

# Utjecaj klimatskih promjena na pojavnost plijesni na žitaricama

---

Zvone, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:434864>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Katarina Zvone**

**Utjecaj klimatskih promjena na pojavnost  
plijesni na žitaricama**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić. Istraživanje je provedeno u sklopu projekta „Istraživanje utjecaja klimatskih promjena na razvoj plijesni, mikotoksina i kvalitetu žitarica s prijedlogom mjera“ (KK.05.1.1.02.0023), kojeg je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić, na ukazanoj prilici i povjerenju te na pruženoj pomoći tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala mojoj obitelji na podršci, razumijevanju i ohrabrenju tijekom cijelog studiranja. Hvala dragim prijateljima što su uljepšali moje studentske dane.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Klimatske promjene .....	1
1.2. Mikotoksini i uvjeti za njihov rast.....	2
1.3. Utjecaj klimatskih promjena na rast plijesni i tvorbu mikotoksina.....	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	9
3. MATERIJALI I METODE .....	10
3.1 Materijali .....	10
3.1.1 Hranjive podloge .....	10
3.1.2. Uređaji.....	11
3.2 Metoda.....	11
3.2.1 Uzorkovanje .....	11
3.2.2 Mikološka analiza .....	11
3.2.3 Statistička obrada rezultata.....	12
4. REZULTATI.....	13
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK .....	29
7. LITERATURA.....	30
8. SAŽETAK/SUMMARY .....	37
Temeljna dokumentacijska kartica.....	39
Basic documentation card .....	40

# 1. UVOD

## 1.1 KLIMATSKE PROMJENE

Izvještaj Međuvladinog panela o klimatskim promjenama (IPCC<sup>1</sup>, 2007) naglašava kako je globalno zagrijavanje postao dominantan problem i neizbježan proces s očitim promjenama koje se događaju posljednjih nekoliko desetljeća. Koncentracije metana, ugljikovog dioksida, dušikovog oksida u atmosferi se sve više povećavaju, dovodeći posljedično do zagrijavanja okoliša, većih oborina i razdoblja suše. Osim povećanja intenziteta i učestalosti ekstremnih meteoroloških pojava posljedice klimatskih promjena se dovode u vezu i s podizanjem razine mora, smanjenju zaliha pitke vode, povećanju površina pustinja, povećanju opasnosti od bolesti i izumiranju niza bioloških vrsta.

Također, promjene u temperaturi, oborinama i koncentraciji ugljikovog dioksida u atmosferi mogu dovesti do neočekivanog povećanja ili smanjenja kontaminacije usjeva s plijesnima i njihovim mikotoksinima, ali i do pojave nove strukture vrsta plijesni, producenata mikotoksina, po geografskim područjima svijeta. Dakle, globalno zatopljenje neće imati samo utjecaja na već prisutne interakcije patogena i domaćina, već će pogodovati pojavi novih bolesti i promjenama u bioraznolikosti/mikrobiomu plijesni u određenim dijelovima svijeta (Perrone i sur., 2020).

Primjerice, 2003./2004. godine vladale su jako vruće i suhe vremenske prilike u dijelovima sjeverne Italije koja se bavi proizvodnjom sira, a gdje je glavna namirnica za stoku kukuruz (Giorni i sur., 2007). Kontaminacija s plijesnima *Fusarium verticillioides* i s fumozinima je česta na kukuruzu, a optimalna temperatura za povećanu produkciju fumozina je 25-30 °C. Međutim, zbog jako suhih uvjeta te godine, vrsta *Aspergillus flavus* se pojavila kao značajniji problem. *Aspergillus flavus* tolerira široki raspon temperature (19-35 °C), za rast joj je najpogodnija temperatura od 28 °C, a za produkciju aflatoksina temperatura od 28-30 °C. Vrsta *A. flavus* može rasti u uvjetima aktiviteta vode od 0.73, a proizvoditi aflatoksine na 0.85, za razliku od vrste *F. verticillioides* koja raste u uvjetima  $a_w > 0.90$  i stvara fumozine na  $a_w > 0.93$ . Kontaminacija kukuruza s aflatoksinom B1 je bila značajna i rezultirala je visokim koncentracijama aflatoksina M1 u mlijeku stoke koja se hranila tim kukuruzom. Tako je *A. flavus* kao kserotolerantnija mikotoksikološka vrsta aktivno kolonizirala kukuruz,

---

<sup>1</sup> The Intergovernmental Panel on Climate Change

prevladavajući nad vrstama roda *Fusarium* To je dovelo do značajnih gospodarskih i ekonomskih gubitaka (Magan i sur., 2011).

## 1.2. MIKOTOKSINI I UVJETI ZA NJIHOV RAST

Žitarice i proizvodi od žitarica u ljudskoj su prehrani, kao i u ishrani životinja, najzastupljenija komponenta, a ujedno su i vrlo pogodna sirovina za razvoj plijesni. FAO<sup>2</sup> ističe da je oko 25% svjetske proizvodnje žitarica kontaminirano mikotoksinima koji mogu ozbiljno utjecati na zdravlje životinja, odnosno zdravlje ljudi (Peraica i Domijan, 2001, Surai i sur., 2008).

Tijekom proizvodnje i skladištenja sirovina, kao i gotovih namirnica, plijesni se pojavljuju kao vrlo učestala onečišćenja koja mogu producirati širok spektar sekundarnih metabolita, među kojima značajnu skupinu predstavljaju mikotoksini. Mikotoksikoze su bolesti koje se vežu uz unošenje mikotoksina, a poznato je da uzrokuju različite toksične učinke u ljudi i životinja, uključujući hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, neurotoksičnost, mutagenost, karcinogenost i imunosupresiju (IARC, 1993).

U domaćih životinja mikotoksini uzrokuju alergijske reakcije, gubitak apetita, povraćanje, mršavljenje, smanjenje imuniteta, smanjenu reprodukciju i smrt. Zabilježeni su masovni pomori životinja u prošlosti, kao 1934. kada je u SAD-u uginulo više od 5000 konja od „bolesti uzrokovane kukuruznom plijesni“ ili 1972. godine kada se pojavio problem odbijanja hrane kod svinja u Corn Belt-u (Katalenić, 2004). Nadalje, „X bolest purica“ 1960. godine uzrokovala je pomor više od 100 000 mladih purica i 20 000 druge peradi. Veliki pomor peradi povezuje se s hranom na bazi kikirikija uvezenoj iz Brazila u kojoj su utvrđeni aflatoksini pa se taj datum smatra prekretnicom u snažnijem pristupu istraživanjima mikotoksina u modernoj povijesti (Peraica i sur., 1999). Trovanja mikotoksinima kroničari spominju već 943. godine kao „Vatra sv. Ante“ uzrokovanu ergot alkaloidima nastalim razvojem plijesni *Claviceps purpurea* na žitarici raži (Peraica i sur., 1999). Žrtve „Vatre sv. Ante“, ergotizma, bili su izloženi i dietilamidu lisergične kiseline (LSD), halucinogenom sredstvu, nastalom pri pečenju kruha od pšenice koja je sadržavala ergot.

Među stotinama poznatih mikotoksina posebna se pažnja posvećuje aflatoksinima i okratoksinima te fuzarijskim mikotoksinima fumonizinu, zearalenonu, deoksinivalenolu

---

<sup>2</sup> Food and Agriculture Organization of the United Nations

(DON) i T-2/HT-2 toksinu, budući da onečišćuju brojne vrste namirnica, a pojavljuju se diljem svijeta. Pojavnost mikotoksina u izravnoj je poveznici s pojavnošću toksikotvornih vrsta plijesni, koje na godišnjoj razini variraju po različitim regijama svijeta te su u ovisnosti o okolišnim uvjetima. *Aspergillus* vrste dominiraju u toplim i umjerenim dijelovima svijeta, dok su *Penicillium* vrste česte u hladnijim dijelovima svijeta (Sweeney i Dobson, 1998). Stoga se aflatoksini koje uglavnom proizvode *Aspergillus* vrste u većim koncentracijama nalaze u tropskim i suptropskim područjima, fuzarijski mikotoksini u umjerenom klimatskom području, a okratoksini, koje najviše produciraju plijesni iz roda *Penicillium*, u područjima hladnije klime. Također, duga sušna razdoblja tijekom godine pogoduju produkciji aflatoksina, dok kišna razdoblja pogoduju nastanku *Fusarium* mikotoksina (Binder i sur., 2007). Stoga je ključni čimbenik temperatura okoliša koja zajedno s aktivitetom vode ( $a_w$ ) utječe na rast plijesni i proizvodnju mikotoksina (Northolt i Bullerman, 1982).

Aflatoksini se smatraju najpoznatijim i najtoksičnijim mikotoksinima (Hussein i Brasel, 2001), a produciraju ih neki sojevi plijesni roda *Aspergillus*. Za rast im naročito pogoduju temperature od 26-38 °C i sadržaj vlage veći od 18 %. Vrsta *A. flavus* producira aflatoksine B1 i B2 na žitaricama poput kukuruza, dok *A. parasiticus* može producirati aflatoksine B1, B2, G1 i G2 na uskladištenim uljaricama (Valpotić i Šerman, 2006). Aflatoksini M1 i M2 su hidroksilirani metabolički produkti aflatoksina B1 i B2. Također, aflatoksin M1 (AFM1) se izlučuje u mlijeko preko mliječnih žlijezda goveda koja su jela hranu kontaminiranu aflatoksinom B1 (AFB1). Budući da je stabilan tijekom pasterizacije i sterilizacije mlijeka i mliječnih proizvoda, unos relativno malih količina AFM1 može znatno narušiti ljudsko zdravlje, osobito djece koja su glavni konzumenti mlijeka i mliječnih proizvoda (Cvaliere i sur., 2006). Aflatoksin B1 jedan je od najznačajnijih prirodnih karcinogena s izrazito visokom toksičnošću te je po preporuci Agencije za istraživanje raka (IARC<sup>3</sup>), svrstan je u skupinu 1 tj. skupinu spojeva s dokazanim karcinogenim učinkom u ljudi (Delaš, 2010, Wogan, 1999). Uzročnik je karcinoma jetre, jednog od učestalijih karcinoma u razvijenim zemljama (Wogan, 1999). Temperature iznad 25 °C i dugo razdoblje suše pogoduju kontaminaciji usjeva s aflatoksinima. Također, oborine neposredno prije, kao i na sam dan berbe, povećavaju vjerojatnost kontaminacije usjeva aflatoksinima pogotovo za vrijeme skladištenja. Temperature ispod 20 °C sprječavaju kontaminaciju usjeva aflatoksinima. Pretpostavlja se da će uslijed klimatskih promjena

---

<sup>3</sup> International Agency for Research on Cancer

kontaminacija aflatoksinima postati učestalija u trenutno umjerenim klimatskim uvjetima poput onih u Zapadnoj Europi kako temperatura sve više raste (Miraglia i sur., 2009).

Okratoksine proizvodi nekoliko vrsta plijesni iz roda *Aspergillus*, primarno *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius* te roda *Penicillium*, *P. verrucosum* (Varga i sur., 1996). Najtoksičniji predstavnik ove skupine je okratoksin A (OTA) koji je izoliran iz plijesni *Aspergillus ochraceus* (Delaš, 2010). Okratoksin A je primarno nefrotoksičan, a u velikim dozama je i hepatotoksičan. Prema IARC-u, OTA je mikotoksin s mogućim karcinogenim učinkom u ljudi te je svrstan u skupinu 2B. Dovodi se u vezu s razvojem endemske nefropatije i tumora bubrežne nakapnice i mokraćovoda u ljudi (Pepeljnjak i sur., 2008). Znatne koncentracije OTA u hrani biljnog podrijetla pronađene su uglavnom u istočnoj Europi i to u pšenici, riži, kukuruzu, raženom brašnu, heljdi, žitaricama za doručak te kao rezultat sekundarne kontaminacije u mesu i mesnim proizvodima gdje predstavlja osobiti problem (Amézqueta i sur., 2009). Optimalni uvjeti rasta i tvorbe okratoksina su temperatura između 15-25 °C i sadržaj vlage tj. aw 0,85-0,98 (Pitt i sur., 2000).

Plijesni koje produciraju znatne količine fumonizina su *F. verticillioides* i *F. proliferatum* (Creppy, 2002). U znatnim koncentracijama fumonizin je detektiran u kukuruzu i proizvodima na bazi kukuruza, riži i ječmu, a vrlo često ga se pronalazi i u kombinaciji s drugim mikotoksinima. Ovisno o životinjskoj vrsti može uzrokovati neurotoksičnost, hepatotoksičnost, imunosupresiju, tumore jetre i druge poremećaje (Kovačić i sur, 2009). Fumonozin B1 je najtoksičniji predstavnik ove skupine. Povezuje se s leukoencefalomalacijom kod konja (ELEM). Istraživanja su pokazala da konzumacijom oko 8 mg/kg hrane fumonizina postoji rizik od nastajanja ELEM-a kod konja. Konji su osjetljiviji na fumonizine, a nakon pojave simptoma bolesti vrlo rijetko se oporavljaju. Kod peradi i svinja, fumonizini djeluju na limfocite i tako smanjuju imunitet, a kod svinja povezuju se i s nastankom edema pluća (Katalenić, 2004). Visoka koncentracija toksina povezuje se s vrućim i suhim vremenom, uz povremene periode visoke vlage. Osim toga, razvoj plijesni potiču i insekti koji oštećuju plod biljke. Vlaga od 18-23 % tijekom sladištenja kukuruza je optimalna za razvoj plijesni *Fusarium* vrste (Bacon i Neson, 1994).

Zearalenon (ZEA) je mikotoksin s estrogenim djelovanjem kojeg tvore vrste *Fusarium* (*F. graminearum*). Zbog sličnosti s estradiolom, hormonom kojeg luče ovariji sisavaca, ZEA se kompetitivno veže za estrogene receptore. U probavnom sustavu ZEA se reducira u zearalenol koji ima do 4 puta jači estrogenu učinak. ZEA uzrokuje poremećaje u reproduktivnom i



endokrinom sustavu, te genotoksičnost, a u velikim koncentracijama djeluje imunotoksično na humane T-limfocite (Pepeljnjak i sur., 2008). Smatra se da je ZEA odgovoran za preuranjeni pubertet u djece. Naime, u Puerto Ricu je ZEA dokazan u krvi djece kod kojih su zabilježene spomenute razvojne promjene. U jugoistočnoj Mađarskoj je zabilježena povećana učestalost preuranjenog razvoja grudi u djece pri čemu su u serumu dokazane koncentracije od 18,9 do 103,5  $\mu\text{g}$  ZEA/mL (Peraica i sur., 2001). Produkciji zearalenona naročito pogoduju vlažnija klimatska podneblja s nižim temperaturama od 10 do 15 °C (Abramson, 1998). Prisutnost zearalenona dokazana je u različitim žitaricama i to kukuruzu, ječmu, pšenici, raži, soji i njihovim proizvodima (Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

Deoksinivalenol (DON, vomitoksin) se javlja uglavnom kod žitarica poput pšenice, ječma i kukuruza, a rjeđe kod zobi, riže i raži. Produkcija deoksinivalenola primarno je povezana s *F. graminearum* i *F. culmorum*, a naročito mu pogoduju vlažnija klimatska podneblja ( $a_w$  0,97) i temperatura od 25-28 °C (Doohan i sur., 2003). Deoksinivalenol može imati štetne učinke na zdravlje nakon kratkoročne ili dugoročne izloženosti. Nakon akutne izloženosti DON izaziva dva karakteristična toksična učinka: smanjen unos hrane (anoreksija) i povraćanje (Creppy, 2002). Povraćanje i anoreksija su posredovani serotonergičkim sustavom centralnog živčanog sustava ili perifernim djelovanjem na serotoninse receptore. DON inhibira sintezu DNA, RNA i proteina na ribosomskoj razini i ima hemolitični učinak na eritrocite (Schlatter, 2004). Leukociti su centralna meta deoksinivalenola i drugih trihotecena, a ovisno o dozi i učestalosti izloženosti učinak DON-a može biti imunostimulatoran ili imunosupresivan (Pestka i sur., 2004). U životinja glavni učinak niske koncentracije DON-a u hrani (>2 mg/g u krmi za svinje) dovodi do smanjenog unosa hrane (anoreksija), a time i smanjenog porasta mase, dok veće doze (>20 mg/g) induciraju odbijanje hrane, dijareju i povraćanje (Kanižai Šarić i sur., 2011).

T-2 toksin produciraju plijesni iz roda *Fusarium* u širokom temperaturnom intervalu od 0-32 °C uz maksimalnu produktivnost ispod 15 °C (Creppy, 2002). T-2 toksin je najpotentniji trihotecen koji djeluje citotoksično, imunosupresivno i izaziva niz gastrointestinalnih, dermatoloških i neuroloških simptoma (Bennett i sur., 2003). T-2 toksin se smatra uzročnikom alimentarne toksične aleukije u humanoj populaciji koju karakteriziraju simptomi povraćanja, diareje, abdominalnih bolova i oralnog krvarenja (IARC, 1993). Toksični efekt T-2 toksina očituje se gubitkom težine, smanjenjem broja krvnih stanica i leukocita, patološkim promjenama na jetri i želucu. Akutna izloženost T-2 toksinu dovodi do povraćanja, proljeva, krvarenja, stanja opće slabosti, oštećenja hrskavičnih tkiva, apoptoze i smrti (Kiš i Pleadin, 2018). Dominantno su prisutni u tropskim i suptropskim područjima gdje topli i vlažni

klimatski uvjeti, uz nepravilno skladištenje žitarica s visokim sadržajem vlage, mogu dovesti do značajne kontaminacije. Faktori koji najviše utječu na proizvodnju T-2 toksina su klimatski uvjeti, mehaničko oštećenje zrna i visoki sadržaj vlage (Li i sur., 2011).

### 1.3. UTJECAJ KLIMATSKIH PROMJENA NA RAST PLIJESNI I TVORBU

#### MIKOTOKSINA

EFSA<sup>4</sup> predviđa da će učinci klimatskih promjena na pojavnost mikotoksina biti regionalni te uglavnom štetni, ali moguće i povoljni za pojedino geografsko područje (EFSA, 2020).

Povećana razina onečišćenja hrane za ljude i za životinje može se pojaviti vezano za trenutno postojeće mikotoksine ili se može dogoditi „premještanje“ nekih mikotoksina iz dosadašnjih u nove geografske regije, u kojima ranije nisu zabilježene njihove značajnije razine. Stres prouzročen klimatskim promjenama može rezultirati pojavnošću novih mikotoksina koji ranije nisu bili prepoznati, a njihova pojavnost može ozbiljno narušiti dostupnost hrane za ljude i životinje, posebno u zemljama u razvoju (Miraglia i sur., 2009).

U izvješću IPCC-a (2007) navodi se da će temperatura porasti za otprilike 4 °C narednih 100 godina. Spominje se povećani gubitak minerala u tlu i varijacije u njihovoj bioraspoloživosti te promjene u ekosustavima mikroorganizama u tlu. Tako će u budućnosti plijesni kojima pogoduje viša temperatura za rast i proizvodnju mikotoksina dominirati u područjima s trenutno umjerenom klimom, a postat će manje rasprostranjeni u područjima s trenutno toplom klimom. Utjecaj povišenja temperature različito će se odraziti u različitim geografskim područjima i imat će veliki utjecaj na poljoprivredu (smanjeni prinos usjeva, promjene u kvaliteti tla, varijacije u godišnjim dobima). Također, vrući i suhi uvjeti omogućit će dobre uvjete skladištenja – potencijalna prednost klimatskih promjena (Paterson i Lima, 2011).

S druge strane, pojavnost obilnih oborina uslijed klimatskih promjena uzrokovat će povećani stres usjeva što posljedično dovodi do smanjenih prinosa. Također, takvi usjevi su podložniji kontaminaciji plijesnima zbog svoje smanjene otpornosti. Štete na usjevima, erozije tla i nemogućnost obrade polja predviđaju se u izvješću IPCC-a (2007). Erozijska tla dovodi do ispiranja hranjivih nutrijenata iz biljke čime slabi njenu rezistenciju na kontaminaciju plijesnima.

---

<sup>4</sup> European Food Safety Authority

Druga faza kontaminacije mikotoksinima može se dogoditi u periodu između sazrijevanja usjeva do njegove konzumacije (van der Fels-Klerx i sur., 2009). U tom periodu usjev može biti izložen toplim i vlažnim uvjetima u polju, transportu ili u skladištu (Tirado i sur., 2010). Problemi započinju u slučaju velikih kiša prije same berbe, te posljedično nedovoljno osušenim žitaricama na polju, što se može pripisati postojanju klimatskih promjena. Ključni okolišni čimbenici na nastanak plijesni su temperatura, vlažnost i sastav plina. Do kvarenja neće doći ukoliko se usjevi čuvaju u skladištima pri  $a_w \leq 0,7$  (Paterson i Lima, 2011).

Pojava različitih mikotoksina u polju povezana je s geografskim položajem na kojem se kultura uzgaja i meteorološkim uvjetima, iako dobra poljoprivredna praksa (GAP) i dobra proizvodna praksa (GMP) tijekom rukovanja, skladištenja, prerade, transporta i distribucije igra važnu ulogu u smanjenju kontaminacije mikotoksinima (Perrone i sur., 2020).

Istraživanja pokazuju da okolišni stres ima značajne posljedice za proizvodnju mikotoksina od strane plijesni (Schmidt-Heydt i sur., 2011). Iako su plijesni uglavnom otporne na povišenu koncentraciju ugljičnog dioksida, u kombinaciji s drugim čimbenicima, ovaj plin može imati značajan indirektan utjecaj na produkciju mikotoksina, povezan s faktorima stresa, zbog suše, oštećenja biljaka insektima i promjenama u fenologiji usjeva, poput promjena vremena cvatnje i zrenja žitarica (van der Fels-Klerx i sur., 2016). Očekuje se da će u Europi, naročito njezin južni dio, biti pogođen klimatskim promjenama, gdje će se dogoditi kombinirane promjene po pitanju povišenog udjela ugljičnog dioksida u atmosferi (dva puta u odnosu na prosječnu razinu u posljednjim desetljećima), porasta temperature (za 2-4 °C) i pojave ekstremnih oborina i suša. Smatra se da je porast temperature i vlage povezan s klimatskim promjenama najvjerojatnije rezultirao pojavom znatnije kontaminacije aflatoksinima u južnoj Europi početkom 2000-ih, a od tada je uočena i njihova sve veća razina pojavnosti u sjevernom dijelu Europe. U južnoj su Europi izuzetno vruća ljeta već rezultira promjenama u ekosustavima uzgoja kukuruza, što je dovelo do promjena u uobičajenoj pojavnosti vrsta *Fusarium* i fuzarijskim mikotoksina te učestalijoj pojavnosti *A. flavus* i kontaminaciji izrazito toksičnim aflatoksinom B1. Primjerice, istraživanja provedena u Hrvatskoj ukazala su na visoku kontaminaciju kukuruza aflatoksinima tijekom 2013. godine pod utjecajem tropskih i subtropskih klimatskih uvjeta koji su zabilježeni pri uzgoju kukuruza tijekom 2012. godine (Pleadin i sur., 2014a, 2015), dok su ranija istraživanja ukazala na učestaliju kontaminaciju kukuruza i ostalih žitarica fuzarijskim mikotoksinima.

Može se očekivati da će klimatske promjene općenito jako utjecati na kontaminaciju različitih žitarica aflatoksinima te da će uslijed povećane kontaminacije aflatoksikogenim plijesnima njihov najtoksičniji predstavnik aflatoksin B1 u narednom stoljeću postati značajna prijetnja sigurnosti hrane, primarno na području istočne Europe, na Balkanskom poluotoku i Mediteranu (Battilani i sur., 2016). Modeliranjem utjecaja potencijalnih klimatskih promjena na fenologiju pšenice na području sjeverozapadne Europe, predviđa se ranija cvatnja i zrenje pšenice i to između jednog i dva tjedna, kao i povećana kontaminacija usjeva DON-om (van der Fels-Klerx i sur., 2016).

U nekim područjima Europe kvaliteta tla će se narušiti zbog povećanog gubitka minerala uslijed ekstremnih oborina, a doći će i do učestalijih pojava klizišta i erozija tla (Miraglia i sur., 2009). Južna Europa će vjerojatno doživjeti smanjenje proljetnih usjeva (npr. kukuruza, soje, suncokreta) s time da će oni postati prikladniji za uzgoj u sjevernim područjima Europe. Očekuje se da će se proizvodnja kukuruza povećati za 30-50 % u sjevernoeuropskim zemljama, a značajno se smanjiti na jugu Europe. Iako, problem mikotoksina će i dalje pratiti usjeve (Paterson i Lima, 2011).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Sve učestalija pojava iznadprosječno visokih temperatura u kombinaciji s ekstremnim količinama oborina ili razdobljima suše povećavaju stres biljaka, povećavajući rizik, ponajprije kukuruza, ali i ostalih žitarica za infekciju plijesnima i kontaminaciju mikotoksinima. Također, žitarice su podložne kontaminaciji i za vrijeme skladištenja, a posebno su osjetljive na visok udio vlage u zraku, kao i na zaostanak određene količine vode na zrnju zbog nedovoljno i neadekvatno provedenog sušenja. Posebna pozornost se posvećuje vrstama roda *Fusarium* koje rastu u uvjetima povećane vlažnosti, kao i na kserofilne vrste iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Vrste plijesni ovih rodova su najznačajniji producenti mikotoksina te mogu predstavljati javnozdravstveni problem.

Specifični ciljevi ovog rada su :

1. Odrediti koncentraciju plijesni iz uzoraka kukuruza, ječma i pšenice na području sjeverne, istočne i središnje Hrvatske uzetih iz skladišta.
2. Na temelju morfoloških i mikromorfoloških obilježja identificirati plijesni porasle na odgovarajućim hranjivim podlogama do razine roda/vrste.

### 3. MATERIJALI I METODE

Primijenjena metode je brojanje plijesni i kvasaca u proizvodima namijenjenim za ljudsku potrošnju ili prehranu životinja postupkom brojanja kolonija pri 25 °C.

#### 3.1 MATERIJALI

Korišteni materijali: podoge DG-18 i DRBC, peptonska voda, sterilne tikvice (do 500 ml), Petrijeve zdjelice, tipsevi, epruvete, L-štipači, autoklav, termostatorirana tresilica.

##### 3.1.1 HRANJIVE PODLOGE

- Peptonska voda (Biolife, Italija) priređena je otapanjem 1 g kazeina i 8,5 g natrijevog klorida (NaCl) u 1 L destilirane vode uz zagijavanje do vrenja. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem, 15 min na 121 °C. Nakon sterilizacije dodan je polisorbat 80 (Tween 80; Sigma-Aldrich, Njemačka).
- Dikloran rose bengal kloramfenikol agar (DRBC; Oxoid, UK) pripremljen je otapanjem 10 g glukoze, 5 g peptona, 1 g monokalijeveg fosfata (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,5 g magnezijevog sulfata heptahidrata (MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O), 15 g agara, 2 mg diklorana (0,2% w/v u EtOH, 1 mL), te 100 mg kloramfenikola u 1 L destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem, 15 min na 121°C. Nakon sterilizacije dodano je 25 mg rose bengala (5% w/v u H<sub>2</sub>O, 0,5 mL). Podloga se čuva zaštićena od svjetlosti.
- Dikloran 18% glicerolni agar (DG-18; Oxoid, UK) pripremljen je otapanjem 10 g glukoze, 5 g peptona, 1 g monokalijeveg fosfata (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,5 g magnezijevog sulfata heptahidrata (MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O), 15 g agara, 220 g glicerola, 2 mg diklorana (0,2% w/v u EtOH, 1 mL), te 100 mg kloramfenikola u 1 L destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem, 15 min na 121°C.

DG-18 podloga koristi se za prebrojavanje osmofilnih kvasaca i kserofilnih plijesni u hrani za ljude i životinje tehnikom brojanja kolonija ( $a_w \leq 0,95$ ). Smanjenje aktivnosti vode u ovom mediju postiže se dodatkom glicerola na približno 18 % što je važno jer mnogi kvasci i plijesni zahtjevaju nisku aktivnost vode kako bi se poboljšao rast i razvoj kolonija. S druge strane, DRBC podloga se koristi za prebrojavanje kvasaca i plijesni, ali s aktivnošću vode većom od 0,95. Podloge sadrže antifungalni agens dikloran kojim se sprječava širenje i razmnožavanje plijesni reda *Mucorales* koje propulzivno rastu i tako ometaju rast ostalih prisutnih vrsta. Iz istog razloga DRBC podloga sadržava još i rose bengal (RB) radi sprječavanja kontaminacije uzoraka s drugim kolonijama. Dodatkom termostabilnog antibiotika kloramfenikola postiže se selektivnost protiv rasta bakterija. Kao izvor ugljikohidrata koristi se glukoza, a probavni enzimi osiguravaju esencijalne vitamine, minerale, aminokiseline, dušik i ugljik.

### 3.1.2. UREĐAJI

- Auroklav (φ 300 x 500, Sutjeska, Beograd, Srbija)
- Termostatirana tresilica (Orbital Shaker-Incubator Grant-Bio ES20, Grant Instruments (Cambridge) Ltd., UK)

## 3.2 METODA

### 3.2.1 UZORKOVANJE

Uzorci kukuruza, ječma i pšenice prikupljeni su iz skladišta na području sjeverne Hrvatske, središnje Hrvatske i istočne Hrvatske u ožujku 2021. godine. Sa sva tri područja prikupljeno je po 10 uzoraka svake žitarice (ukupno 90 uzoraka). Uzorci su se do analize čuvali u plastičnim sterilnim posudama na -20 °C.

### 3.2.2 MIKOLOŠKA ANALIZA

Važe se 10 g mljevenog uzorka, te se suspendira u 90 mL peptonske vode na način da je omjer uzorka i peptonske vode 1:9. Uzorak je potrebno homogenizirati u termostatiranoj tresilici prije razrjeđivanja te pričekati 15 minuta kako bi se talog slegnuo. Time je dobivena matična suspenzija, koncentracije  $10^{-1}$ . Radne suspenzije dobivaju su uzastopnim razrjeđivanjem

matične suspenzije, dok se ne dobiju redom koncentracije  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  i  $10^{-5}$ . Na DRBC i DG-18 hranjive podloge nasaduje se 100  $\mu$ L matične suspenzije svake od radnih suspenzija, a zatim razmazuje L-štapićem. Priređene hranjive podloge inkubiraju se u mraku, na 25°C. Kolonije se broje između drugog i petog dana inkubacije, pri čemu se odbacuju ploče gdje se razvilo više od 150 kolonija. Preostale kolonije identificiraju se uspoređivanjem morfoloških svojstava sa podacima iz literature (Samson i sur., 2010).

Koncentracija vijabilnih plijesni u g uzorka hrane izračunava se iz broja poraslih kolonija, a prema formuli:

$$N = \frac{\sum C}{V * (n1 + 0,1n2) * d}$$

$\sum C$  – zbroj kolonija izbrojenih na svim pločama

V – volumen inokuluma stavljen na svaku hranjivu podlogu (u mL)

n1 – broj ploča zadržanih za brojanje kod prvog razrjeđenja

n2 – broj ploča zadržanih za brojanje kod drugog razrjeđenja

d – razrjeđenje iz kojega su dobiveni prvi brojevi

### 3.2.3 STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati ovog istraživanja prikazani su kao srednja vrijednost koncentracije plijesni tj. broj jedinica formiranja kolonija (*engl.* colony forming unit, CFU) po gramu (CFU/g) te su statistički obrađeni jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) i post-testom (Tukey) komparacije različitih skupina podataka, za nivo značajnosti  $p \leq 0,05$ . Također, tablično je prikazana učestalost (%) pojedinih rodova i vrsta plijesni s obzirom na područje uzorkovanja.



#### 4. REZULTATI

Identifikacija vrsta plijesni i određivanje njihove ukupne koncentracije na žitaricama kukuruza, pšenice i ječma određena je praćenjem porasta kolonija na hranjivim podlogama DG-18 i DRBC. Uzorci žitarica uzeti su iz tri područja Hrvatske: sjeverne, istočne i središnje Hrvatske.

A)

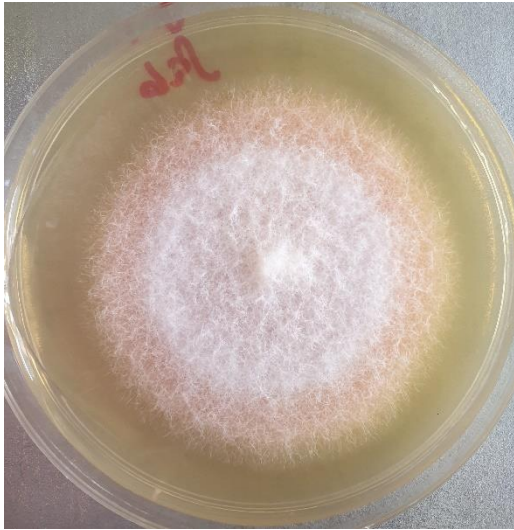


B)



**Slika 1.** Prikaz kolonije aspergila iz sekcije *Flavi* (A) i kolonije *Penicillium* spp. (B) nakon inkubacije (7 dana, 25 °C) na CYA agaru.

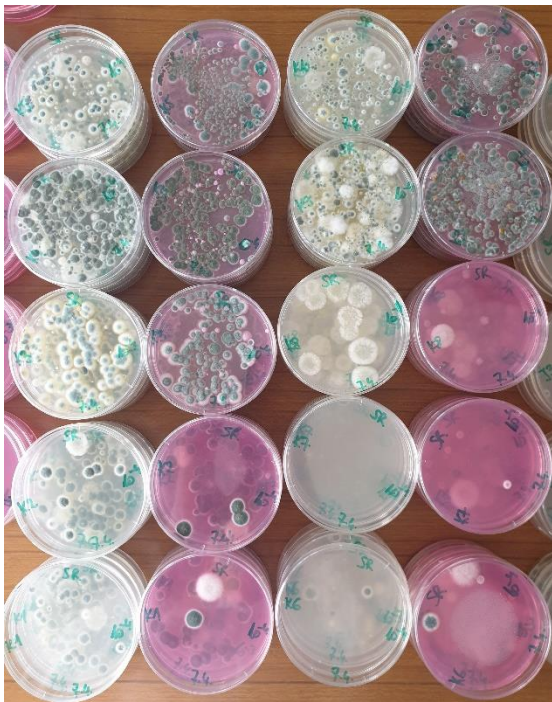
A)



B)



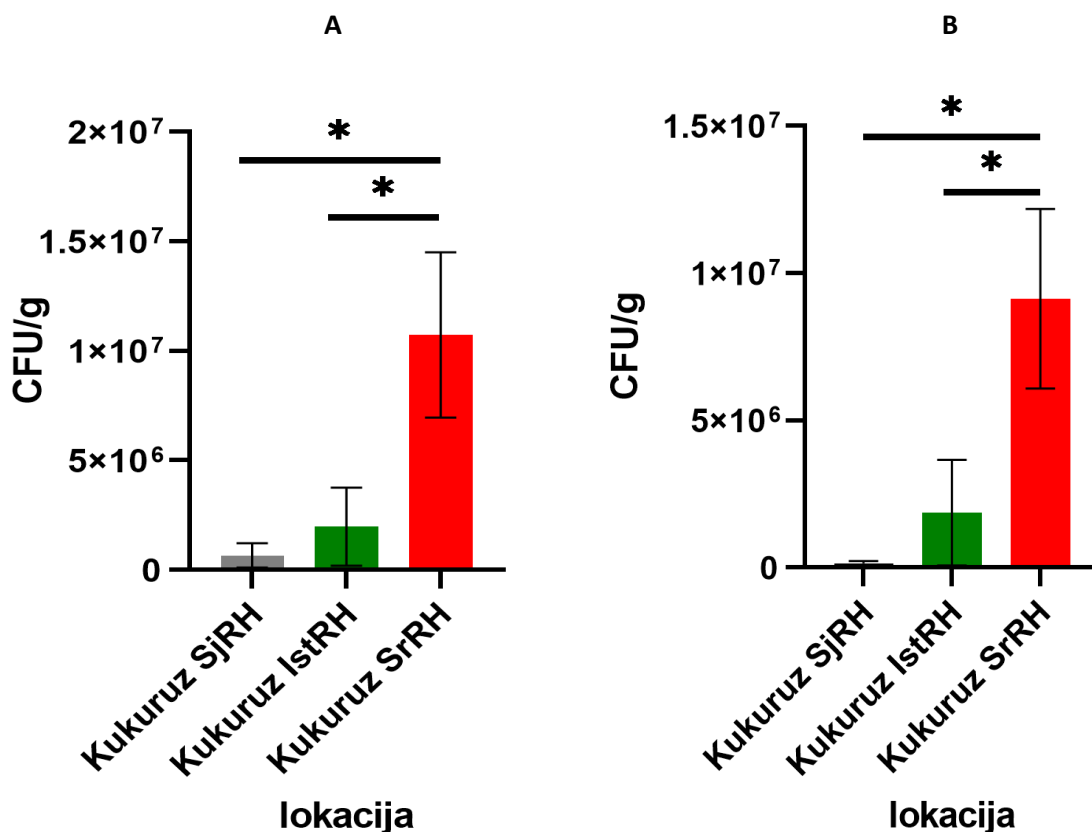
**Slika 2.** Primjer porasta kolonija plijesni *Fusarium* spp. na DG-18 agaru (A) i na DRBC agaru (B) nakon inkubacije (7 dana, 25 °C).



**Slika 3.** Primjer brojanja kolonija plijesni na DG-18 i DRBC hranjivoj podlozi nakon inkubacije (7 dana, 25 °C). Odbacivanje ploča na kojima se razvilo više od 150 kolonija.

Uzorci kukuruza s područja središnje Hrvatske, uzgajani na DG-18 hranjivoj podlozi, pokazuju srednju vrijednost koncentracija plijesni od  $1,07 \times 10^7$  CFU/g. To je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na srednje vrijednosti koncentracija plijesni s područja istočne Hrvatske ( $1,97 \times 10^6$  CFU/g) i s područja sjeverne Hrvatske ( $6,7 \times 10^5$  CFU/g) (Slika 4A).

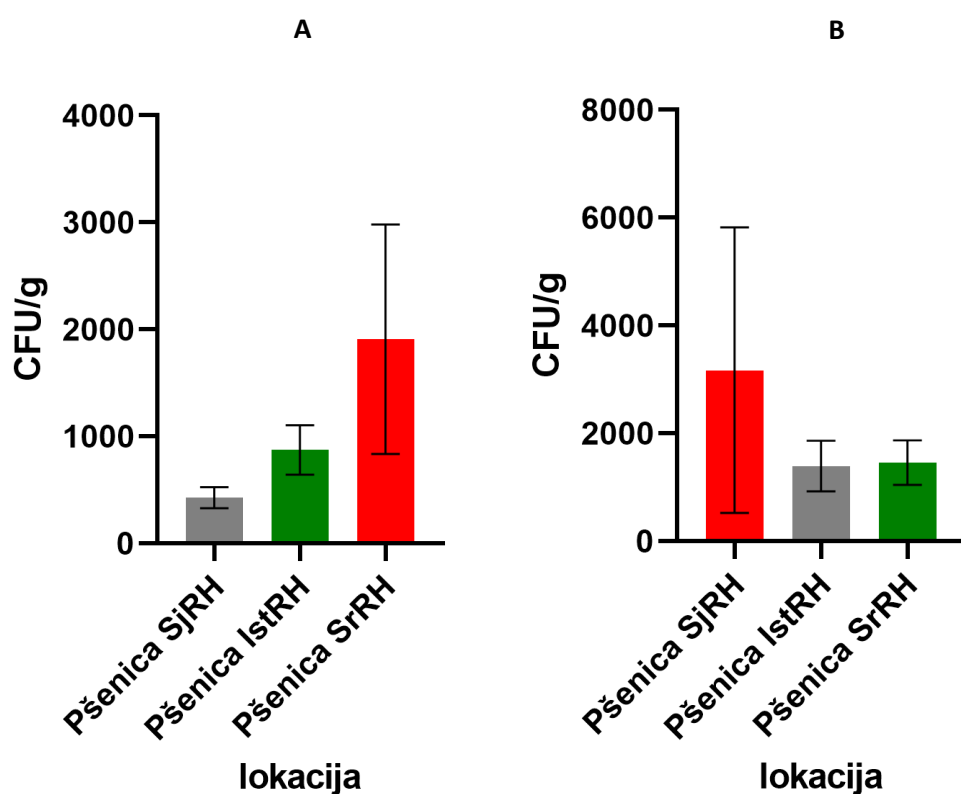
Uzorci kukuruza prikupljeni s područja središnje Hrvatske, a uzgajani na DRBC podlogama, također pokazuju statistički značajno veću ( $p > 0,05$ ) srednju vrijednost koncentracija plijesni ( $9,1 \times 10^6$  CFU/g) ukoliko se usporede sa srednjom vrijednosti koncentracija plijesni s područja istočne Hrvatske ( $1,8 \times 10^6$  CFU/g) i s područja sjeverne Hrvatske ( $1,4 \times 10^5$  CFU/g) (Slika 4B).



**Slika 4.** Koncentracija plijesni poraslih na DG-18 (A) i DRBC agaru (B) iz uzorka kukuruza iz tri područja Hrvatske (\*  $p < 0,05$ ).

Na DG-18 podlozi, rezultati dobiveni iz uzoraka pšenice pokazuju značajno manje vrijednosti koncentracija plijesni u odnosu na kukuruz. Srednja vrijednost koncentracija plijesni je najveća na području središnje Hrvatske i iznosi 1908 CFU/g. Na području istočne Hrvatske srednja vrijednost koncentracija plijesni iznosi 874 CFU/g, a na području sjeverne Hrvatske 427 CFU/g (Slika 5A).

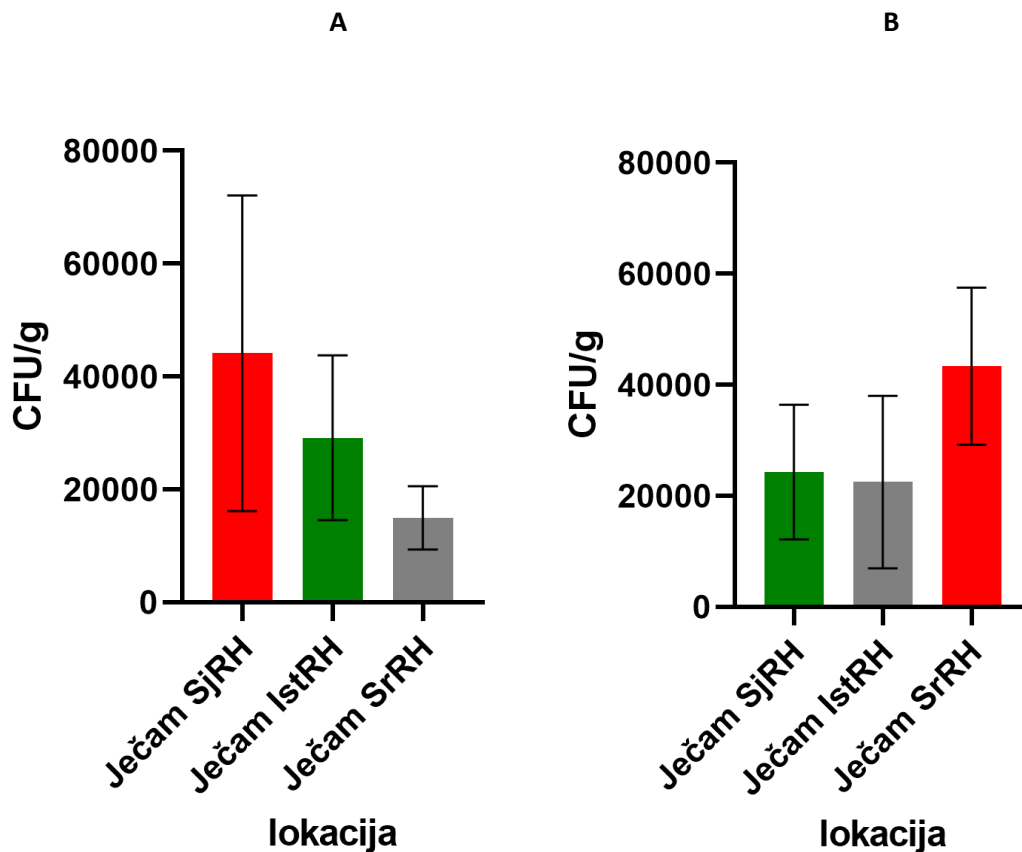
Na DRBC hranjivoj podlozi najveći porast plijesni se dogodio na uzorcima s području sjeverne Hrvatske sa srednjom vrijednosti koncentracija koja iznosi 3173 CFU/g. Na uzorcima s područja središnje Hrvatske izmjerena je srednja vrijednost koncentracija od 1459 CFU/g, a na području istočne Hrvatske ona iznosi 1392 CFU/g (Slika 5B).



**Slika 5.** Koncentracija plijesni poraslih na DG-18 (A) i DRBC (B) agaru iz uzorka pšenice iz tri područja Hrvatske.

Uzorci ječma koji su uzgajani na DG-18 hranjivoj podlozi bilježe najveću srednju vrijednost koncentracija na području sjeverne Hrvatske (44 146 CFU/g). Nakon njih slijede uzorci ječma s područja istočne Hrvatske (29 172 CFU/g), a zatim uzorci iz središnje Hrvatske (14 950 CFU/g) (Slika 6A).

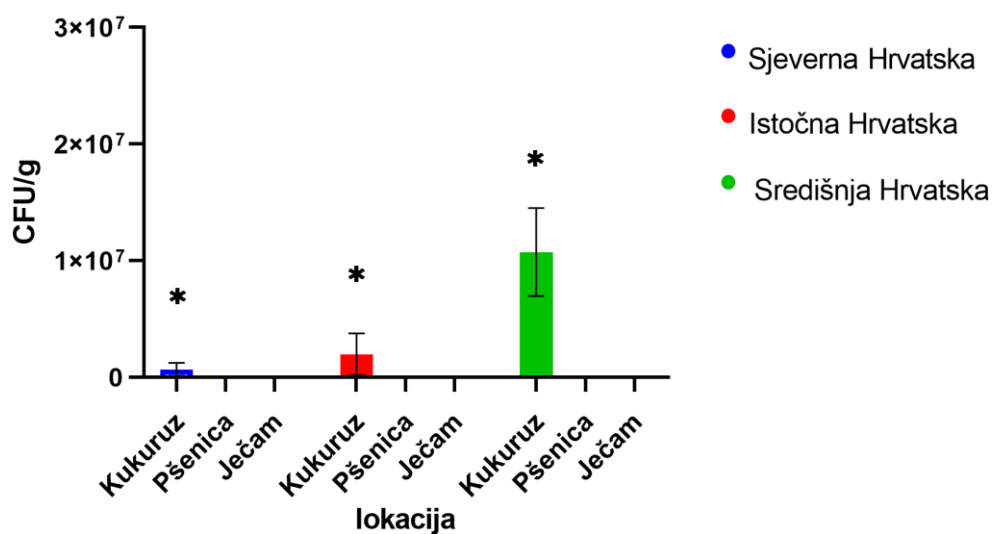
Na DRBC hranjivoj podlozi najveće vrijednosti koncentracija plijesni zabilježene su iz uzoraka s područja središnje Hrvatske (43 370 CFU/g). Srednja vrijednost koncentracija plijesni iz uzoraka s područja sjeverne Hrvatske iznosi 24 320 CFU/g, a iz područja istočne Hrvatske ona iznosi 22 489 CFU/g (Slika 6B).



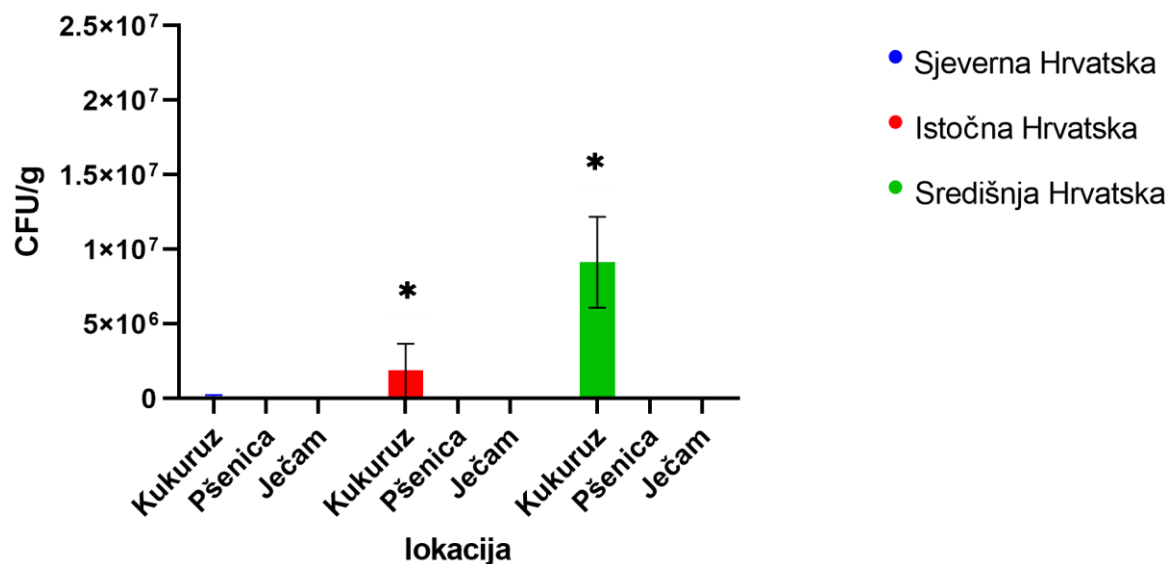
**Slika 6.** Koncentracija plijesni poraslih na DG-18 (A) i DRBC agaru (B) iz uzorka ječma iz tri područja Hrvatske.

Vrijednosti koncentracija plijesni uzgajanih na DG-18 podlozi pokazuju da uzorci kukuruza imaju značajnije veći porast plijesni u odnosu na pšenicu i ječam. Najveći porast plijesni iz uzoraka kukuruza je izmjeren na području središnje Hrvatske, zatim na području istočne Hrvatske i na kraju na području sjeverne Hrvatske (Slika 7).

U slučaju DRBC podloge, značajniji porast plijesni također je zabilježen na uzorcima kukuruza. Nadalje, najveći porast plijesni je ostvaren na uzorcima prikupljenima s područja središnje Hrvatske, a zatim na onima iz istočne Hrvatske (Slika 8).



**Slika 7.** Koncentracija plijesni poraslih na DG-18 agaru iz uzoraka žitarica iz tri područja Hrvatske (\* $p < 0,05$ ).



**Slika 8.** Koncentracija plijesni poraslih na DRBC agaru iz uzoraka žitarica iz tri područja Hrvatske (\* $p < 0,05$ ).

U tablici 1 prikazana je učestalost (%) pojavljivanja različitih rodova i vrsta plijesni u uzorcima kukuruza, ječma i pšenice. Uzorci su prikupljeni s područja sjeverne, istočne i središnje Hrvatske, a uzgajani su na DG-18 agaru. Detektirane su plijesni iz 9 različitih rodova, među kojima dominiraju plijesni iz roda *Aspergillus* (najbrojnija sekcija *Aspergillus*), *Penicillium* spp., kvasci i *Fusarium* spp. (dominiraju na kukuruзу).

Plijesni koje dominiraju na uzorcima kukuruza iz sjeverne Hrvatske su one iz roda *Fusarium* (80%), *Penicillium* (80%) i *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (40%). Kvasci i plijesni iz roda *Wallemia* se pojavljuju na dva uzorka (20%), a na jednom uzorku se pojavljuje i rod *Aspergillus* sekcije *Circumdati* (10%).

Plijesan iz roda *Penicillium* pronađena je na svakom uzorku kukuruza s područja istočne Hrvatske (100%). Nešto manje učestalosti je rod *Fusarium* (70%), a nakon njega slijede plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (40%) i *Wallemia* (30%). Rod *Aspergillus* sekcije *Flavi* i sekcije *Nigri* pronađeni su na jednom uzorku (10%).

U uzorcima kukuruza, prikupljenima s području središnje Hrvatske, također dominiraju plijesni iz roda *Penicillium* (90%), ali i one iz roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (80%). Ostale plijesni se javljaju s malom učestalosti: rod *Fusarium* na dva uzorka (20%), dok rod *Aspergillus* i kvasci bilježe porast na jednom uzorku (10%).

Na uzorcima ječma iz sjeverne Hrvatske, najveću učestalost pokazuju plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (70%), *Penicillium* (50%) te kvasci (40%). Na dva uzorka došlo je do porasta plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Nigri* (20%) i *Cladosporium* (20%). Plijesni roda *Alternarium*, *Aspergillus* sekcije *Flavi* i *Wallemia* se pojavljuju na jednom uzorku (10%).

Na najvećem broju uzoraka ječma iz istočne Hrvatske pojavljaju se plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (70%), *Penicillium* (60%) i kvasci (60%). Nakon njih slijede plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Versicolores*, čiji je rast zamijećen jedino ovdje i to na četiri uzorka (40%). Plijesni roda *Acremonium*, *Aspergillus* sekcije *Flavi* i *Cladosporium* su narasle na jednom uzorku (10%).

Na uzorcima ječma iz središnje Hrvatske dominira plijesan iz roda *Penicillium* (100%) i *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (90%). Kvasci se pojavljuju na tri uzorka (30%), plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Flavi*, *Cladosporium* i *Fusarium* na dva uzorka (20%), a najmanje

zastupljeni su plijesni iz roda *Acremonium* i *Aspergillus* sekcije *Nigri* koji bilježe porast na jednom uzorku (10%).

Na prikupljenim uzorcima pšenice s području sjeverne Hrvatske dominiraju plijesni roda *Penicillium* (50%), a zatim slijede *Cladosporium* i kvasci (oboje 30%). Manje zastupljen je rod *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (20%), a u jednom uzorku je pronađena plijesan iz roda *Phoma* (10%).

Na području istočne Hrvatske plijesni iz roda *Penicillium* i kvasci su pronađeni na najviše uzoraka (50%). S nešto manjom učestalosti pojavljuju se plijesni roda *Cladosporium* (40%), a najmanje zastupljene su plijesni roda *Fusarium* (20%) i *Acremonium* (10%).

S područja središnje Hrvatske najveću pojavnost na uzorcima pšenice pokazuju plijesni roda *Penicillium* (50%). Na dva uzorka pronađene su plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* i kvasci (oboje 20%). Najmanje je onih iz roda *Cladosporium* i roda *Wallemia* (10%).



**Tablica 1.** Učestalost plijesni (%) poraslih na DG 18 agaru iz kukuruza, ječma i pšenice na području sjeverne (SJH), istočne (ISH) i središnje Hrvatske (SRH).

Gljivice	Kukuruz			Ječam			Pšenica			
	DG 18	SJH	ISH	SRH	SJH	ISH	SRH	SJH	ISH	SRH
<i>Acremonium</i> spp.					10	10		10		
<i>Alternarium</i> spp.				10						
<i>Aspergillus</i> spp.			10							
<i>Aspergillus</i> sek.	40	40	80	70	70	90	20			20
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Circumdati</i>	10									
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Flavi</i>		10		10	10	20				
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Nigri</i>		10		20		10				
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Versicolores</i>					40					
<i>Cladosporium</i> spp.				20	10	20	30	40	10	
<i>Fusarium</i> spp.	80	70	20			20		20		
<b>Kvasci</b>	20	20	10	40	60	30	30	50	20	
<i>Penicillium</i> spp.	80	100	90	50	60	100	50	50	50	
<i>Phoma</i> spp.							10			
<i>Wallemia</i> spp.	20	30		10						10

U tablici 2. prikazana je učestalost (%) pojavljivanja različitih rodova i vrsta plijesni na uzorcima kukuruza, ječma i pšenice. Uzorci su uzeti s područja sjeverne, istočne i središnje Hrvatske, a DRBC hranjiva podloga je korištena za njihov rast. Detektirane su plijesni iz 11 različitih rodova, među kojima su najdominantnije plijesni roda *Penicillium* spp, zatim kvasci i plijesni roda *Fusarium* spp.

Na najviše uzoraka kukuruza s područja sjeverne Hrvatske se javljaju plijesni iz roda *Fusarium* (80%) i *Penicillium* (70%). Na dva uzorka pronađeni su kvasci (20%), a plijesan iz roda *Alternarium* porasla je na jednom uzorku (10%).

Na kukuruзу iz istočne Hrvatske dominiraju plijesni iz roda *Penicillium* (90%) i *Fusarium* (80%). Plijesan roda *Aspergillus* pronađena je na tri uzorka (30%), a najmanje su zastupljene plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Nigri*, kvasci i *Mucor* koje su porasle na jednom uzorku (10%).

Dominantne plijesni na kukuruзу iz područja središnje Hrvatske su one iz roda *Penicillium* (90%). Nakon njih slijede plijesni iz roda *Fusarium* (60%), dok nešto manju učestalost pokazuju plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* i kvasci (oboje 30%). Najmanje je onih iz rodova *Aspergillus* spp., *Mucor* i *Trichoderma* koji se javljaju na jednom uzorku (10%).

U uzorcima ječma iz sjeverne Hrvatske dominiraju plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (70%), a zatim slijede *Penicillium* (60%) i kvasci (50%). Najmanju pojavnost bilježe plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Nigri*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor* i *Wallemia* (10%).

U istočnoj Hrvatskoj, na uzorcima ječma, najviše su zastupljene plijesni roda *Penicillium* (50%), kvasci (50%) i *Aspergillus* sekcije *Versicolores* (40%). Plijesan roda *Aspergillus* sekcije *Flavi* pronađena je na tri uzorka (30%). Najmanje ima onih iz roda *Acremonium*, *Alternarium*, *Cladosporium* i *Mucor* (10%).

U prikupljenim uzorcima ječma na području središnje Hrvatske dominiraju plijesni roda *Penicillium* (90%) i kvasci (80%). Na nešto manjem broju uzoraka pronađene su plijesni roda *Alternarium* (50%), *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (40%) i *Cladosporium* (30%). Na dva uzorka su porasle plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Nigri* (20%), a na jednom uzorku plijesni iz rodova *Acremonium*, *Aspergillus* sekcije *Flavi*, *Fusarium* i *Mucor* (10%).

Plijesni roda *Penicillium* (60%) i kvasci (50%) pokazali su se kao najučestalije na uzorcima pšenice s područja istočne Hrvatske. Nakon njih slijede plijesni iz roda *Cladosporium* (30%)

koje su pronađene na tri uzorka. Na jednom uzorku došlo je do porasta plijesni iz roda *Phoma* (10%).

Iz uzoraka pšenice s području istočne Hrvatske najveću pojavnost bilježe plijesni iz roda *Cladosporium* i kvasci (oboje 40%), a zatim *Alternarium* (30%). Na dva uzorka su pronađene plijesni roda *Fusarium* i *Penicillium* (oboje 20%). Najmanje je onih iz roda *Aspergillus* sekcije *Nigri* (10%).

U uzorcima pšenice iz središnje Hrvatske dominiraju plijesni iz roda *Penicillium* (80%), a zatim kvasci (60%). Plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (30%) su pronađena na tri uzorka. Najmanje zastupljene plijesni su one iz roda *Alternarium*, *Cladosporium* i *Fusarium* (10%).

**Tablica 2.** Učestalost plijesni (%) poraslih na DRBC agaru iz kukuruza, ječma i pšenice na području sjeverne (SJH), istočne (ISH) i središnje (SRH) Hrvatske.

Gljivice	Kukuruz			Ječam			Pšenica			
	DRBC	SJH	ISH	SRH	SJH	ISH	SRH	SJH	ISH	SRH
<i>Acremonium</i> spp.					10	10				
<i>Alternarium</i> spp.	10				10	50		30	10	
<i>Aspergillus</i> spp.		30	10							
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Aspergillus</i>			30	70		40				30
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Flavi</i>					30	10				
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Nigri</i>		10		10		20		10		
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Versicolores</i>					40					
<i>Cladosporium</i> spp.				10	10	30	30	40	10	
<i>Fusarium</i> spp.	80	80	60	10		10		20	10	
<b>Kvasci</b>	20	10	30	50	50	80	50	40	60	
<i>Mucor</i> spp.		10	10	10	10	10				
<i>Penicillium</i> spp.	70	90	90	60	50	90	60	20	80	
<i>Phoma</i> spp.							10			
<i>Trichoderma</i> spp.			10							
<i>Wallemia</i> spp.				10						

## 5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su razlike u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu plijesni s obzirom na lokacije uzorkovanja. Područja uzorkovanja bili su sjeverna, istočna i središnja Hrvatska. Obradeni uzorci su kukuruz, ječam i pšenica koji su prikupljeni iz skladišta u ožujku 2021. godine.

Ukupno gledajući, najveći porast plijesni, uključujući sve tri lokacije i sve tri žitarice, dogodio se na uzorcima kukuruza s područja središnje Hrvatske. Takav značajniji porast zabilježen je i na DRBC i na DG-18 podlozi. Kukuruz se pokazao posebno pogodan za razvoj plijesni roda *Fusarium*, kao i roda *Penicillium*. Takav značajniji porast plijesni na kukuruzu može se dovesti u vezu s uvjetima tijekom uzgoja kukuruza, odnosno neprikladim uvjetima njegove pohrane. Istraživanje "Collection of occurrence data of *Fusarium* toksin in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States" (2003) je pokazalo da je u svijetu kukuruz na prvom mjestu među kultiviranim biljkama koje su pogodno stanište za plijesni *Fusarium* vrste. Dobro stanište su i pšenica, raž i zob. Zabrinutost je posebno izražena zbog činjenice da ljudi kukuruz i pšenicu koriste u svakodnevnoj prehrani (Katalenić, 2004).

Prema članku 71. Pravilnika o kakvoći stočne hrane, najveći broj kvasaca i plijesni u 1 gramu krmiva biljnog podrijetla iznosi 200000 uz dopušteno odstupanje od 15%. Prema ovom članku, uzorci ječma i pšenice su ispunili zahtjeve, ali se niti jedan uzorak kukuruza nije pokazao ispravnim.

Uzorci žitarica uzgajali su se na dvije vrste podloge, DG-18 i DRBC podloge. Dikloran glicerol (DG-18) je podloga s nižim aktivitetom vode ( $a_w \leq 0,95$ ), a koristi se za prebrojavanje osmofilnih kvasaca i kserofilnih plijesni. S druge strane, DRBC je podloga visokog aktiviteta vode ( $a_w > 0,95$ ) i pogodna je za razvoj plijesni iz svježe hrane.

Od plijesni uzgajanih na DG-18 podlozi najveći porast pokazuje plijesan iz roda *Penicillium* koji pokazuju porast na svim uzorcima žitarica iz sva tri područja, s tim da se pojavljuju na svim uzorcima kukuruza iz istočne Hrvatske, kao i na svim uzorcima ječma iz središnje Hrvatske (100%).

Sljedeći po učestalosti porasta na DG-18 podlozi su plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* koji se pojavljuju na 9 lokacija, a najviše na ječmu u središnjoj Hrvatskoj (90%) i na kukuruzu u središnjoj Hrvatskoj (80%).

Plijesni roda *Fusarium* prevladavaju pretežno na kukuruzu i to u sjevernoj Hrvatskoj (80%).

Plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Flavi*, poznate zbog produkcije izrazito toksičnih aflatoksina B1, pojavljuje se na jednom uzorku kukuruza iz istočne Hrvatske, jednom uzorku ječma iz sjeverne i istočne Hrvatske kao i na dva uzorka ječma iz središnje Hrvatske.

I u slučaju DRBC podloge plijesni roda *Penicillium* pokazale su se kao najučestalije. Pojavljuju se na sve tri lokacije i na svim žitaricama, a najviše na uzorku kukuruza u istočnoj i središnjoj Hrvatskoj (90%), kao i na ječmu s područja središnje Hrvatske (90%). Kvasci se također pojavljuju na svim lokacijama, a najviše na ječmu iz središnje Hrvatske (80%). Plijesni roda *Fusarium* su pretežno rasprostranjeni na uzorcima kukuruza i to u sjevernoj i istočnoj Hrvatskoj (80%).

Plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Flavi* na DRBC podlozi bilježe porast na tri uzorka ječma iz istočne Hrvatske, kao i jednom uzorku ječma iz središnje Hrvatske.

Rezultati pokazuju kako su uzorci pretežno kontaminirani plijesnima iz skladišta (rodovi *Penicillium* i *Aspergillus*), ali i plijesnima roda *Fusarium* koji spadaju u plijesni polja i rastu pretežno na kukuruzu.

Plijesni polja napadaju zrnje ratarskih kultura dok su još u polju i zriobi pa im je potrebna velika količina vlage. Primjerice, plijesni roda *Fusarium* prisutne su s velikim intenzitetom za vrijeme toplih godina s većom količinom vlage, uz veliku količinu oborina, jer se šire kroz makrokonidije koje se kišnim kapima prenose u gornje biljne organe. Nakon kiše te strukture izbacuju askospore koje se s vjetrom prenose izravno na glavice. Infekcija glavice i zrna nastaje kada temperatura tijekom cvatnje prelazi 20 °C i vlažnost je veća od 85-90% najmanje 24-40 sati (Kotowicz i sur., 2014). Infekcija se može pojaviti u različitim fazama rasta, cvatnje, berbe te žetve.

Prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda odstupanja srednje temperature zraka u 2020. godini u odnosu na normalu 1981. – 2010. nalaze se u rasponu od 0,7 °C (Karlovac, Makarska, Komiža) do 1,6 °C (Puntijarka). Na svim postajama temperatura zraka bila je viša od višegodišnjeg prosjeka. Oborinske prilike u 2020. godine bile su normalne na većem dijelu teritorija, s tim da su u listopadu, kada obično traje berba žitarica, bile iznad višegodišnjeg prosjeka. Na području istočne Hrvatske prevladavale su kišne vremenske prilike dok su na području sjeverne i središnje Hrvatske vladali vrlo kišni uvjeti. Kišni uvjeti neposredno prije berbe pogoduju razvoju plijesni.

Za prevenciju kontaminacije nužno je razumjeti optimalne i granične uvjete temperature i relativne vlage za rast i proizvodnju mikotoksina, posebno kod ključnih vrsta plijesni (*Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*). Temeljem tih podataka potrebno je provesti sušenje i skladištenje sirovina i gotovih namirnica pod uvjetima koji ne dopuštaju kolonizaciju (Pleadin i sur., 2018).

Žitarice treba sušiti na način da razina vlage bude niža od razine potrebne za rast plijesni tijekom skladištenja. Aktivitet vode manji od 0,65 uglavnom odgovara sadržaju vlage manjem od 15 %, što je značajno u prevenciji rasta brojnih vrsta plijesni koje mogu biti prisutne u svježem žitu. Često samo mala promjena u udjelu vlage (< 0,5 %) može dovesti do kontaminacije namirnica mikotoksinima iznad najvećih dopuštenih količina (Sanchis i Magan, 2004).

Prilikom sušenja treba izbjegavati radnje kojima se oštećuje zrno žitarica. Najvažnije je da razdoblje tijekom kojeg se mokro, svježe požnjeto žito čuva na gomili prije sušenja ili čišćenja bude što je moguće kraće, kako bi se smanjio rizik od rasta plijesni. Mnogi prehrambeni proizvodi su higroskopni i lako apsorbiraju vodu, čime je omogućen rast toksikotvornih plijesni te kontaminacija mikotoksinima. Stoga je potrebno osigurati čistu i suhu ambalažu, spriječiti mogućnost prisustva insekata te kroz skladišni prostor osigurati strujanje zraka kako bi se održala odgovarajuća i stalna razina temperature (Pleadin i sur., 2020).

Također, primjena kemijskih metoda nema praktičnu primjenu u uklanjanju mikotoksina budući uglavnom imaju negativan utjecaj na nutritivna i funkcionalna svojstva proizvoda. Stoga je primjena ovih metoda dozvoljena isključivo u svrhu uklanjanja AFB1 iz krmiva (Pleadin i sur., 2018).

Iz aspekta klimatskih promjena, poznato je da prilikom izgaranja fosilnih goriva u industrijama dolazi do emisije ugljičnog dioksida i da je njegovo uklanjanje iz atmosfere smanjeno zbog sve manjih površina prekrivenih šumama kao najznačajnijim potrošačima ugljičnog dioksida. Povećana koncentracija ovog stakleničkog plina u atmosferi uzrokuju povećanu apsorpciju topline, što dovodi do promjena temperature zraka, količine oborina i ostalih klimatoloških elemenata. Uvažavajući navedene činjenice nužno je prevenciju kontaminacije mikotoksinima sagledati i u smjeru globalnog smanjenja proizvodnje ugljičnog dioksida, odnosno općenito smanjenja zagađenja okoliša.

Kontaminacija hrane mikotoksinima trenutno uzrokuje velike troškove diljem svijeta, a trošak će se gotovo sigurno povećavati sa sve intenzivnijim klimatskim promjenama. Stoga bi izrada „prediktivnih modela“ omogućila kratkotrajno i dugoročno planiranje kontrole mikotoksina i

rukovanje žitaricama kojom bi se osigurala ekonomska održivost, kao i sigurna opskrba hranom za ljude i životinje. Definirana su četiri glavna područja istraživanja koja su potrebna kako bi se dobili korisni podaci o budućem utjecaju klimatskih promjena na rizik od mikotoksina (Wu i sur., 2011): (1) koristiti raspoložive simulacije budućih klimatskih scenarija na regionalnoj razini; (2) koristiti već postojeće podatke te provesti dodatna istraživanja s ciljem prikupljanja podataka o tome kako klimatski uvjeti u budućnosti mogu utjecati na pojavnost različitih vrsta plijesni i koncentraciju mikotoksina; (3) razviti modele koji predviđaju razine najznačajnijih mikotoksina, aflatoksina, fumonisina i DON-a, primarno u kukuruzu, ali i ostalim žitaricama, uzimajući u obzir buduće klimatske scenarije; (4) provesti istraživanja o utjecaju klimatskih promjena na sigurnost hrane u bližoj i daljoj budućnosti, u smislu ekonomskih i zdravstvenih rizika povezanih s mikotoksinima. Primarno je istražiti najznačajnije vrste plijesni producenata mikotoksina iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*.



## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja dolazi se do sljedećih zaključaka:

- Najveća koncentracija plijesni zabilježena je na kukuruзу s područja središnje Hrvatske ( $1,07 \times 10^7$  CFU/g na DG-18 hranjivoj podlozi i  $9,1 \times 10^6$  CFU/g na DRBC hranjivoj podlozi)
- Rezultati pokazuju kako su uzorci dominantno kontaminirani plijesnima iz skladišta (rodovi *Penicillium* i *Aspergillus*), ali i plijesnima roda *Fusarium* koji spadaju u plijesni polja i koji najviše pokazuju porast na kukuruзу
- Plijesni roda *Penicillium* pokazale su se kao najučestalije; bile su zastupljene na svim uzorcima kukuruза iz istočne Hrvatske, kao i na svim uzorcima ječma iz središnje Hrvatske (100%, DG-18). Kod DRBC hranjive podloge, plijesni roda *Penicillium* također dominiraju na uzorcima kukuruза iz istočne i središnje Hrvatske (90%), kao i na ječmu s područja središnje Hrvatske (90%)
- Plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* druge su po učestalosti porasta na DG-18 hranjivoj podlozi. Izolirane su najviše iz ječma (90%) i kukuruза (80%) iz središnje Hrvatske
- Plijesni roda *Fusarium* prevladavaju na kukuruзу. U sjevernoj Hrvatskoj pojavile su se u 80% uzoraka na obje hranjive podloge, a isto tako i u istočnoj Hrvatskoj (80%, na DRBC)
- Za sprječavanje kontaminacije žitarica s plijesnima bitno je osigurati dobre uvjete u skladištima. Žitarice je potrebno sušiti na način da razina vlage bude ispod razine pogodne za razvoj plijesni ( $a_w \leq 0,65$ ), potrebno je spriječiti prisustvo insekata koji bi oštetili zrno i važno je omogućiti adekvatno strujanje zraka

## 7. LITERATURA

Abramson D. Mycotoxin formation and environmental factors. U: Mycotoxins in Agriculture and Food safety. Sinha, KK, Bhatnagar D, urednici, New York, Marcel Dekker, 1998, str. 255-277.

Amézqueta S, González-Penas E, Murillo-Arbizu M, de Cerain AL. Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control*, 2009, 20, 326-333.

Bacon CW, Nelson PE. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *J Food Prot*, 1994, 57, 514-521.

Battilani P, Toscano P, Van der Fels-Klerx HJ, Moretti H, Camardo Leggieri M, Brera C, Rortais A, Goumperis T, Robinson T. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci Rep*, 2016, 6, 1-7.

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16, 497-516.

Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J. Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Commodities Feeds and Feed Ingredients. *Anim Feed Sci Technol*, 2007, 137, 265-282.

Cvaliere C, Foglia P, Patorini E, Samperi R, Lagana A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. *J Chromatogr A*, 2006, 1101, 69-78.

Creepy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol*, 2002, 127, 19-28.

Delaš F. Mikrobni toksini. U: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani. Hengl B, urednica, Osijek, Hrvatska agencija za hranu, 2010, str. 31-49.

Doohan FM, Brennan J, Cooke BM. Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals. *Eur J Plant Pathol*, 2003, 109, 755-768.

Državni hidrometeorološki zavod, 2020., <https://www.meteo.hr>, pristupljeno 06. 03. 2022.

EFSA (European Food Safety Authority), Maggiore A, Afonso A, Barrucci F, De Santis G. Climate change as a driver of emerging risks for food and feed safety, plant, animal health and nutritional quality. *EFSA support publ*, 2020, 17, 1-146.

Giorni P, Magan N, Pietri A, Bertuzzi T, Battilani P. Studies on *Aspergillus* Section *Flavi* isolated in northern Italy from maize. *Int J Food Microbiol*, 2007, 113, 330–338.

Hussein SH, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 2001, 167, 101-134.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl*, 1993, 56, 397-521.

IPCC (The Intergovernmental Panel on Climate Change). Intergovernmental panel on climate change report. *Climate Change 2007: Synthesis Report*, 2007, 26-73.

Kanižai Šarić G, Milaković Z, Krstanović V. Toksičnost Fusarium toksina. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 2011, 6, 112-116.

Katalenić, M. Toksini *Fusarium* plijesni i drugi toksini, 1.dio. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 2004, 6, 31-35.

Kiš M, Pleadin J. T-2 i HT-2 toksini u hrani i hrani za životinje: Pojavnost, toksičnost i mjere prevencije i dekontaminacije. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 2018, 13, 12-18.

Kotowicz NK, Frac M, Lipiec J. The Importance of Fusarium Fungi in Wheat Cultivation – Pathogenicity and Mycotoxins Production: A Review. *J Anim Plant Sci*, 2014, 21, 3326- 3343.

Kovačić S, Pepeljnjak S, Pertinec Z, Šegvić Klarić M. Fumonisin B1 neurotoxicity in young carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arh Hig Rada Toksikol*, 2009, 60, 419-426.

Li Y, Wang Z, Beier RC, Shen, J, De Smet D, De Saeger S, Zhang S. T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. *J Agric Food Chem*, 2011, 59, 3441-3453.

Magan N, Medina A, Aldred D. Possible climate-change effects on mycotoxincontamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathol*, 2011, 60, 150–163.

Miraglia M, Marvin HJP, Kleter GA, Battilani P, Brera C, Coni E. Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47, 1009–1021.

Northold MD, Bullerman LB. Prevention of mould growth and toxin production through control of environmental conditions. *J Food Prot*, 1982, 45, 519-526.

Ožegović L, Pepeljnjak S. Mikotoksikoze. Zagreb, Školska knjiga, 1995, str. 100.

Paterson RRM i Lima N. Further mycotoxin effects from climate change. *Food Res Int*, 2011, 44, 2555–2566.

Paterson RRM, Lima N. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res Int*, 2010, 43, 1092-1914.

Pepeljnjak S, Cvetnić Z, Šegvić Klarić M. Okratoksin A i zearalenon: kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi, *Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme*, 2008, 50, 147-159.

Peraica M, Domijan AM. Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2001, 52, 23-35.

Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoksins in humans. *Bull World Health Organ*, 1999, 77, 754 -766.

Perrone G, Ferrara M, Medina A, Pascale M, Magan N. Toxigenic Fungi and Mycotoxins in a Climate Change Scenario: Ecology, Genomics, Distribution, Prediction and Prevention of the Risk. *Microorganisms*, 2020, 8, 1-20.

Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YC. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by DON and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol Lett*, 2004, 153, 61–73.

Pitt JI, Basilico JC, Abarca ML, Lopez C. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol*, 2000, 38, 41–46.

Pleadin J , Kiš M , Frece J , Markov K. Primjena fizikalnih i kemijskih metoda u uklanjanju mikotoksina iz hrane i hrane za životinje. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 2018, 13, 24-31.

Pleadin J, Vulić A, Perši N, Škrivanko M, Capek B, Cvetnić Ž. Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control* , 2014, 40, 286–291.

Pleadin J, Vulić A, Perši N, Škrivanko M, Capek B, Cvetnić Ž. Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control* , 2015, 47, 221–225.

Pleadin J, Zadavec M, Lešić T, Frece J, Vasilj V, Markov K. Klimatske promjene - Potencijalna prijetnja još znatnijoj pojavnosti mikotoksina. *Vet stanica*, 2020, 51, 659-671.

Pravilnik o kakvoći stočne hrane, 1998, Zagreb, Narodne novine, broj 26 (NN/26/98).

Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and Indoor Fungi. 2010, CBS Laboratory Manual Series.

Sanchis V, Magan N. Environmental conditions affecting mycotoxins. U: *Mycotoxins in Food*, Magan N, Olsen M, urednici, Cambridge, Woodhead Publishing Limited, 2004, str. 174-189.

Schlatter J. Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicol Lett*, 2004, 153, 83–89.

Schmidt-Heydt M, Parra R, Geisen R, Magan N. Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. *J R Soc Interface*, 2011, 8, 117-126.

Surai PF, Mezes M, Melnichuk SD, Fotina TI. Mycotoxins and animal health: From oxidative stress to gene expression. *Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme*, 2008, 50, 35-43.

Sweeney MJ, Dobson ADW. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol*, 1998, 43, 141-158.

Tirado MC, Clarke R, Jaykus LA, McQuatters-Gollop A, Frank JM. Climate change and food safety: A review. *Food Res Int*, 2010, 43, 1745–1765.

Valpotić H, Šerman V. Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost preživača. *Krmiva*, 2006, 48, 33-42.

Van Der Fels-Klerx HJ, Kandhai MC, Brynestad S, Dreyer M, Börjesson, Martins HM. Development of a European system for identification of emerging mycotoxins in wheat supply chains. *World Mycotoxin J*, 2009, 2, 119–127.

Van Der Fels-Klerx HJ, Liu C, Battilani P. Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. *World Mycotoxin J*, 2016, 9, 717-726.

Varga J, Kevei E, Rinyu E, Teren J, Kozakiewicz Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62, 4451-4464.

Wogan G. Aflatoxin as a human carcinogen. *Hepatology*, 1999, 30, 573-575.

Wu F, Bhatnager D, Bui-Klimke T, Carbone I, Hellmich RL, Munkvold GP, Paul P, Payne G, Takle ES. Climate change impacts on mycotoxin risks in US maize. *World Mycotoxin J*, 2011, 4, 79-93.



## 8. SAŽETAK/SUMMARY

### SAŽETAK

Znanstvenici posljednjih desetljeća ukazuju na sve izraženije klimatske promjene. Povećane razine ugljikovog dioksida, povišenje temperature na globalnoj razini i velike količine oborina imaju utjecaj na pojavu novih vrsta plijesni koje proizvode mikotoksine, kao i na povećanu kontaminaciju usjeva. Razvoj preventivnih modela za sprječavanje kontaminacije plijesnima bitni su iz gospodarskog, ali i zdravstvenog aspekta.

Prikupljeni su uzorci kukuruza, pšenice i ječma iz skladišta sjeverne, istočne i središnje Hrvatske na proljeće 2021. godine. Analizom koncentracije plijesni utvrđen je statistički značajan porast srednje vrijednosti koncentracija na uzorcima kukuruza i to s područja središnje Hrvatske ( $1,07 \times 10^7$  CFU/g na DG-18 podlozi i  $9,1 \times 10^6$  CFU/g na DRBC podlozi).

Plijesni s najučestalijom pojavom su one iz roda *Penicillium*, *Aspergillus* sekcija *Aspergillus* i rod *Fusarium* (koji prevladava na kukuruzu). Također, na nekoliko uzoraka se pojavljuju plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Flavi* koje su poznate po produkciji izrazito toksičnih aflatoksina.

Kako bi se spriječila kontaminacija u skladištima, potrebno je osigurati dobru proizvođačku praksu (GMP). Žitarice je potrebno sušiti na način da razina vlage bude ispod razine pogodne za razvoj plijesni ( $a_w \leq 0,65$ ), potrebno je spriječiti prisustvo insekata koji bi oštetili zrno i važno je omogućiti adekvatno strujanje zraka.

Važno je na globalnoj razini smanjiti emisiju stakleničkih plinova kako bi se ublažile sve izraženije klimatske promjene koje nepogodno mogu utjecati na razvoj plijesni.

## SUMMARY

In the last decades scientists have been warning about negative effects of climate change. Increased carbon dioxide levels, rising global temperature and high rainfall have caused the appearance of the new types of molds which produce mycotoxin. Also, it has caused increased crop contamination. It is important to develop the models for the prevention of mold contamination in order to avoid negative impact on the economy and health.

Samples of corn, wheat and barley were collected from warehouses in northern, eastern and central Croatia in the spring of 2021. The analysis of mold concentration have showed statistically significant increase in the average concentration on maize from the area of central Croatia ( $1,07 \times 10^7$  CFU/g on DG-18 agar and  $9,1 \times 10^6$  CFU/g on DRBC agar).

The most frequently detected genera included *Penicillium*, *Aspergillus* section *Aspergillus* and the genera *Fusarium* (dominant on the maize). Also, there were molds of the genera *Aspergillus* section *Flavi* on several samples which are known for the production of extremely toxic aflatoxins.

Good manufacturing practice (GMP) plays an important role in prevention of growth of the molds in storages. It is important for the crop to be dried on low humidity level ( $a_w \leq 0,65$ ). Also, it is important to prevent damage of the crops by insects and to ensure adequate airflow in warehouses.

Finally, efforts must be strengthened to ensure effective control of greenhouse gas emissions, otherwise it could lead to increase of climate change which has bad influence on mold growth.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za Mikrobiologiju  
Shrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## UTJECAJ KLIMATSKIH PROMJENA NA POJAVNOST PLIJESNI NA ŽITARICAMA

Katarina Zvone

### SAŽETAK

Znanstvenici posljednjih desetljeća ukazuju na sve izraženije klimatske promjene. Povećane razine ugljikovog dioksida, povišenje temperature na globalnoj razini i velike količine oborina imaju utjecaj na pojavu novih vrsta plijesni koje proizvode mikotoksine, kao i na povećanu kontaminaciju usjeva. Razvoj preventivnih modela za sprječavanje kontaminacije plijesnima bitni su iz gospodarskog, ali i zdravstvenog aspekta.

Prikupljeni su uzorci kukuruza, pšenice i ječma iz skladišta sjeverne, istočne i središnje Hrvatske na proljeće 2021. godine. Analizom koncentracije plijesni utvrđen je statistički značajan porast srednje vrijednosti koncentracija na uzorcima kukuruza i to s područja središnje Hrvatske ( $1,07 \times 10^7$  CFU/g na DG-18 podlozi i  $9,1 \times 10^6$  CFU/g na DRBC podlozi).

Plijesni s najučestalijom pojavom su one iz roda *Penicillium*, *Aspergillus* sekcija *Aspergillus* i rod *Fusarium* (koji prevladava na kukuruzu). Također, na nekoliko uzoraka se pojavljuju plijesni iz roda *Aspergillus* sekcije *Flavi* koje su poznate po produkciji izrazito toksičnih aflatoksina.

Kako bi se spriječila kontaminacija u skladištima, potrebno je osigurati dobru proizvođačku praksu (GMP). Žitarice je potrebno sušiti na način da razina vlage bude ispod razine pogodne za razvoj plijesni ( $a_w \leq 0,65$ ), potrebno je spriječiti prisustvo insekata koji bi oštetili zrno i važno je omogućiti adekvatno strujanje zraka.

Važno je na globalnoj razini smanjiti emisiju stakleničkih plinova kako bi se ublažile sve izraženije klimatske promjene koje nepogodno mogu utjecati na razvoj plijesni.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 40 stranica, 8 grafičkih prikaza, 2 tablice, 52 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: klimatske promjene, plijesni na žitaricama, mikotoksini, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr.sc. Daniela Jakšić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr.sc. Ana-Marija Domijan**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 24. ožujka 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Microbiology  
Šrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

### THE IMPACT OF CLIMATE CHANGE ON MOLD CONTAMINATION OF CEREAL CROPS

**Katarina Zvone**

#### SUMMARY

In the last decades scientists have been warning about negative effects of climate change. Increased carbon dioxide levels, rising global temperature and high rainfall have caused the appearance of the new types of molds which produce mycotoxin. Also, it has caused increased crop contamination. It is important to develop the models for the prevention of mold contamination in order to avoid negative impact on the economy and health.

Samples of corn, wheat and barley were collected from warehouses in northern, eastern and central Croatia in the spring of 2021. The analysis of mold concentration have showed statistically significant increase in the average concentration on maize from the area of central Croatia ( $1,07 \times 10^7$  CFU/g on DG-18 agar and  $9,1 \times 10^6$  CFU/g on DRBC agar).

The most frequently detected genera included *Penicillium*, *Aspergillus* section *Aspergillus* and the genera *Fusarium* (dominant on the maize). Also, there were molds of the genera *Aspergillus* section *Flavi* on several samples which are known for the production of extremely toxic aflatoxins.

Good manufacturing practice (GMP) plays an important role in prevention of growth of the molds in storages. It is important for the crop to be dried on low humidity level ( $a_w \leq 0,65$ ). Also, it is important to prevent damage of the crops by insects and to ensure adequate airflow in warehouses.

Finally, efforts must be strengthened to ensure effective control of greenhouse gas emissions, otherwise it could lead to increase of climate change which has bad influence on mold growth.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 40 pages, 8 figures, 2 tables, 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: climate change, molds on the cereals, mycotoxins, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*

Mentor: **Maja Šegvić Klarić**, Ph.D., Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić**, Ph.D., Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Daniela Jakšić**, Ph.D., Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Marija Domijan**, Ph.D., Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: 24. March 2022.