENTRACIJA
Neopepton	10 g/L
Dekstroza	20 g/L
Agar	20 g/L

Suspendira se 65 g Sabouraudovog agara u 1000 mL hladne destilirane vode, zagrijava do vrenja kroz 1 minutu uz često miješanje. Sterilizira se autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 minuta.

c) Krumpirov dekstrozni agar (komercijalni)

Tablica 4. Sastav podloge (krumpirov dekstrozni agar (komercijalni))

SASTAV	KONCENTRACIJA
Krumpirov ekstrakt	5 g/L
Glukoza	20 g/L
Agar	17 g/L

Suspendira se 42 g krumpirovog dekstroznog agara u 1000 mL hladne destilirane vode, zagrijava se do vrenja uz često miješanje i sterilizira autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 minuta. Smjesa se zatim ohladi na 45-50 °C.

d) Krumpirov dekstrozni agar (napravljen u laboratoriju)

Tablica 5. Sastav podloge (krumpirov dekstrozni agar (ručno napravljen) za volumen od 1 L

SASTAV	MASA
Krumpir	200 g
Dekstorza	20 g
Agar	20 g

Kuha se 200 g oguljenih i sitnije narezanih krumpira u 1000 mL destilirane vode kroz 30 minuta. Potom se smjesa dekantira i malo ohladi te profiltrira kroz gazu. Destiliranom vodom vrati se volumen na početnih 1000 mL i doda se 20 g dekstroze i 20 g agara. Sterilizacija se vrši kroz 15 minuta.

e) Sladni agar

Tablica 6. Sastav podloge (sladni agar)

SASTAV	KONCENTRACIJA
Sladni ekstrakt	30 g/L
Agar	17 g/L

Suspendira se 47 g sladnog agara u 1000 mL hladne destilirane vode, zagrijava se do vrenja uz često miješanje te potom sterilizira autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 minuta. Smjesa se zatim ohladi na 45-50 °C.

3.1.3. Kemikalije

- Laktofenolno koton plavo otopina

3.1.4. Pribor i aparatura

- Petrijeve zdjelice Φ 10 cm
- Mikrobiološka ušica/lanceta
- Mikrobiološke igle
- Bunsenov plamenik
- 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

Hranjive podloge su nakon pripreme, sterilizacije i hlađenja razlivena u Petrijeve zdjelice te čuvane pri 4 °C do upotrebe.

3.2.2. Izolacija plijesni

U mikologiji se primjenjuje više različitih postupaka i metoda kojima je cilj izolacija plijesni, a koja od metoda će se primijeniti ovisi ponajprije o vrsti uzorka.

Za izolaciju plijesni iz hrane od osnovnih postupaka može se primijeniti izravno naciepljivanje uzorka na hranjivu podlogu ili neizravna metoda naciepljivanja serije razrjeđenja. U ovom radu korištena je metoda izravnog naciepljivanja upotrebom vatenog štapića.

Vatom uronjenom u fiziološku otopinu prebrisana je površina svakog od deset uzoraka istarskog pršuta te su uzorci naciepljeni na površinu pripremljene hranjive podloge sladnog agara u Petrijevim zdjelicama i inkubirani pri temperaturi od 28 °C.

Rast plijesni praćen je tijekom sedam dana uzgoja. Nakon porasta različitih kolonija plijesni na sladnom agaru, svaka kolonija ponovno je precijepljena na sladni agar upotrebom mikrobiološke ušice ili lancete. Mikrobiološke ušice ili lancete neposredno se prije korištenja spale, ohlade u dubini agara te lagano prislone na kolonije plijesni tako da se uzmu spore i/ili micelij plijesni koji se naciepi na agar s ciljem izolacije čiste, pojedinačne kulture. Petrijeve zdjelice s naciepljenim plijesnima inkubirane su pri 28 °C kroz sedam dana. Nakon uzgoja, izolirane čiste kulture plijesni precijepljene su na pet različitih podloga (Czapekov agar, Sabouraudov agar, krumpirov dekstrozni agar (komercijalni), krumpirov dekstrozni agar (napravljen u laboratoriju) i sladni agar) s ciljem identifikacije plijesni na osnovu rasta i izgleda plijesni pri istim uvjetima inkubacije (28 °C kroz razdoblje od pet do sedam dana) na različitim hranjivim podlogama.

3.2.3. Priprema preparata za mikroskopiranje

Plijesni uzgojene na hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama su mikroskopski pretražene. Sterilnim mikrobiološkim iglama micelij plijesni je prenijet na predmetno stakalce na koje je prethodno stavljena kap destilirane vode. Svako je pokrovno stakalce stavljeno na način da pod kutem od 45° jednim bridom bude prslonjeno na predmetnicu, a potom pomaknuto po predmetnici do ruba kapljice. Svako je pokrovno stakalce pažljivo spuštено na kap suspenzije kako ne bi ostali mjehurići zraka. Za svaki je uzorak napravljen i preparat s laktofenolno koton plavo otopinom. Preparati su napravljeni na isti način kao i s destiliranom vodom.

S 10 uzoraka istarskog pršuta, uspješno su izolirane tri čiste kulture plijesni koje su zatim uzgojene na pet različitih podloga te je napravljeno 15 mikroskopskih preparata s destiliranom vodom i 15 mikroskopskih preparata s laktofenol koton plavo otopinom (ukoliko preparat nije bio vidljiv, ponovno je pripremljen). Tako pripremljeni nativni preparati mikroskopirani su pomoću svjetlosnog mikroskopa pod ukupnim povećanjem od 100x i/ili 400x.

3.2.4. Identifikacija plijesni

Na osnovi mikroskopskih slika dobivenih pod ukupnim povećanjima 100x i/ili 400x, za svaki su uzorak plijesni uočene određene, specifične strukture plijesni koje su potom identificirane prema identifikacijskim ključevima (Pitt i Hocking, 2009).

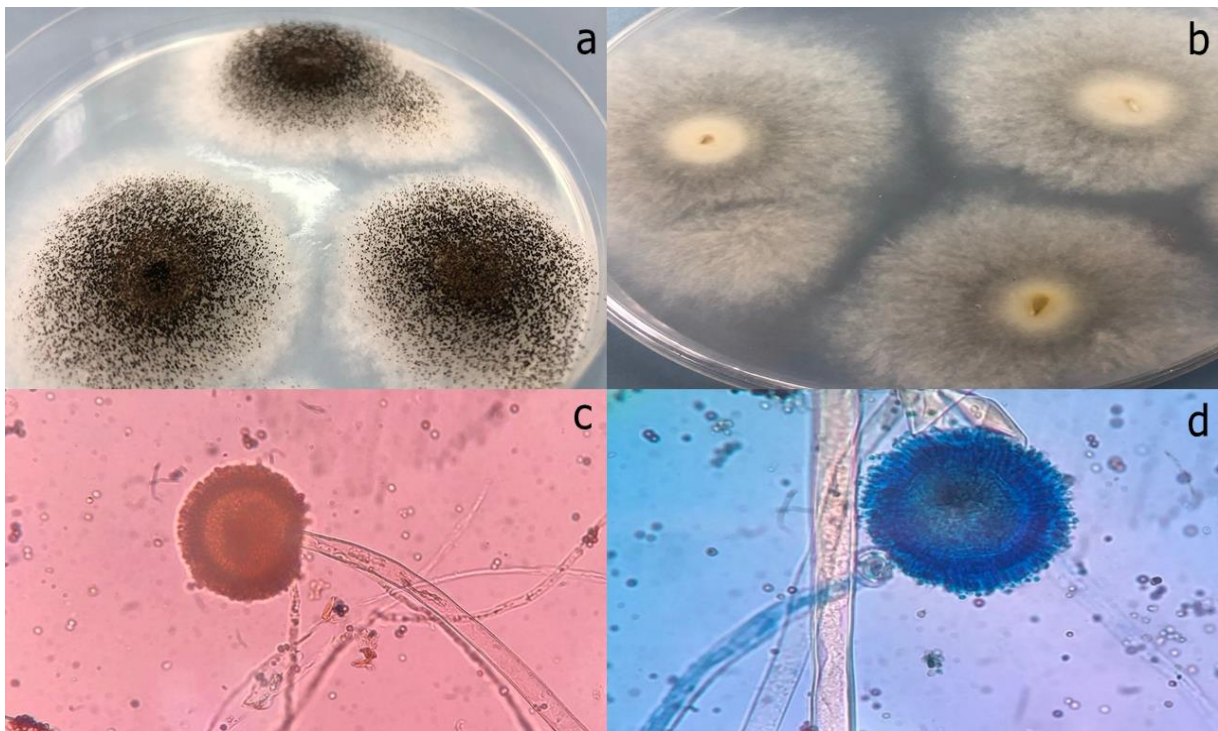
Svi su uzorci plijesni pregledani na sljedeći način: prednje (gornje) strane poraslih kulture plijesni (avers) i stražnje (donje) strane poraslih kultura plijesni (revers) fotografirane su klasičnom kamerom bez povećanja, dok su mikroskopske slike nativnih preparata plijesni u destiliranoj vodi i nativnih preparata plijesni obojanih s laktofenolno koton plavo otopinom fotografirane kamerom pri odgovarajućem povećanju (100x ili 400x) za svaki preparat.

4. REZULTATI I RASPRAVA

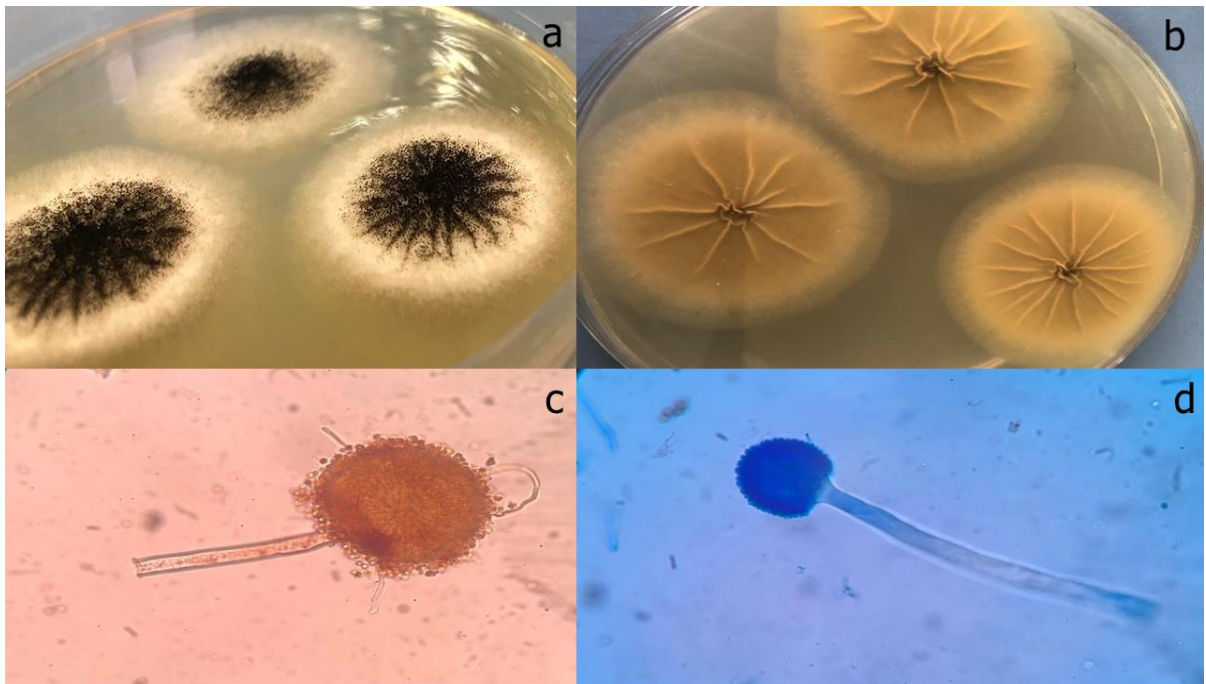
4.1. REZULTATI

Klasičnim mikrobiološkim metodama, na Czapekovom agaru, Sabouraudovom agaru, krumpirovom dekstroznom agaru (komercijalni), krumpirovom dekstroznom agaru (napravljen u laboratoriju) i sladnom agaru, izolirane su i identificirane dvije vrste plijesni iz roda *Penicillium* i jedna vrsta iz roda *Aspergillus*. Rezultati istraživanja prikazani su na slikama 5-19.

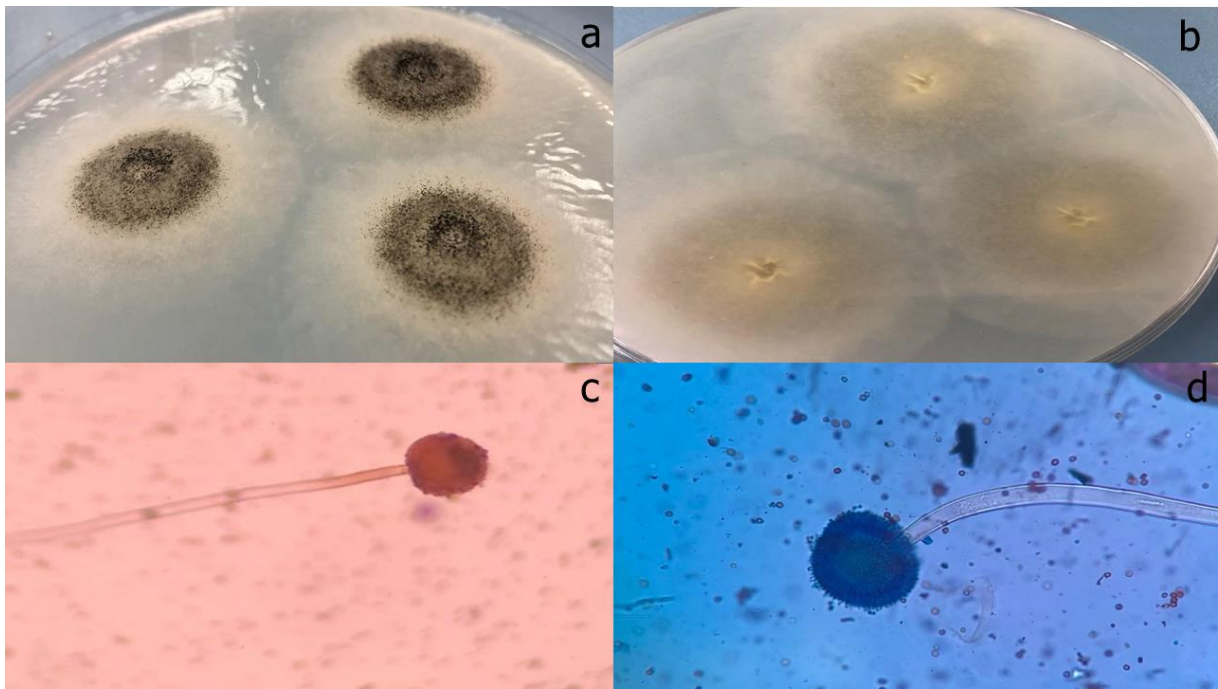
Na slikama 5-9 prikazan je porast kolonija i mikroskopska slika plijesni iz roda *Aspergillus*.



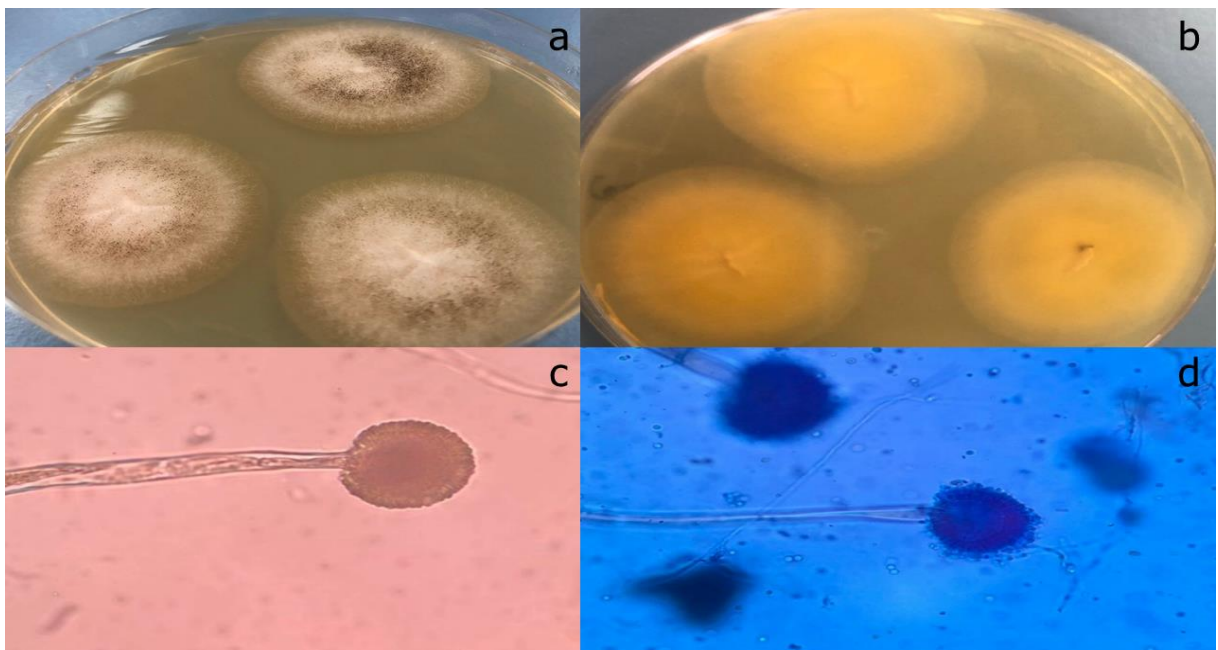
Slika 5. Plijesan iz roda *Aspergillus* na Czapekovom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 400x), d- mikroskopska slika plijesni bojana s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 400x) (vlastite fotografije)



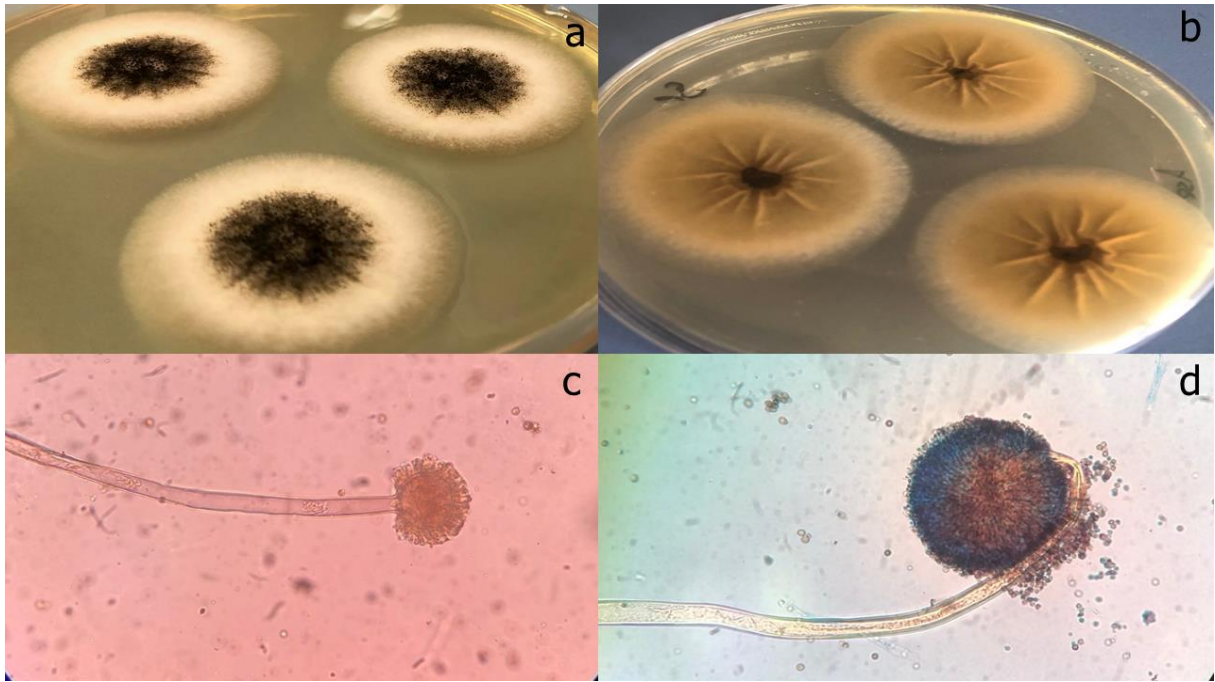
Slika 6. Plijesan iz roda *Aspergillus* na Sabouraudovom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 400×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 400×) (vlastite fotografije)



Slika 7. Plijesan iz roda *Aspergillus* na krumpirovom dekstroznom agaru pripremljenom u laboratoriju; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 400×), d- mikroskopska slika plijesni bojana s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 400×) (vlastite fotografije)

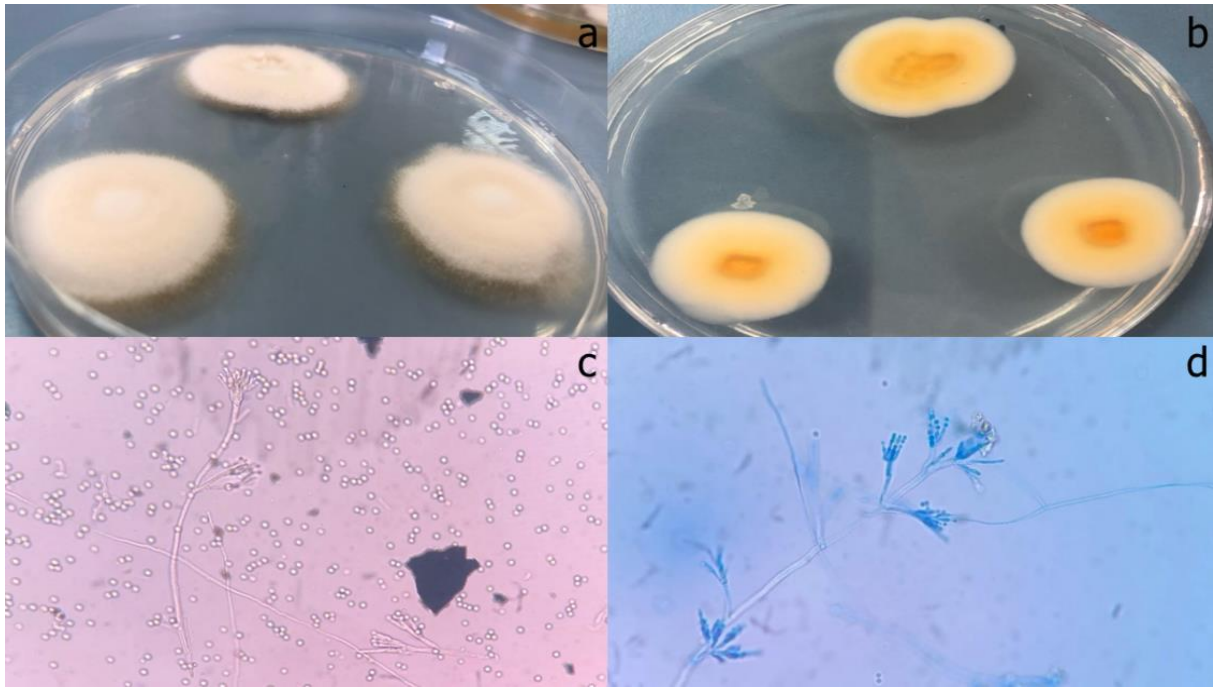


Slika 8. Plijesan iz roda *Aspergillus* na komercijalnom krumpirovom dekstroznom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 400×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 400×) (vlastite fotografije)

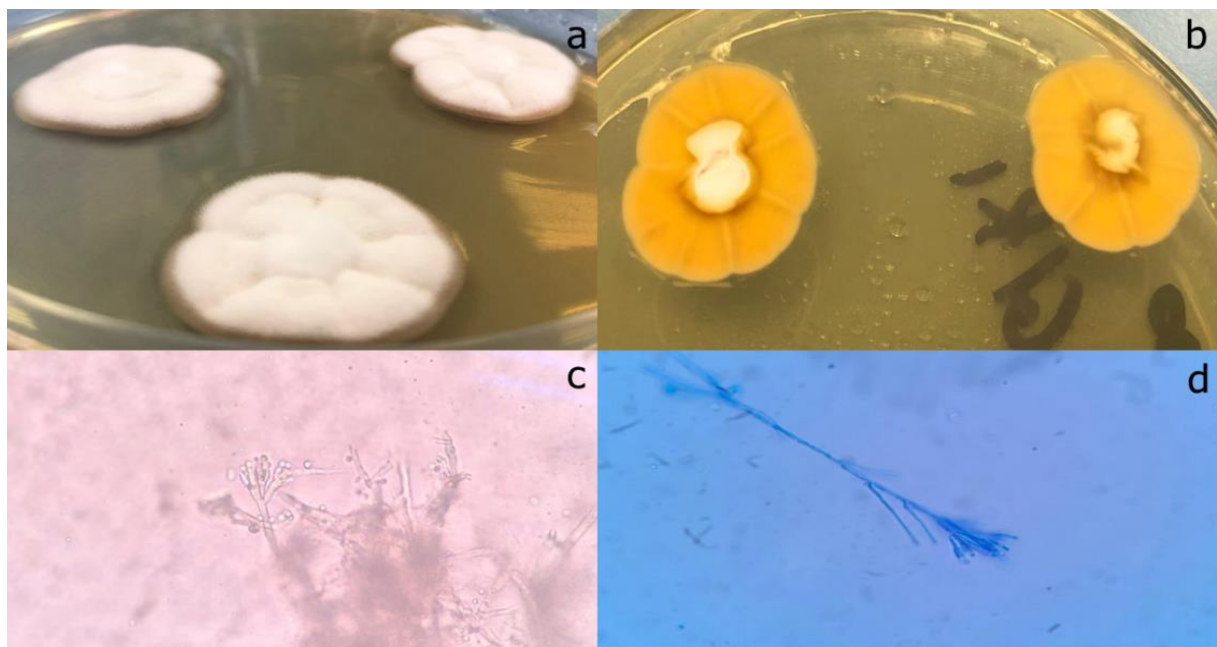


Slika 9. Plijesan iz roda *Aspergillus* na sladnom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 400×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 400×) (vlastite fotografije)

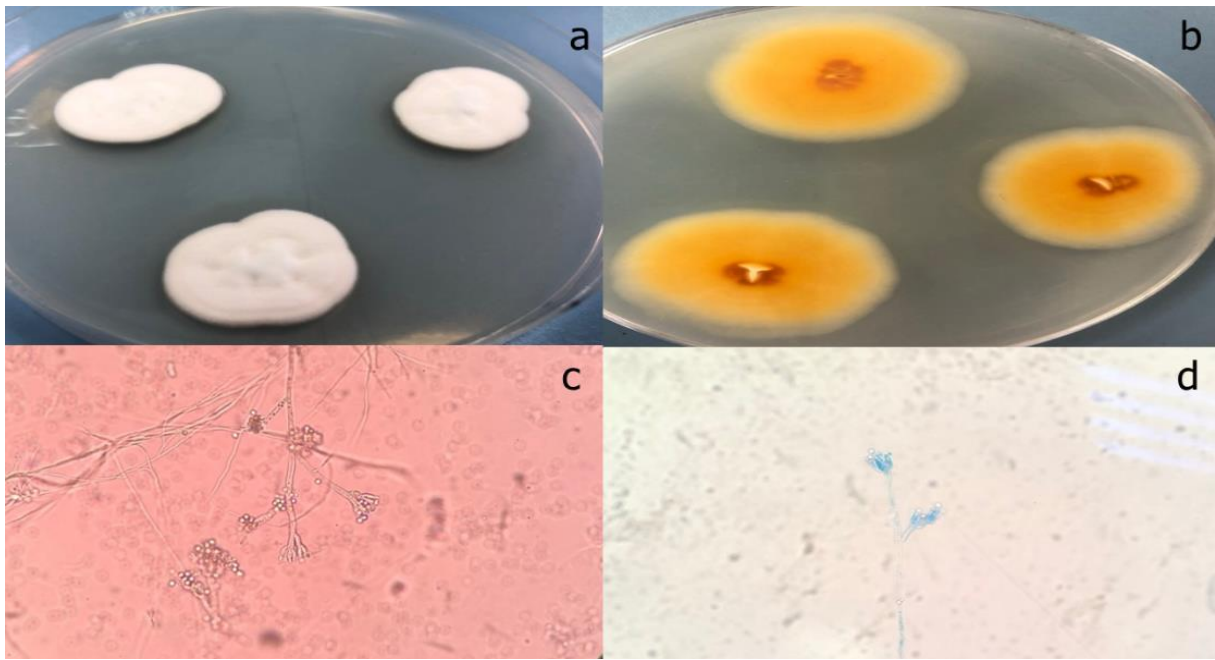
Izgled i boja kolonija kao i mikroskopske slike vrsta iz roda *Penicillium* prikazani su na slikama 10-19. Makromorfološke karakteristike i mikromorfološke strukture bijelog penicilliuma prikazane su na slikama 10-14, a sivo-zelenog na slikama 15-19.



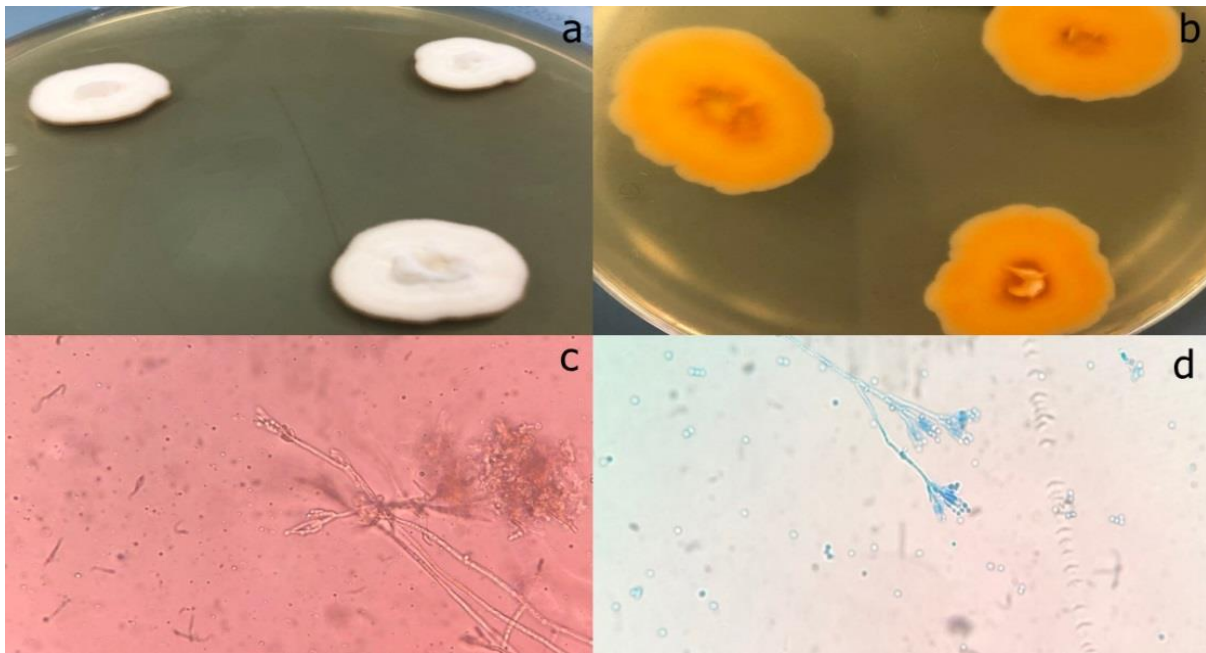
Slika 10. Bijeli *Penicillium* na Czapekovom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 100×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 100×) (vlastite fotografije)



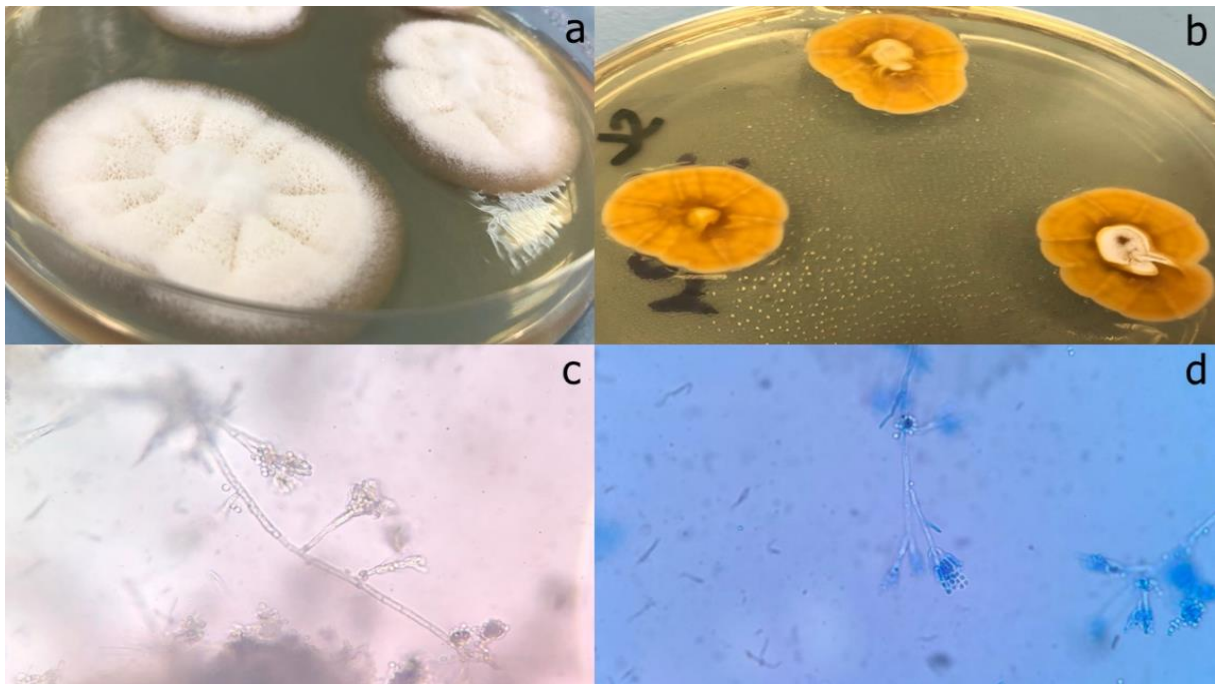
Slika 11. Bijeli *Penicillium* na Sabouraudovom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 100×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 100×) (vlastite fotografije)



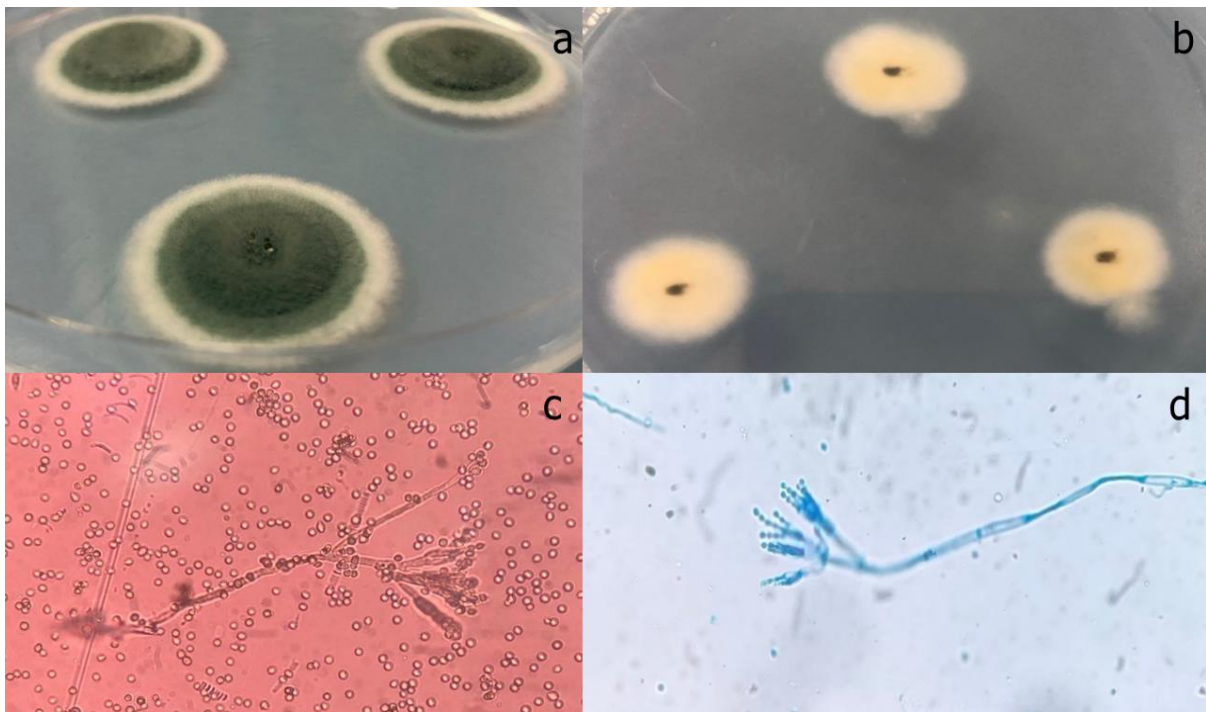
Slika 12. Bijeli *Penicillium* na krumpirovom dekstroznom agaru pripremljenom u laboratoriju; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 100×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 100×) (vlastite fotografije)



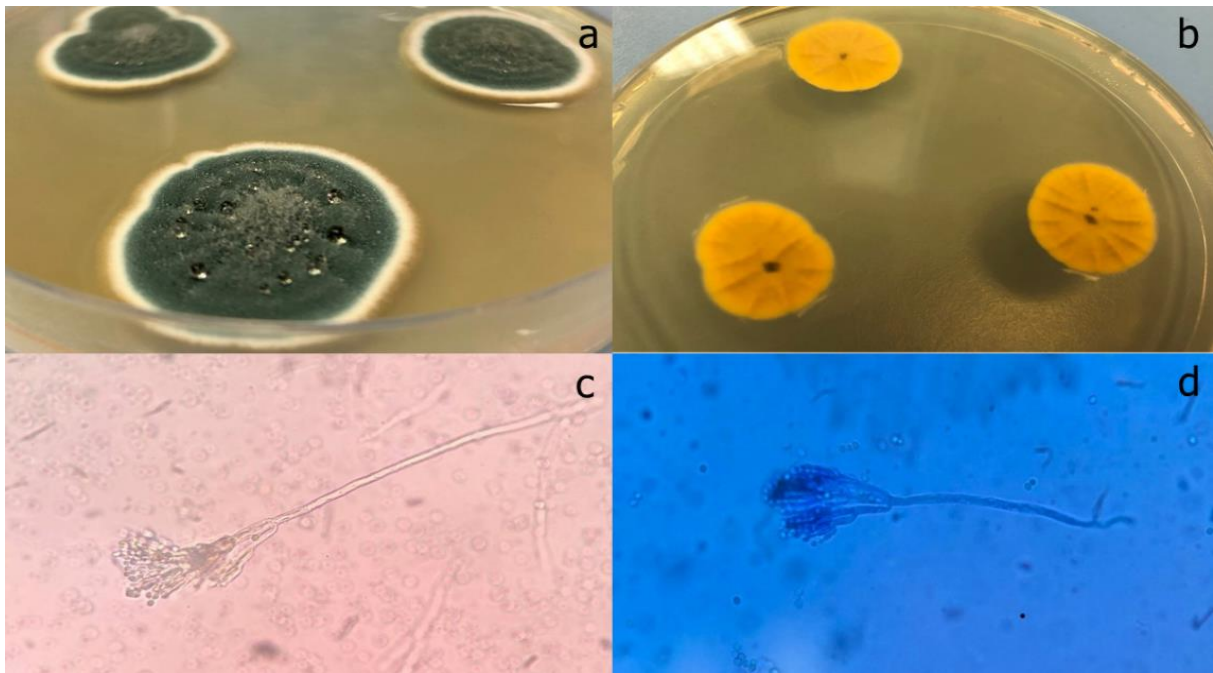
Slika 13. Bijeli *Penicillium* na komercijalnom krumpirovom dekstroznom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 100×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 100×) (vlastite fotografije)



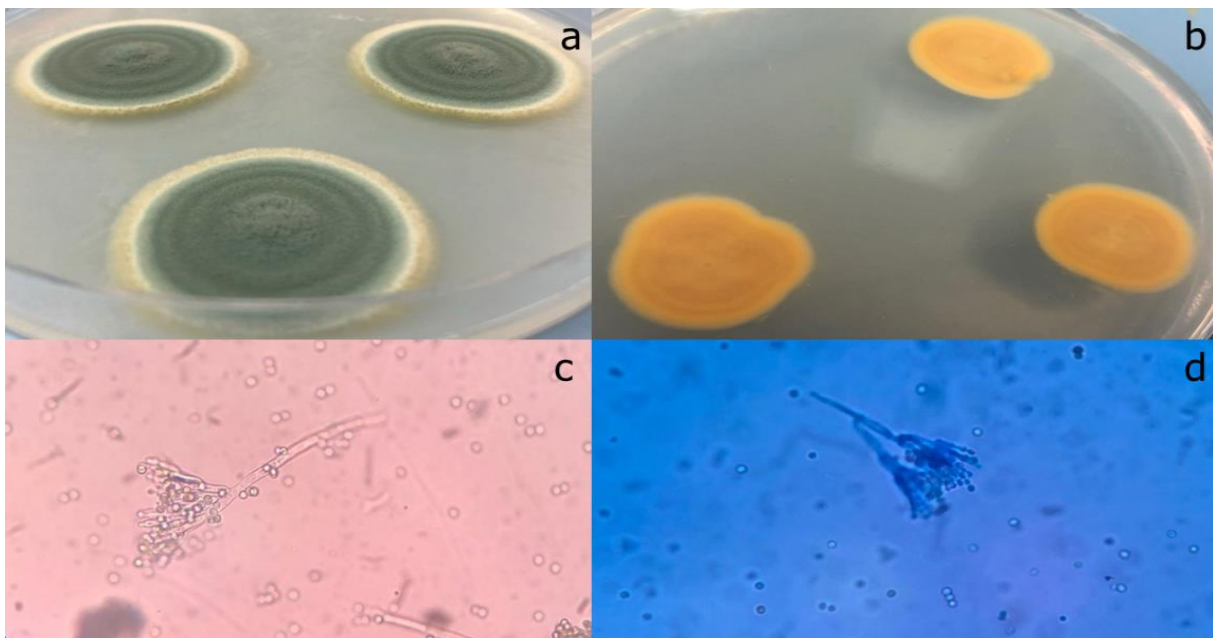
Slika 14. Bijeli *Penicillium* na sladnom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 100×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 100×) (vlastite fotografije)



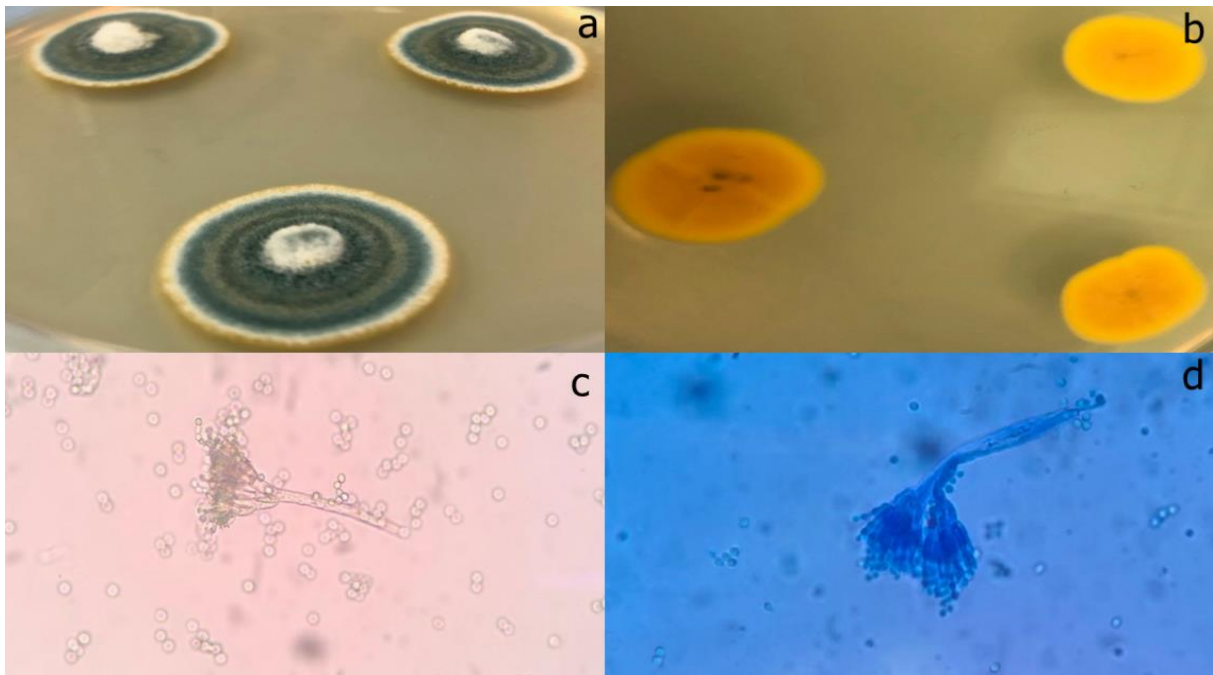
Slika 15. Sivo-zeleni *Penicillium* na Czapekovom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 400×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 400×) (vlastite fotografije)



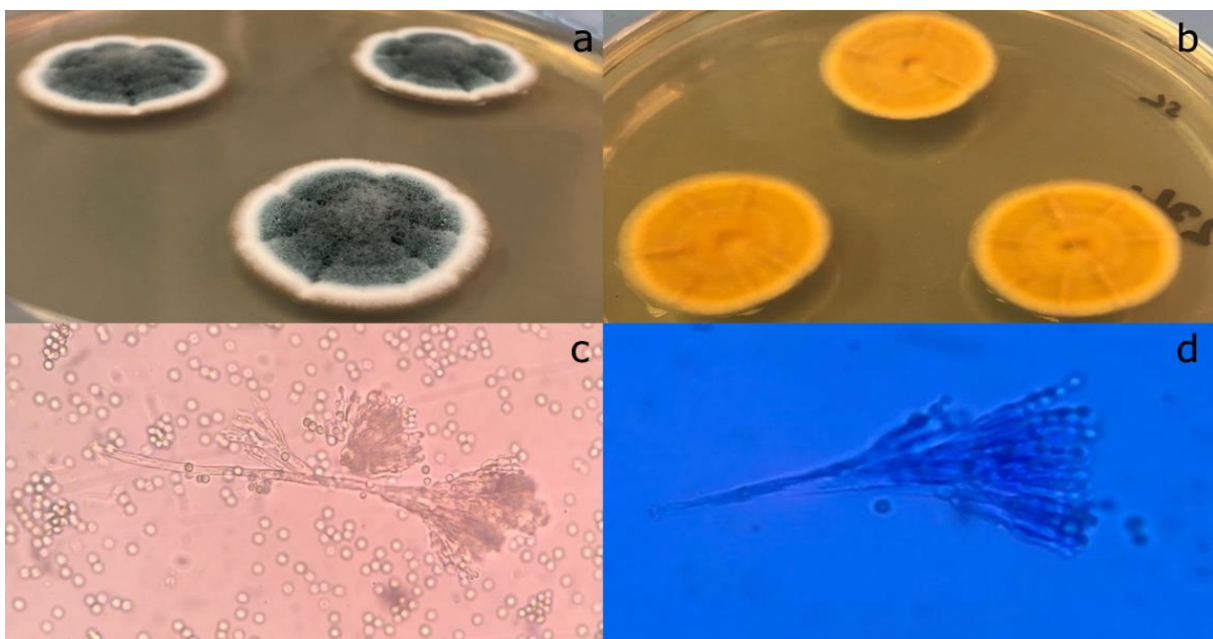
Slika 16. Sivo-zeleni *Penicillium* na Sabouraudovom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 400×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 400×) (vlastite fotografije)



Slika 17. Sivo-zeleni *Penicillium* na krumpirovom dekstroznom agaru pripremljenom u laboratoriju; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 400×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 400×) (vlastite fotografije)



Slika 18. Sivo-zeleni *Penicillium* na komercijalnom krumpirovom dekstroznom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 400×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 400×) (vlastite fotografije)



Slika 19. Sivo-zeleni *Penicillium* na sladnom agaru; a- gornja strana kolonija, b- donja strana kolonija, c- mikroskopska slika plijesni (povećanje 400×), d- mikroskopska slika plijesni bojanom s laktofenolno koton plavo otopinom (povećanje 400×) (vlastite fotografije)

4.2. RASPRAVA

Izolirane plijesni pokazale su različite morfološke i uzgojne osobine na različitim podlogama pri istim uvjetima kultivacije. Iako su *Penicillium* i *Aspergillus* vrste sveprisutne i dobro rastu na svim sintetičkim ili polusintetičkim podlogama, ipak se za izolaciju i uzgoj istih najčešće upotrebljavaju Czapekov i sladni agar, ali i Sabouraudov agar, komercijalni krumpirov dekstrozni agar, i krumpirov dekstrozni agar pripremljen u laboratoriju. Na odabranim hranjivim podlogama identificirana su dva roda i tri vrste plijesni.

Plijesni iz roda *Aspergillus*, prikazane na slikama 5-9, pokazuju sličan izgled kolonija s gornje strane na svih 5 različitih podloga. Kolonije su pretežito pravilnog, ovalnog oblika, „paučinaste“ strukture, a čine ih bijeli micelij prekriven gustim slojem tamnosmeđih do crnih konidija. Za razliku od izgleda kolonija s gornje strane, kada se kolonije pogledaju obrnuto (odozdo) vidljive su znatne razlike u izgledu i boji na različitim podlogama. Kolonije su nitaste ili nalik na pamuk (slika 5 i 7) baršunaste (slika 8), s radijalnim brazdama (slika 6 i 9) od blijede do krem-žute boje.

Na mikroskopskim slikama vidljiv je konidiofor koji završava proširenjem tvoreći okruglo oblikovanu vezikulu na kojoj se nalazi dvostruki sloj fialida (sterigma) koje nose lance konidija (slike 5-9).

Izgled i veličina konidijalnih glava (vezikula s fialidama) kao i boja spora važne su identifikacijske karakteristike *Aspergillus* vrsta. *Aspergillus* vrste su „označene“ bojama, a boja konidija može biti vrlo korisna polazna točka u identifikaciji.

Czapekov agar koristi se za identifikaciju i karakterizaciju vrsta plijesni iz roda *Aspergillus* jer je pogodna hranjiva podloga za rast kserofilnih *Aspergillus* vrsta (Raper i Fennell, 1965; Samson i sur., 2014). Plijesni su svrstane u rod *Aspergillus* zbog uočljive vezikule, fialida i konidija vidljivih na mikroskopskim slikama, što čini tipičnu strukturu plijesni iz roda *Aspergillus* prema Pittu i Hockingu (2009).

Iz dobivenih rezultata prikazanih na slikama 10-19 vidljivo je da su izolirane i identificirane dvije vrste plijesni iz roda *Penicillium* i to bijeli i zeleno-sivi *Penicillium*. *Penicillium* vrsta, prikazana slikama 10-14, pokazuje bijelu boju kolonija na svih pet odabranih podloga. Kolonije su ispučene (slika 13), nepravilnog ruba i oblika s radijalnim brazdama (slika 11 i 12) te „paučinaste“ strukture (slika 10 i 14). Gledane odozdo kolonije su žućkasto-bijele do narančaste i žuto-smeđe boje. Na mikroskopskim slikama vidljivi su razgranati penicilusi (*penicillus*- podrazumijeva cijeli sustav grananja koji se mjeri od najniže grane na glavnom konidioforu do vrhova sterigmi ili konidija) koji se sastoje od grana i metule ispod sterigma (fialida) (slike 10-14). Iz fenotipskih karakteristika tj. makromorfologije (kolonije na hranjivoj

podlozi) i mikromorfologije (izgled spora i hifa) bijelog penicilla (Refai i sur., 2015) moglo bi se zaključiti da je izolirana plijesan *Penicillium nalgiovense* koja se koristi kao starter kultura u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda.

Karakteristike druge izolirane vrste plijesni iz roda *Penicillium*, prikazane su na slikama 15-19. Na odabranim hranjivim podlogama vidljiv je različit rast kolonija. Kolonije su pretežito tamnozeleno do zeleno-sive boje s bijelim obrubom. Kolonije na komercijalnom dekstroznom krumpirovom agaru pokazuju koncentrično izmjenjivanje boja od bijele na periferiji i u sredini kolonije, do različitih nijansi zelenih. Na komercijalnom i krumpirovom agaru pripremljenom u laboratoriju kolonije su „praškaste“, a na ostalim podlogama „paučinaste“ strukture. Pojedine vrste plijesni kao nusprodukt rasta mogu proizvesti eksudate vidljive kao male kapljice tekućine na površini kolonije. Kolonije porasle na Sabouraudovom agaru proizvele su eksudate (slika 15.). Na mikroskopskim slikama su vidljivi penicillusi koji sadrže dvije grane koje izlaze iz glavnog konidiofora, a na kojima nastaju stanice tzv. metule koje nose sterigme s lancima konidija.

Plijesni prikazane na slikama 10-19 svrstane su u rod *Penicillium* jer se njihova struktura, prema dobivenim mikroskopskim slikama, sastoji od grana koje sadrže metule i sterigme s konidiosporama. Takva struktura tipična je za plijesni roda *Penicillium* opisana prema Visagie i sur. (2014).

Identifikacija vrsta iz roda *Penicillium* još uvijek je problem pa se uz fenotipske karakteristike tj. makromorfologije (kolonije na hranjivoj podlozi), mikromorfologije (spolne i nespolne plodne strukture), produkciji eksterolita (određenih sekundarnih metabolita) za razlikovanje blisko srodnih vrsta koristi sekvenciranje specifične genske regije (ITS i / ili β -tubulin) (Visagie i sur, 2014).

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti:

- Na uzorcima istarskog pršuta prevladavaju plijesni iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus*.
- Klasičnim mikrobiološkim metodama na temelju rasta, boje kolonija i proizvodnje eksudata na različitim hranjivim podlogama te mikroskopskog pretraživanja mogu se identificirati plijesni do razine roda.
- Izolirane plijesni pokazale su različite makromorfološke i mikromorfološke karakteristike na različitim podlogama pri istim uvjetima uzgoja.
- Identificirane su dvije vrste plijesni iz roda *Penicillium* i jedna vrsta plijesni iz roda *Aspergillus*.

6. POPIS LITERATURE

- Anonymus1 (2019) Morphology and General Properties of Fungi <<https://nios.ac.in/media/documents/dmlt/Microbiology/Lesson-51.pdf>> Pristupljeno 22. lipnja 2019.
- Arora D. K. (2004) Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications, Marcel Dekker, Inc. New York.
- Bernaldez V., Córdoba J.J., Rodríguez M., Cordero M., Polo L., Rodríguez A. (2013) Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage „salchichón". *Food control* **32**: 69-76.
- 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.
- Diba K., Kordbacheh P., Mirhendi S. H., Rezaie S., Mahmoudi M. (2007) Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. *Pak. J. Med. Sci* **23**: 867-872.
- 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.
- Frisvald J.C., Filtenborg O. (1989) Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* **81**: 837-861.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* **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-su-mikotoksini/>> Pristupljeno 12. srpnja 2018.

- Hawksworth D. L. (1990) Problems and prospects for improving the stability of names in *Aspergillus* and *Penicillium*. U: Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification; Samson R.A., Pitt J.I., Ed.; Plenum press: New York, NY, USA; London, UK. str. 75-82.
- Jurick W.M., Yu, J., Bennett, J.W. (2016) Blue Mould to Genomics and Beyond: Insights into the Biology and Virulence of Phytopathogenic *Penicillium* Species. U: *Aspergillus* and *Penicillium* in the Post-Genomic Era; de Vries, R.P., Gelber, I.B., Anderson, M.R., Eds.; Caister Academic Press: Norfolk, UK. str. 210.
- Kim W.K., Sang H.K., Woo S.K., Park M.S., Paul N.C., Yu S.H. (2007) Six species of *Penicillium* associated with blue mold of grape. *Mycobiology* **25**: 180-185.
- Klich M.A. (2009) Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health* **25**: 657-667.
- López- Díaz T. M., Santos J. A., García López M. L., Otero A. (2001) Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *Int. J. Food Microbiol* **68**: 69-74.
- Ludemann V., Greco M., Rodríguez M.P., Basílico J. C., Pardo A. G. (2010) Conidial production by *Penicillium nalgiovense* for use as starter cultures in dry fermented sausages by solid state fermentation. *LWT – Food Sci. and Tech.* **43**: 315–318.
- 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., Frece J., Čvek D., Lovrić N., & Delaš F. (2010) Aflatoksin M1 u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **60**: 244-251.
- Markov K., Pleadin J., Bevardi M., Vahčić N., Sokolić-Mihalak D., Frece J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food control* **34**: 312-317.
- McClenny N. (2005) Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture. *J. Md. Mycol.* **1**: 125-128.
- Miller, J.D. (1995) Review: fungi and mycotoxins in grain: implication for stored product research. *J. Stored. Prod. Res.* **31**: 1-16.

Okuda T., Klich M.A., Seifert K.A., Ando K. (2000). Media and incubation effect on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. U: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification (Samson R.A., Pitt J.I., eds). Harwood Academic Publishers, Amsterdam. str. 83–99.

Pitt J. I., Hocking A. D. (2009) *Fungi and Food Spoilage*, Springer Dordrecht Heidelberg London New York, New York. str. 169-339; 412.

Pleadin J., Kovačević D. (2016) Kemijske opasnosti u mesu i mesnim proizvodima u prehrambenom lancu od farme do potrošača. *MESO: prvi hrvatski časopis o mesu* **18**: 436.

Raper K.B., Fennell D.I. (1965) *The genus Aspergillus*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

Refai M., El-Yazid H.A., Tawakkol Wael (2015) Monograph On The genus *Penicillium*, A guide for historical, classification and identification of penicilli, their industrial applications and detrimental effects, Cairo University, Misr University for Science and Technology

Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. (2004) *Introduction to Food and Airborne Fungi*; Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht.

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.

Sweeney M.J., Dobson A.D.W. (1998) Review: mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* **43**: 141-158.

Šušković J. (2018) predavanja iz kolegija „Biotehnologija 4“, Prehrambeno-biotehnoški fakultet u Zagrebu.

Tabuc C, Bailly J. D., Bailly S., Querin A, Guerre P (2004) Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study. *Revue Méd. Vét.* **156**: 287-291.

Visagie C. M., Houbraken 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.

Zdravec 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.

Zdolec N. (2016) Fermented Meat Products Health Aspects, CRC Press, Zagreb. str. 127-167.

Izjava o izvornosti

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

Klara Čujak

Klara Čujak