Bioraznolikost plijesni u žitaricama nakon poplave

Komac, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:192251

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ivana Komac

Bioraznolikost plijesni u žitaricama nakon poplave

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018. godina.

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 te je dio znanstveno-istraživačkog projekta (MycotoxA IP-09-2014-5982) kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ).

Zahvaljujem se prije svega prof. dr. sc Maji Šegvić Klarić, koja me stručno i strpljivo vodila kroz sve korake izrade ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem dr. sc. Danieli Jakšić, kao i svim ostalim članovima Zavoda, na uloženom vremenu i trudu, te ugodnoj radnoj atmosferi.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Pozadina katastrofe	1
1.2. Mikrobiološko kvarenje hrane	1
1.3. Mikotoksini u žitaricama	2
1.4. Uvjeti razvoja plijesni	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Materijali	8
3.1.1. Hranjive podloge	8
3.1.2. Uređaji	9
3.2. Metoda	9
3.2.1. Uzorkovanje	9
3.2.2. Mikološka analiza	9
3.2.3. Statistička obrada	10
4. REZULTATI	11
5. RASPRAVA	18
6. ZAKLJUČCI	21
7. LITERATURA	22
8. SAŽETAK/SUMMARY	27
Temeljna dokumentacijska kartica	29
Basic documentation card	30

1. UVOD

1.1. POZADINA KATASTROFE

U svibnju 2014. godine, fronta vezana uz ciklonu nad Sjevernim morem donijela je hladan zrak na područja Italije, Slovenije i Hrvatske. Najavljene su obilne oborine, snažni udari vjetra, te mogućnost tuče i pijavica. Do večeri 12. svibnja, frontalni sustav ciklone premjestio se od područja Alpa nad sjevernu Italiju, a nastali sekundarni ciklonalni centar nazvan je Donat.

Premještajući se prema istoku Hrvatske, ciklona Donat danima je uzrokovala rušenje rekorda u količinama oborina. Čak 91 litra kiše po četvornom metru pala je na područje Kutjeva u samo 24 sata. Pošteđena nije bila ni Bosna i Hercegovina, što je dodatno pogoršavalo oborinama opterećeni protok rijeka. Dotadašnji najveći izmjereni vodostaj Save na području Rajevog Sela iznosio je 690 cm, a u subotu 17. svibnja porastao je na čak 1173 cm (www.klima.hr). Došlo je do puknuća brane na dva mjesta, u selu Račinovci i u samom centru Rajevog Sela. Poplavljeno je više od 3000 hektara površine općine Gunja (www.crometeo.hr). Voda se krenula sporo povlačiti tek nakon tjedan dana, što je stvorilo idealne uvjete za razvoj mikroorganizama.

1.2. MIKROBIOLOŠKO KVARENJE HRANE

Hrana privlači razne vrste mikroorganizama, koji nakon uspješne kolonizacije mijenjaju nutritivna svojstva namirnice – od same hranjive vrijednosti, do strukture, boje i okusa. Utjecaj može biti pozitivan, no ovaj rad bavi se negativnim - propadanjem hrane uzrokovanim kolonizacijom različitih vrsta plijesni.

Kvarenje hrane uzrokovano plijesnima važno je razumjeti i spriječiti iz nekoliko razloga. Jedan razlog definitivno su ekonomski gubici. Procjenjuje se da se godišnje kao rezultat kvarenja uzrokovanog plijesnima baca 5-10% hrane iz svjetske proizvodnje (Pitt i Hocking, 2009). Drugi razlog je što ono može biti popraćeno nastajanjem sekundarnih toksičnih metabolita – mikotoksina; čije uzimanje može uzrokovati teške zdravstvene posljedice. U narodu je poznata takozvana vatra sv. Antuna ili ergotizam, bolest uzrokovana konzumiranjem raženog brašna kontaminiranog ergot alkaloidima iz gljivice *Claviceps purpurea* (Peraica i sur., 1999). Međutim, puno gore posljedice na opću populaciju uzrokuje kronično unošenje jednog ili više mikotoksina (Stanciu i sur., 2015). U trogodišnjem istraživanju, čak 81% uzoraka hrane prikupljenih diljem svijeta bili su kontaminirani mikotoksinima (Rodrigues i Naehrer, 2012).

Oportunističke gljivice su saprofiti koji rastu u tlu ili na odumrlim ostacima biljaka, a u usjeve ulaze kroz oštećenja na samoj biljci. Iz tog razloga vrlo je važno pažljivo rukovanje usjevima iza sjetve (Dijksterhius i sur., 2013). Hife saprofita luče mnogobrojne, vrlo raznolike egzoenzime ne bi li razgradile stijenke biljnih stanica. Primjerice, za plijesan *Aspergillus niger* zabilježena je sekrecija čak 131 takvog enzima (Prusky, 2007). Djelovanjem enzima na pektin mogu se dogoditi dvije vrste truljenja, suho i vlažno. Celulolitički enzimi uzrokuju suho truljenje kod kojeg se ne razgrađuje pektinska srednja lamela, što znači očuvaniju strukturu tkiva. Ako se pak luče enzimi koji razgrađuju pektin, dolazi do razgradnje poveznica između stanica i gubitka strukture (maceracija) što se naziva vlažno truljenje (Dijksterhius i sur., 2013).

Spore koje se prenose zrakom proizvode veliki broj konidija te mogu lako doći do usjeva koji nisu propisno zaštićeni. Kontaminacija takvim sporama prepoznatljiva je po tome što će se istovremeno razviti više rodova plijesni. Plijesni se mogu razviti i u samim skladišnim prostorima, na što ogroman utjecaj imaju vlaga i temperatura tijekom rasta usjeva (Mannaa i Kim, 2017). Za propadanje žitarica vrlo je značajan red Eurotiales, u koji spadaju rodovi *Aspergillus, Penicillium* i *Paecilomyces*. *Aspergillus* i *Penicillium* najdominantniji su rodovi odgovorni za kvarenje hrane i jedni od najčešćih plijesni prisutnih u zraku. Međutim, postoji razlika između rodova – *Penicillium* bolje uspijeva u umjerenim klimama, za razliku od roda *Aspergillus* kojem odgovaraju toplija, tropska područja (Dijksterhius i sur., 2013).

Više od 5000 konja uginulo je 1934. godine u američkoj državi Illinois nakon što su hranjeni pljesnivim kukuruzom, a novija istraživanja otkrila su kako je glavni krivac rod *Fusarium* i fumonizini (Foreman i sur., 2004). U SAD-u 1972. godine svinje su odbijale jesti kukuruz, za koji je onda dokazano kako je kontaminiran trihotecenom deoksinivalenolom, na koji su svinje posebno osjetljive (Vesonder i sur., 1979). Mnogi su primjeri iz kojih je jasno kako se hrana za stoku nedovoljno analizira na prisutnost mikotoksina. Ni ljudi nisu pošteđeni tragedija uzrokovanih *Fusarium* toksinima – za vrijeme 2. svjetskog rata, tisuće stanovnika Sovjetskog Saveza umrlo je zbog T-2 toksina u žitaricama koje zbog ratnih događanja nisu mogli požnjeti na vrijeme (Levy i Fink, 2004).

1.3. MIKOTOKSINI U ŽITARICAMA

Mikotoksini su kemijski heterogena skupina spojeva male molekularne mase (Mr < 700) i visokog tališta. Oni su sekundarni metaboliti plijesni - nisu esencijalni za rast i razmnožavanje, ali imaju korisnu zaštitnu ulogu protiv drugih mikroorganizama (Katalenić, 2004). Podrijetlo

naziva mikotoksin (grč. mykes-plijesan, toxikon-otrov) dobro opisuje njihov učinak na živa bića. Već u vrlo malim koncentracijama povezuju se s nizom negativnih zdravstvenih posljedica – od endokrine disfunkcije, mutagenosti i karcinogenosti, poremećaja u gastrointestinalnom, urogenitalnom, krvožilnom i živčanom sustavu, pa čak do imunosupresivnog djelovanja, koje smanjuje otpornost na infekcije (Stanciu i sur., 2015). Narušavajući integritet stijenke crijeva, oni olakšavaju prodor toksina i bakterija u organizam (Broom, 2015). Mikotoksini su vrlo stabilni spojevi i često se nađu i u gotovom proizvodu, nakon kompletne obrade (Katalenić, 2004). FAO[1] procjenjuje kako je otprilike 25 % žitarica u svijetu kontaminirano mikotoksinima, iako neki autori tvrde kako je broj bliži 50 %. Osim samih žitarica, čovjek može biti izložen i preko jetre, jaja i mlijeka životinja hranjenih kontaminiranom hranom (Kalenić i sur., 2013). Različite vrste mogu proizvoditi iste mikotoksine, ali se također može dogoditi da jedna vrsta istovremeno proizvodi više mikotoksina (Mašek i Šerman, 2006).

Kukuruz najviše pogoduje razvoju rodova *Aspergillus* i *Fusarium*, na riži su najčešći *Aspergillus* i *Penicillium*, a pšenicu, ječam i zob nastanjuju sva 3 već spomenuta roda - *Aspergillus, Fusarium* i *Penicillium* (Tablica 1.). Vrsta *Fusarium graminearum* odgovorna je za bolest pšenice nazvanu palež klasa koja značajno smanjuje prinose, a također je jedan od najintenzivnijih proizvođača mikotoksina uz vrste *F. culmorum* i *F. avenaceum* (Kotowicz, 2014).

Tablica 1. Najčešće vrste plijesni u različitim vrstama žitarica (Dijksterhius i sur., 2013; Frisvald i sur., 2007).

Kukuruz	*A. flavus, A. niger, A. ochraceus, F. graminearum, F. proliferatum, F. verticillioides, P. citrinum*
Riža	*A. flavus, A. niger, P. citrinum*
Raženi kruh	*A. repens, A. rubrum, P. carneum, P. paneum, P. roqueforti*

[1] Food and Agriculture Organization of the United Nations

Pšenični kruh	*A. flavus, A. repens, A. rubrum*
Pšenica, raž, ječam, zob	*A. tenuissima, A. infectoria, A. flavus, A. parasiticus, F. avenaceum, F. culmorum, F. graminearum, P. aurantiogriseum, P. cyclopium, P. freii, P. melanoconidium, P. polonicum, P. verrucosum*

Rodovi *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium* glavni su proizvođači mikotoksina, ali proizvode ih i rodovi *Cladosporium, Claviceps, Alternaria* i *Helminthosporium* (Oancea i Stoia, 2008). Kontaminacija usjeva mikotoksinima može se dogoditi za vrijeme uzgoja, transporta ili skladištenja; a ljudi mogu biti izloženi oralnim putem, inhalacijom ili dermalno (Kotowicz i sur., 2014; Zain, 2010). Prema FAO, najčešćih pet kategorija mikotoksina u hrani su: deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV), HT-2 i T-2 toksini; zatim aflatoksini; fumonizini; ohratoksini i zearalenon (ZEA). U umjerenim klimama, najčešći su upravo mikotoksini roda *Fusarium* (Šegvić Klarić i sur., 2009). Najvažniji su trihoteceni, fumonizini i zearalenon.

Trihoteceni su male, amfifilne molekule koje pasivnom difuzijom lako prolaze kroz stanične membrane gastrointestinalnog i dišnog sustava, te kroz kožu, a razvoju pogoduju oborine za vrijeme sjetve i vlažna spremišta žitarica (McCormick i sur., 2011). Mehanizam djelovanja nije do kraja razjašnjen, ali zna se da trihoteceni inhibiraju sintezu DNA, RNA i proteina. Općenito, oni koji nemaju makrociklički prsten u strukturi imaju veću ekonomsku važnost za poljoprivrednu proizvodnju (Stanciu i sur., 2015). Dijele se na 4 tipa: A, B, C, i D; ovisno o funkcionalnoj skupini prisutnoj u molekuli - najčešći su tipovi A i B (Yazar i Omurtag, 2008). Djelovanje na biljne stanice primijećeno je već u koncentracijama od 10^{-5}-10^{-6} M (Desjardins i sur., 1993). Kod ljudi, istraživanje koje je provela EFSA[2] (2018) pokazalo je da su najizloženija djeca i to preko pekarskih proizvoda i žitnih pahuljica. Najvažnijim trihotecenom u žitaricama smatra se deoksinivalenol, karcinogen skupine 3, uz kojeg se često pojavi i nivalenol, zatim T-2 i HT-2 (Stanciu i sur., 2015; Zain, 2010; IARC, 1993). Učestalost u pšenici s područja Republike Hrvatske za DON iznosi 65 %, a za T-2 ona je 25 % (Pleadin i sur., 2013).

[2] European Food Safety Authority

Fumonizini su razvrstani u 4 kategorije: A, B, C i P. Njihova apsorpcija u gastrointestinalnom sustavu je slaba (svega 3-6% prema EFSA-i), a slabo je i nakupljanje u tkivima. Mehanizam djelovanja je kompeticija sa sfingozinom u metabolizmu sfingolipida (Kotowicz i sur., 2014). Najčešći fumonizin je FB_1, nefrotoksičan i hepatotoksičan, klasificiran u grupu 2B karcinogena (IARC, 2002). Fumonizini su pronađeni u 27% uzoraka žitarica s područja Republike Hrvatske (Šegvić Klarić i sur., 2009).

Zearalenon se, za razliku od fumonizina, brzo apsorbira u probavnom traktu. (Stanciu i sur., 2013). Glavni negativni učinci uzrokovani su njegovim estrogenim djelovanjem, a svrstan je i u skupinu 3 karcinogena (IARC, 1993). Najčešće se pojavljuje u kukuruzu, ali čest je i u pšenici (IARC, 1993). U Hrvatskoj, on je jedan od najčešćih mikotoksina, pronađen u čak 92% uzoraka žitarica (Šegvić Klarić i sur., 2009).

Prema FAO/WHO[3] združenoj komisiji, PMTDI (Provisonal Maximal Tolerable Daily Intake) za fumonizine, DON, T-2 i ZEA iznosi redom 2 μg, 1 μg, 0,06 μg i 0,5 μg po kg tjelesne težine dnevno.

1.4. UVJETI RAZVOJA PLIJESNI

Plijesnima su za rast i razvoj potrebni odgovarajući uvjeti - svjetlost, dovoljna razina vlažnosti, optimalna temperatura (najčešće između 25˚C i 35˚C), pH, vrsta i koncentracija hranjivih tvari (Kalenić i sur., 2013). Iz tog razloga, brojne metode čuvanja hrane oslanjaju se na stvaranje uvjeta nepogodnih za razvoj plijesni, kao što je primjerice povećanje osmolarnosti dodavanjem visokih koncentracija soli ili šećera. Međutim, razvile su se vrste plijesni koje mogu nadvladati i takve nepovoljne uvjete.

Veliki broj plijesni koje uzrokuju kvarenje hrane ekstremno su osmotolerantne. Neke poput *Debaryomyces hansenii* mogu rasti čak i u koncentracijama natrijevog klorida od 2,5 M. Štoviše, prisutnost natrijevog klorida olakšava preživljavanje u uvjetima visoke temperature i ekstremnog pH (Burke i Jennings, 1990; Prista i sur., 2005). Transporteri locirani u membranama omogućavaju prijenos protona u i izvan stanice, te tako osiguravaju unos i akumulaciju tvari kao što je glicerol koji u citoplazmi osigurava unutarnju osmolarnost i time otpornost na povećanu vanjsku osmolarnost (Gonzalez-Hernandez i sur., 2005). Još jedna važna prilagodba, mogućnost je rasta pri niskoj relativnoj vlažnosti zraka – kao u silosima za

[3] World Health Organization

skladištenje žitarica. Plijesni koje se mogu razviti i pri niskom aktivitetu vode (a_w<0,85), a ponekad im je niski a_w uvjet za razvoj, nazivaju se kserofili. *Eurotium amstelodami* razvija se u silosima kukuruza kod relativne vlažnosti 15-16% (Pitt i Hocking, 2009). Germinacija *Aspergillus* i *Penicillium* rodova - koji se smatraju umjerenim kserofilima - u ječmu je bila viša pri 15% nego 19% vlažnosti (Abramson i sur., 1998). Različiti uvjeti okoliša utječu i na strukturu konidija, potrebnih za kolonizaciju hrane plijesnima. Pokazalo se da pristup vodi ima direktan pozitivan učinak na rast konidija *Aspergillus niger* (Morozova i sur., 2002). Nedostatak vode može zaustaviti procese u stanici, ostavljajući je u dormantnoj amorfnoj fazi. Neki čimbenici poput pH imaju indirektan učinak – preko poticanja razvoja bakterija, do disocijacije organskih kiselina (Dagnas i Membre, 2013). Postoje i spojevi koje luče plijesni, u samoregulaciji rasta konidija. Otpornost askospora na povišenu temperaturu generalno raste s porastom koncentracije šećera u okolnom mediju, a smanjivat će je organske kiseline (Rajashekhara i sur., 1999). Važna je i temperatura. Termotolerantne plijesni poput vrsta *Aspergillus niger* i *A. flavus* mogu rasti u rasponu 8-45˚C. Neke vrste roda *Fusarium* su psihofrilne, pa rastu pri temperaturama oko 0˚C. Pasterizacija je pogodna metoda zbog malog broja plijesni koje preživljavaju takve uvjete. Koriste se i slabe kiseline i njihove soli – no one su aktivne samo u nedisociranom obliku, pa im je djelovanje ovisno o pH. Koriste se i esencijalna ulja, bakterije mliječne kiseline, i etanol. Većina plijesni koje koloniziraju hranu su striktni aerobi, pa im pakiranje u vakuumu onemogućava rast. Neke plijesni poput roda *Fusarium* mogu rasti kod atmosferskog kisika od 0,5%, pa je potrebno koristiti i plin poput ugljičnog dioksida ili dušika (Dagnas i Membre, 2013).

Od mnogobrojnih vrsta plijesni, relativno je malen broj onih koje uzrokuju kvarenje hrane, ali je zato velik dio tih plijesni osmotolerantan, kserofilan, ili općenito otporan na nepovoljne uvjete. Zbog toga je vrlo važno nastaviti istraživati moguće metode zaustavljanja njihovog razvoja.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Osim hranjivih tvari, jedan od najznačajnijih faktora za rast plijesni predstavlja aktivitet vode (a_w) tj. količina slobodne vode u supstratu. Iz tog se razloga nakon poplave očekuje porast različitih vrsta plijesni koje optimalno rastu pri $a_w \leq 0.8$. Također, u razdoblju koje slijedi nakon povlačenja vode mijenja se sastav tla pa tako i mikrobiom poplavljenog područja, a razmnožavanje nekih vrsta kukaca može dodatno utjecati na širenje mikroorganizama. Među plijesnima koje rastu u uvjetima povećane vlažnosti supstrata osobito su učestale vrste roda *Fusarium,* ali može se očekivati i porast kserofilnih vrsta iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium.* Navedeni rodovi su od posebnog javnozdravstvenog značaja zbog mogućnost biosinteze sekundarnih toksičnih metabolita - mikotoksina.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- Odrediti koncentracije plijesni u uzorcima žitarica iz individualnih domaćinstava Gunje (poplavljeno područje) u odnosu na žitarice iz Gornjeg Stupnika (kontrolno područje)
- Na temelju morfoloških i mikromorfoloških obilježja identificirati plijesni porasle na odgovarajućim hranjivim podlogama do razine roda/vrste
- Procijeniti rizik za zdravlje ljudi zbog mogućnosti tvorbe mikotoksina

3. MATERIJALI I METODE

Kultivacija je vrlo važna mikološka metoda kojom možemo izolirati plijesni u kulturi i zatim ih identificirati. Primijenjena metoda je brojanje živih kvasaca i plijesni u proizvodima namijenjenim za ljudsku potrošnju ili hranidbu životinja postupkom brojanja kolonija pri 25˚C.

3.1. MATERIJALI

Korišteni materijali: podloge DG-18 i DRBC, peptonska voda, sterilne tikvice (do 500 mL), Petrijeve zdjelice, tipsevi, epruvete, L-štapići, autoklav, termostatirana tresilica.

3.1.1. HRANJIVE PODLOGE

- Dikloran rose bengal kloramfenikol agar (DRBC; Oxoid, UK) pripremljen je otapanjem 10 g glukoze, 5 g peptona, 1 g monokalijevog fosfata (KH_2PO_4), 0,5 g magnezijevog sulfata heptahidrata ($MgSO_4*7H_2O$), 15 g agara, 2 mg diklorana (0,2% w/v u EtOH, 1 mL), te 100 mg kloramfenikola u 1 L destilirane vode, zagrijavanjem do vrenja. Otopina je sterilizirana autoklaviranjem, 15 min na 121˚C, a zatim je dodano 25 mg rose bengala (5% w/v u H2O, 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 monokalijevog fosfata (KH_2PO_4), 0,5 g magnezijevog sulfata heptahidrata ($MgSO_4*7H_2O$), 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, zagrijavanjem do vrenja. Otopina je sterilizirana autoklaviranjem, 15 min na 121˚C.

- Peptonska voda, engl. Maximum Recovery Diluent-MRD (Biolife, Italija) priređena je otapanjem 1 g kazeina i 8,5 g natrijevog klorida (NaCl) u 1 L destilirane vode, te zagrijavanjem do vrenja. Otopina je sterilizirana autoklaviranjem, 15 min na 121˚C. Nakon sterilizacije dodan je polisorbat 80 (Tween 80; Sigma-Aldrich, Njemačka).

Obrazloženje: ove često korištene hranjive podloge sadrže šećere i kvaščev ekstrakt kao izvor energije za rast plijesni. Podloga DG-18 može se koristiti za izolaciju kserofila iz suhe hrane (*Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*), kvasaca i plijesni iz zraka. Međutim, treba spriječiti razmnožavanje pripadnika reda Mucorales (*Rhizopus spp*., *Mucor spp*.) kojima su obično kontaminirani uzorci, a koji vrlo propulzivno rastu i tako narušavaju rast ostalih prisutnih vrsta. Iz tog se razloga u hranjivu podlogu dodaje rose bengal (RB) i/ili dikloran (2,6-dikloro-4-

nitroanilin. Rose bengal je fotoosjetljiv - izlaganje svjetlosti uzrokuje nastanak toksičnih produkata, pa se podloga koja ga sadrži mora pohraniti na tamnom mjestu. Uzorci su također kontaminirani bakterijama, što može otežati analizu. Zbog toga se u podlogu dodaju antibiotici, najčešće kloramfenikol u neutralnom pH. Kloramfenikol neće uvijek moći sam spriječiti razvoj bakterija, ali se korištenje antibiotika u podlogama pokazalo boljim pristupom od prijašnje metode, gdje se rast bakterija pokušavao zaustaviti kiselijim pH. Takav niži pH štetio je određenim vrstama plijesni (www.hardydiagnostics.com).

Izotoničnost i pH 7 peptonske vode smanjuju fiziološki šok inokulacije na mikroorganizme, pa se ona koristi za razrjeđivanje uzoraka (www.foodsafety.neogen.com).

3.1.2. UREĐAJI

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

Obrazloženje: termostatirana tresilica olakšava raspoređivanje nutrijenata potrebnih za rast mikroba u uzorku, istovremeno održavajući i optimalnu temperaturu.

3.2. METODA

3.2.1. UZORKOVANJE

Uzorci hrane prikupljeni su tijekom rujna 2017. godine, na područjima Gunje, lokacije pogođene poplavom, te Gornjeg Stupnika kao kontrolne lokacije. Na području Gunje prikupljeno je 6, a na području Gornjeg Stupnika 5 uzoraka. Uzorci su prikupljani u plastične vrećice, koje su se do analize čuvale u hladnjaku.

3.2.2. MIKOLOŠKA ANALIZA

Iz prikupljenih uzoraka uzima se po jedan pod-uzorak, koji se grubo melje. Važe se 10 g mljevenog uzorka, te suspendira u 90 mL peptonske vode. Omjer uzorka i peptonske vode mora biti 1:9. Uzorak se potom homogenizira u termostatiranoj tresilici 45 minuta na 25˚C. Nakon homogenizacije, potrebno je pričekati 15 minuta kako bi se talog slegnuo i time je priređena 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 hranjive podloge DRBC i DG-18 nasađuje se 100 µL matične suspenzije i 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:

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

Gdje je:

$\sum C$ – 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

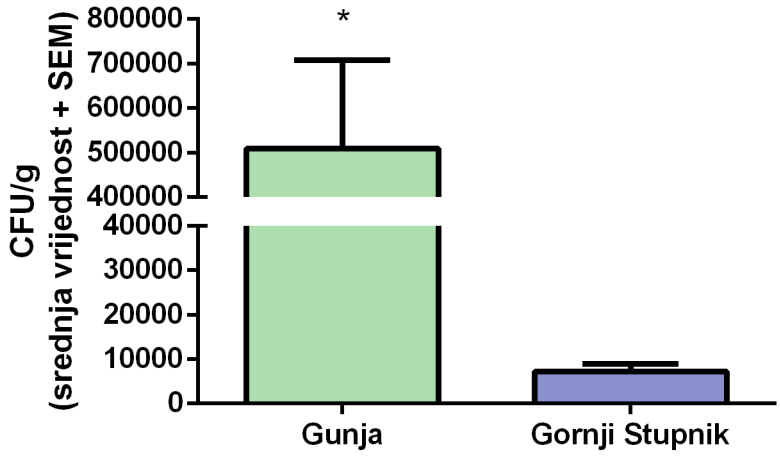
3.2.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati ovog istraživanja prikazani su kao srednja vrijednost (CFU/g) i standardna pogreška aritmetičke sredine (SEM). Uzorci iz Gunje i Gornjeg Stupnika uspoređeni su T-testom. Statistički značajnim rezultatom smatra se dobivena vrijednost $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

Identifikacija vrsta plijesni i njihova koncentracija u različitim vrstama žitarica određena je praćenjem porasta kolonija na hranjivim podlogama DRBC i DG-18.

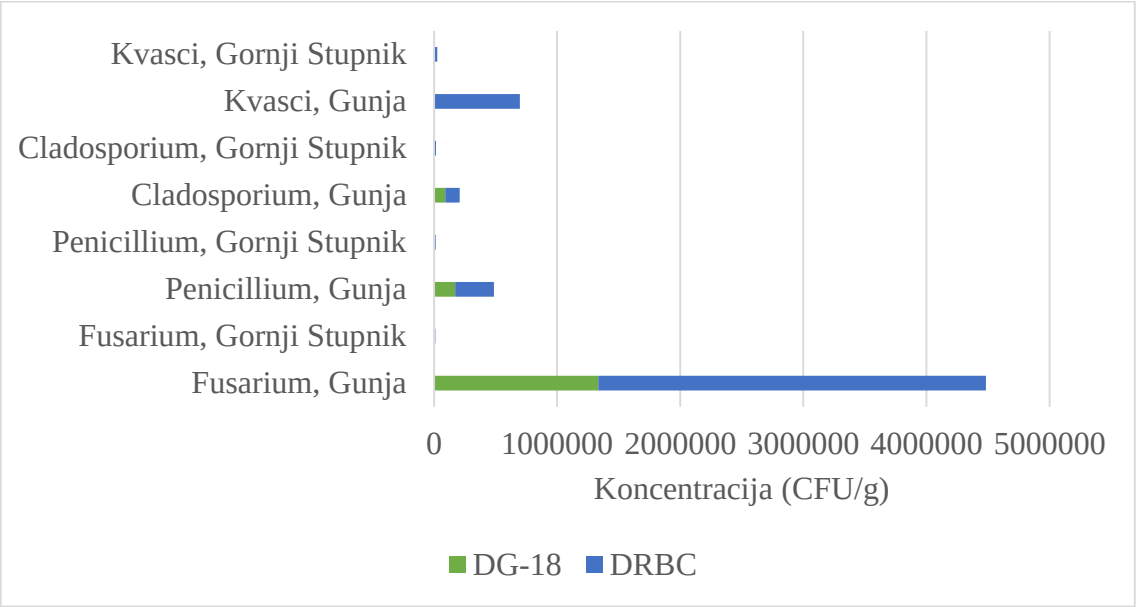
Srednja vrijednost koncentracije plijesni u uzorcima prikupljenima na području Gunje iznosi 5,1 x 10^5 CFU/g i statistički je značajno veća od srednje vrijednosti u uzorcima s područja Gornjeg Stupnika (7,3 x 10^3 CFU/g)(p=0,0286)(Slika 1.).



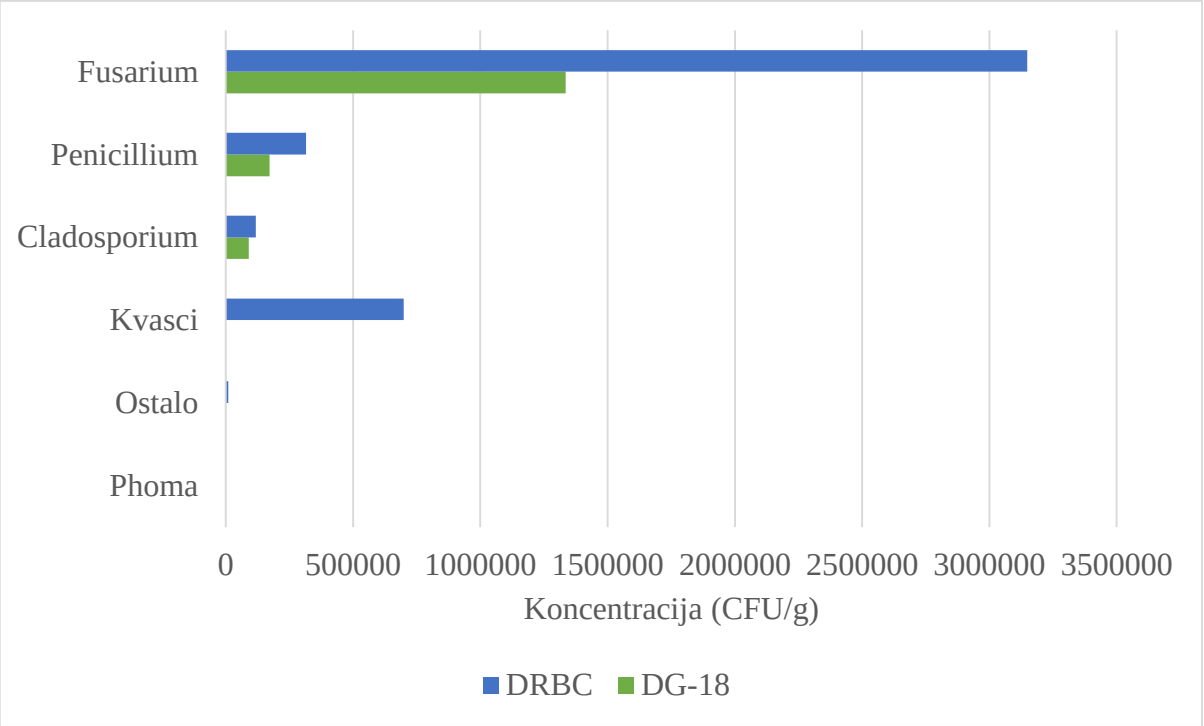
Slika 1. Koncentracija plijesni u žitaricama iz Gunje i Gornjeg Stupnika (*p ≤ 0,05).

U uzorcima prikupljenima na području Gunje (Slika 2. i 3.), od ukupne koncentracije plijesni u uzorcima, koja je iznosila 6,1 x 10^6 CFU/g, koncentracija roda *Fusarium* iznosila je 4,5 x 10^6 CFU/g, koncentracija roda *Penicillium* 4,9 x 10^5 CFU/g, te koncentracija roda *Cladosporium* 2,1 x 10^5 CFU/g. U jednom uzorku na podlozi DG-18 primijećen je rod *Phoma* (9,1 x 10^1 CFU/g). Koncentracija neidentificiranih plijesni iznosila je 9,6 x 10^3 CFU/g, a mnogobrojne su bile kolonije kvasaca; ukupne koncentracije 7,0 x 10^5 CFU/g. Od ukupne koncentracije plijesni poraslih na hranjivoj podlozi DG-18 (1,7 x 10^6 CFU/g), prevladava *Fusarium* (1,3 x 10^6 CFU/g); slijede rodovi *Penicillium* (1,7 x 10^5 CFU/g), te *Cladosporium* (9,1 x 10^4 CFU/g). Na hranjivoj podlozi DRBC poraslo je ukupno plijesni 4,4 x 10^6 CFU/g; od čega najviše roda *Fusarium* (3,1 x 10^6 CFU/g), zatim *Penicillium* (3,2 x 10^5 CFU/g), te *Cladosporium* (1,2 x 10^5 CFU/g).

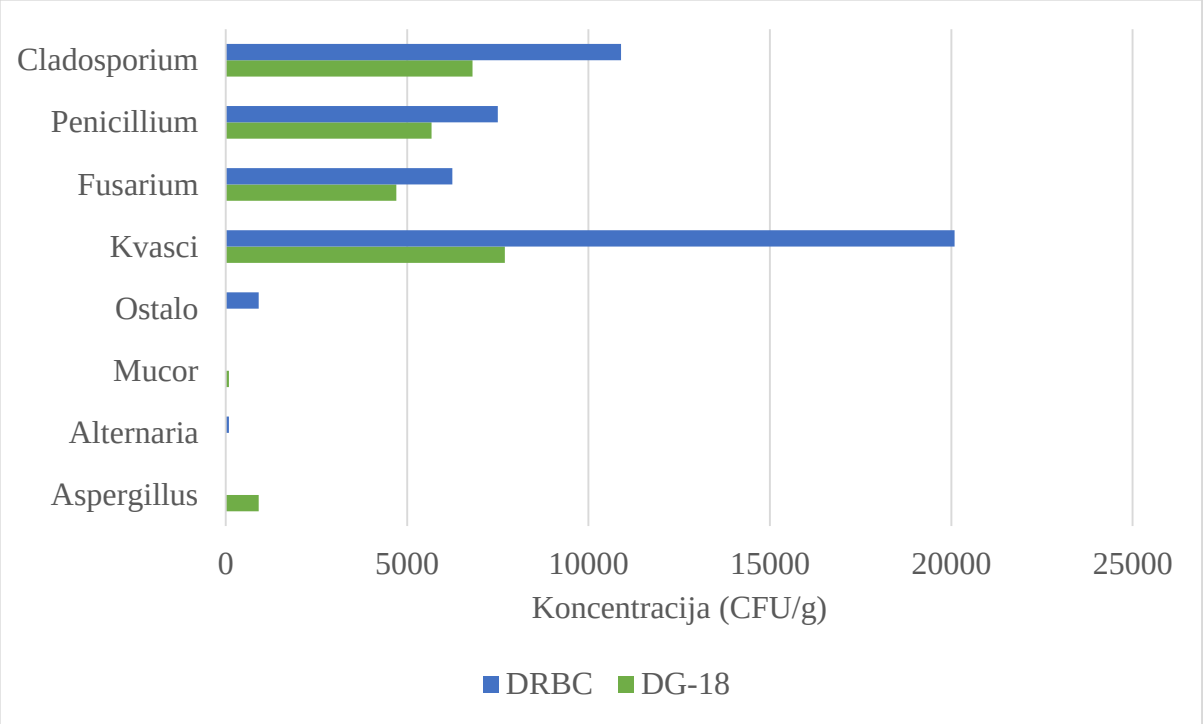
Na kontrolnoj lokaciji Gornji Stupnik (Slika 2. i 4.), od ukupne koncentracije plijesni od 7,1 x 10^4 CFU/g, na *Cladosporium* otpada 1,8 x 10^4 CFU/g. Slijede rodovi *Penicillium* i *Fusarium*, koncentracija 1,3 x 10^4 CFU/g i 1,1 x 10^4 CFU/g redom. U uzorcima hrane iz Gornjeg Stupnika pojavili su se i rodovi *Aspergillus* (9,1 x 10^2 CFU/g), *Alternaria* (9,1 x 10^1 CFU/g) i *Mucor* (9,1 x 10^1 CFU/g). Pronađeno je neidentificiranih plijesni u koncentraciji od 9,1 x 10^2 CFU/g. Koncentracija kvasaca iznosila je 2,8 x 10^4 CFU/g. Na hranjivoj podlozi DG-18 poraslo je ukupno 2,7 x 10^4 CFU/g; od čega najviše roda *Cladosporium* (6,8 x 10^3 CFU/g); zatim *Penicillium* (5,7 x 10^3 CFU/g) i *Fusarium* (4,7 x 10^3 CFU/g). Na podlozi DRBC slična situacija - od ukupne količine plijesni (4,6 x 10^4 CFU/g), najviše je roda *Cladosporium* (1,1 x 10^4 CFU/g) kojeg slijede *Penicillium* (7,5 x 10^3 CFU/g) i *Fusarium* (6,3 x 10^3 CFU/g).



Slika 2. Grafički prikaz vrsta plijesni u uzorcima žitarica s područja Gunje i Gornjeg Stupnika na podlogama DRBC i DG-18.



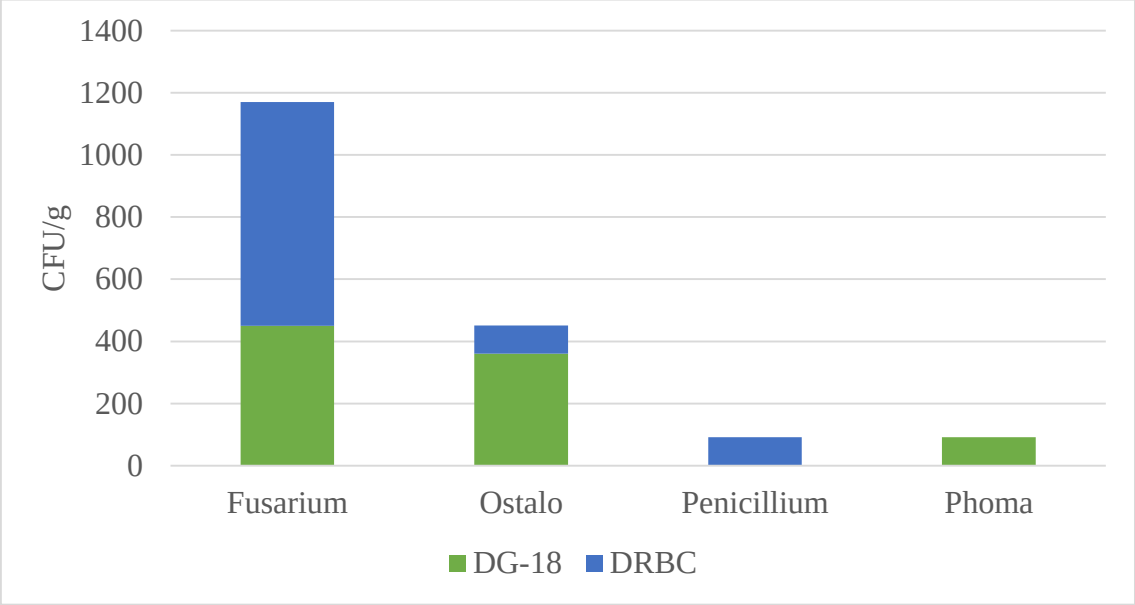
Slika 3. Grafički prikaz vrsta plijesni u uzorcima hrane s područja Gunje na podlogama DG-18 i DRBC.



Slika 4. Grafički prikaz vrsta plijesni u uzorcima hrane s područja Gornjeg Stupnika na podlogama DG-18 i DRBC.

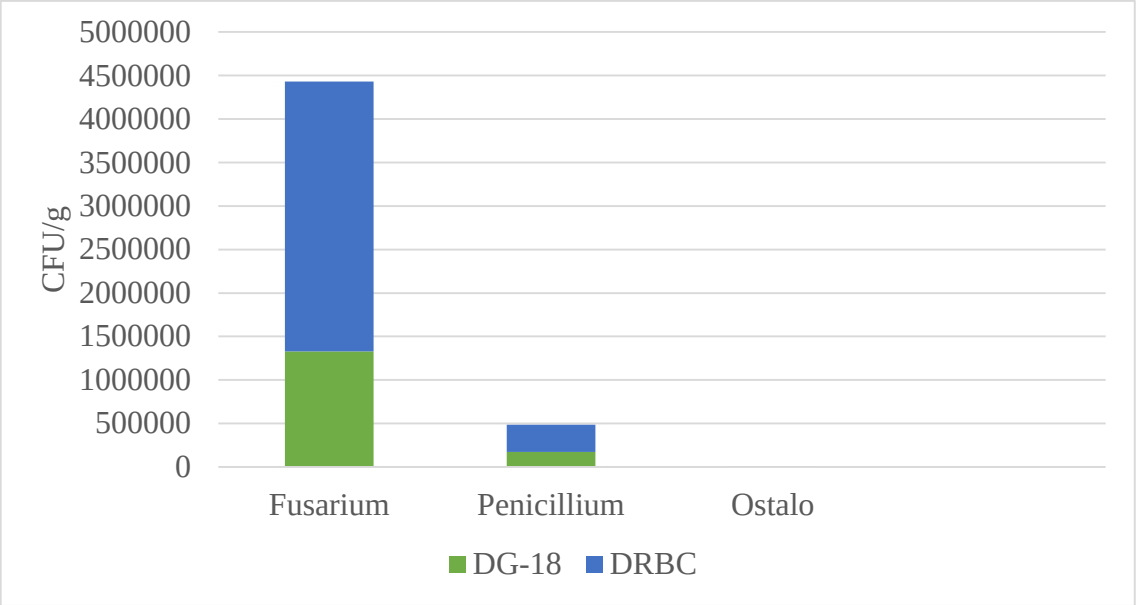
Na području općine Gunja prikupljeni su uzorci ječma (*Hordeum vulgare*), kukuruza (*Zea mays*) i zobi (*Avena sativa*).

Najbrojnija plijesan u ječmu (Slika 5.) bio je rod *Fusarium*, koncentracije 1,2 x 10^3 CFU/g. (4,5 x 10^2 CFU/g na podlozi DG-18, a 7,2 x 10^2 CFU/g na podlozi DRBC). U jednom uzorku pojavio se rod *Phoma* (9,1 x 10^1 CFU/g, podloga DG-18), a u jednom i rod *Penicillium* (9,1 x 10^1 CFU/g, podloga DRBC). Roda *Fusarium* bilo je više nego svih drugih plijesni zajedno. Koncentracija neidentificiranih plijesni je 4,5 x 10^2 CFU/g (3,6 x 10^2 CFU/g na podlozi DG-18, a 9,1 x 10^1 na podlozi DG-18). Kvasci su nađeni u koncentraciji od 8,9 x 10^3 CFU/g. Ukupno je u uzorcima ječma pronađeno 1,1 x 10^4 CFU/g, pretežno na podlozi DRBC (9,9 x 10^4 CFU/g).



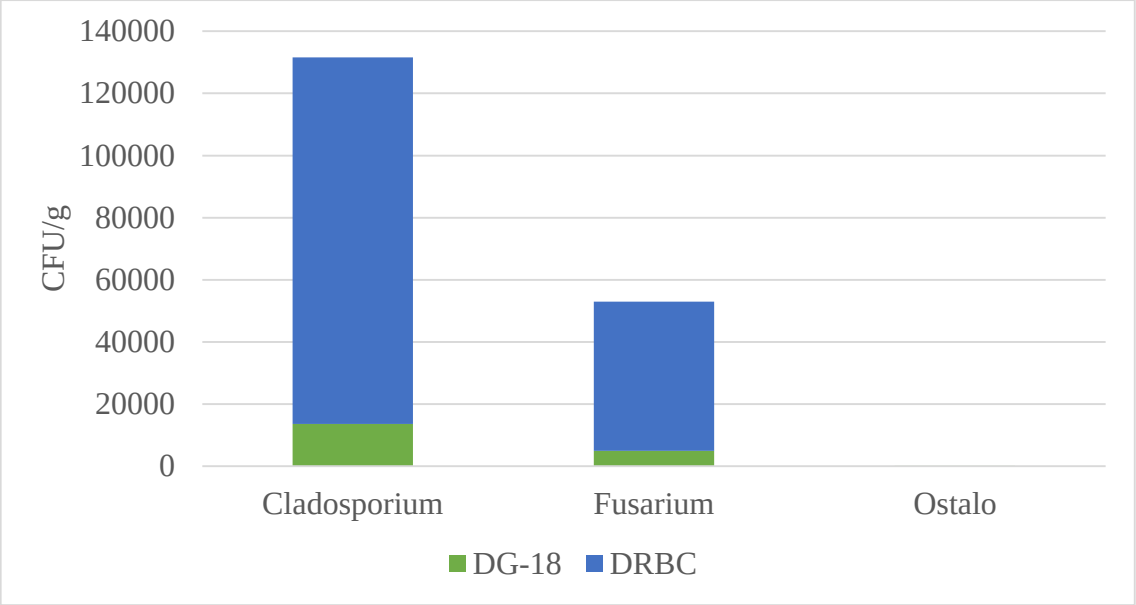
Slika 5. Grafički prikaz vrsta plijesni u uzorcima ječma s područja Gunje

U uzorcima kukuruza s područja Gunje (Slika 6.) bilo je ukupno 5,2 x 10^6 CFU/g, od čega najviše roda *Fusarium* – 4,4 x 10^6 CFU/g (3,1 x 10^6 CFU/g na podlozi DRBC, a 1,3 x 10^6 CFU/g na podlozi DG-18). Pronađeno ga je gotovo 9 puta više od svih ostalih plijesni zajedno. Roda *Penicillium* pronađeno je u koncentracijama od 4,9 x 10^5 CFU/g(1,7 x 10^5 na podlozi DG-18; 3,2 x 10^5 CFU/g na podlozi DRBC), a neidentificiranih plijesni 9,1 x 10^3 CFU/g (sve na podlozi DRBC).



Slika 6. Grafički prikaz vrsta plijesni iz uzoraka kukuruza s područja Gunje

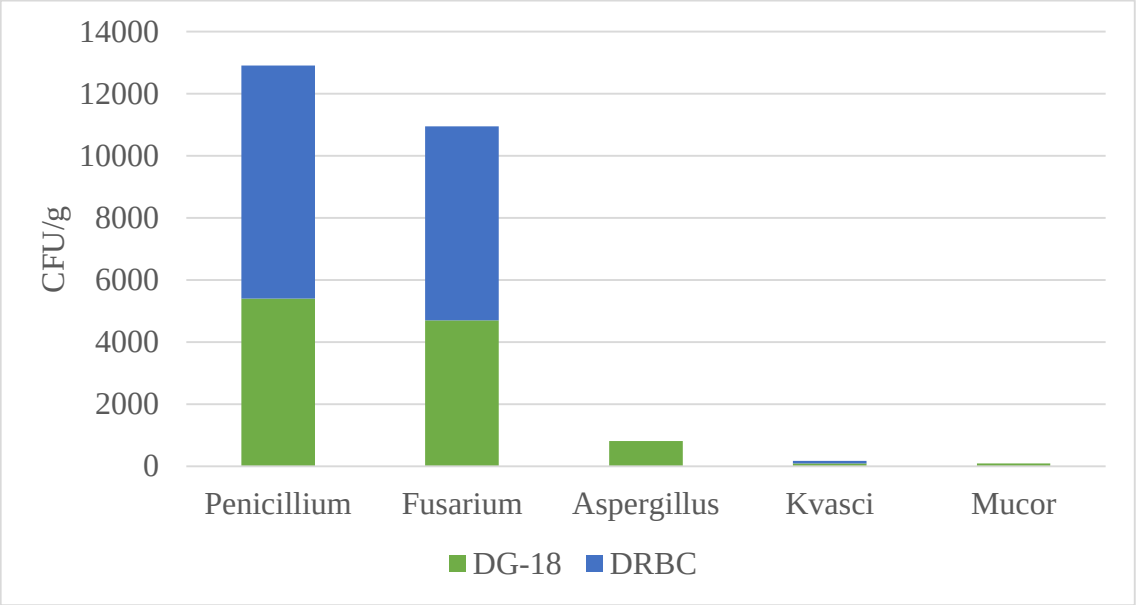
U prikupljenim uzorcima zobi (Slika 7.) pronađeno je ukupno 9,3 x 10^5 CFU/g, a prevladavao je rod *Cladosporium* s ukupnom koncentracijom 8,7 x 10^5 CFU/g. Od toga se na DG-18 hranjivoj podlozi razvilo ukupno 1,4 x 10^4 CFU/g, a na DRBC 8,6 x 10^5 CFU/g. Rod *Fusarium* je idući po zastupljenosti, s 5,3 x 10^4 CFU/g, od toga 4,8 x 10^4 CFU/g na DRBC hranjivoj podlozi. Neidentificirane plijesni razvile su se na DG-18 podlozi u koncentraciji od 9,1 x 10^1 CFU/g. Kvasci su se razvili na podlozi DRBC, u koncentraciji od 6,9 x 10^5 CFU/g.



Slika 7. Grafički prikaz vrsta plijesni u uzorcima zobi s područja Gunje

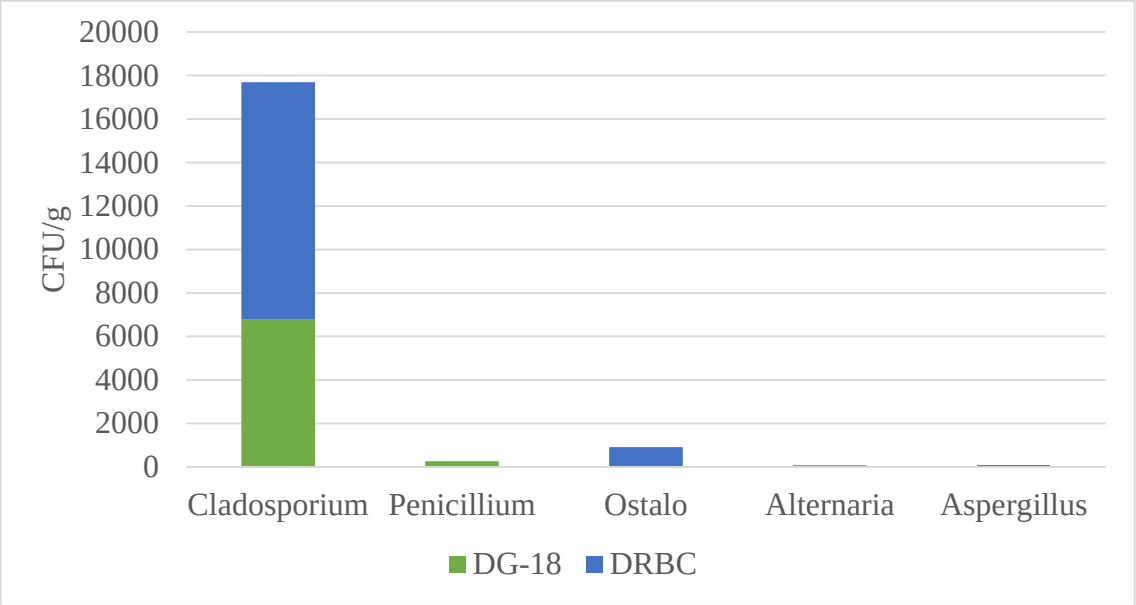
Na području Gornjeg Stupnika prikupljeni su uzorci kukuruza i tritikala (*Triticosecale*).

U uzorcima kukuruza iz Gornjeg Stupnika (Slika 8.), ukupna koncentracija plijesni iznosila je 2,5 x 10^4 CFU/g, od čega je najviše bilo roda *Penicillium* - 1,3 x 10^4 CFU/g, od čega je 5,4 x 10^3 CFU/g poraslo na podlozi DG-18, a 7,5 x 10^3 CFU/g na DRBC hranjivoj podlozi. Druga najbrojnija plijesan bio je *Fusarium*, ukupne koncentracije 1,1 x 10^4 CFU/g; 4,7 x 10^3 CFU/g na DG-18 podlozi i 6,3 x 10^3 na DRBC podlozi. U jednom uzorku pojavila se plijesan roda *Aspergillus* u koncentraciji 8,2 x 10^2 CFU/g, no to je bio izolirani slučaj. Također se jednom pojavio i rod *Mucor*, u koncentraciji 9,1 x 10^1. Kvasaca je bilo u koncentraciji 1,8 x 10^2 CFU/g.



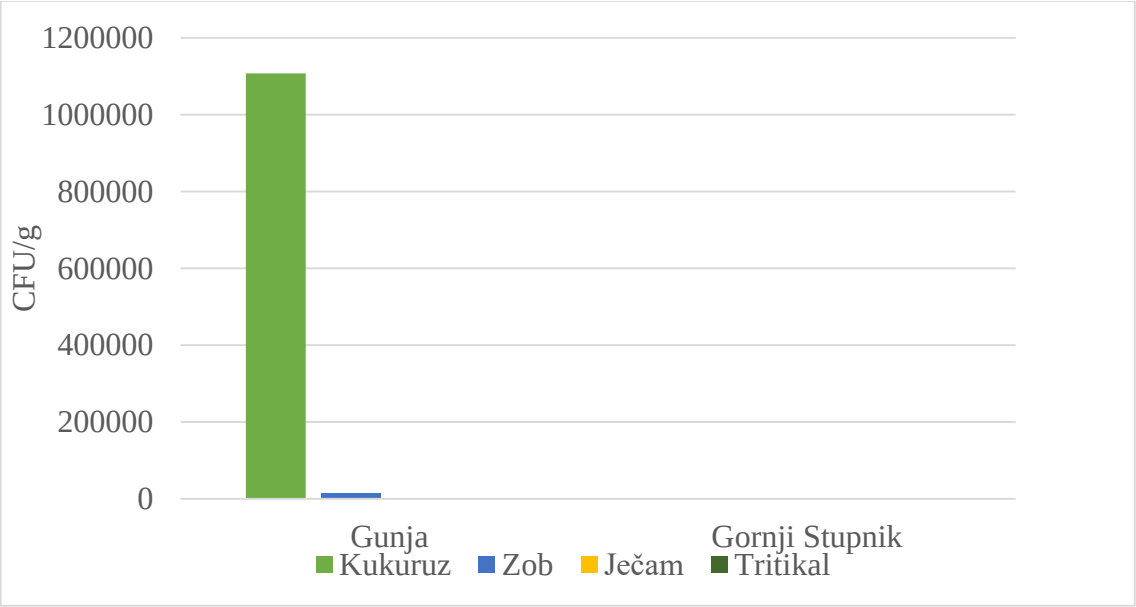
Slika 8. Grafički prikaz vrsta plijesni iz uzoraka kukuruza s područja Gornjeg Stupnika

U uzorcima tritikala iz Gornjeg Stupnika (Slika 9.) pronađeno je ukupno 4,8 x 10^4 CFU/g. Najbrojnija vrsta plijesni bio je rod *Cladosporium* s ukupnom koncentracijom 1,8 x 10^4 CFU/g - 6,8 x 10^3 CFU/g na podlozi DG-18 i 1,1 x 10^4 CFU/g na podlozi DRBC. Roda *Penicillium* nađeno je 2,7 x 10^2 CFU/g, na podlozi DG-18. Neidentificiranih plijesni bilo je 9,1 x 10^2 CFU/g. U jednom uzorku pronađeni su rodovi *Aspergillus* (9,1 x 10^1 CFU/g na podlozi DG-18) i *Alternaria* (9,1 x 10^1 CFU/g na podlozi DRBC). Ukupna koncentracija kvasaca bila je 2,8 x 10^4 CFU/g.



Slika 9. Grafički prikaz vrsta plijesni u uzorcima tritikala s područja Gornjeg Stupnika

Rod *Fusarium* najbrojniji je bio u uzorcima kukuruza s područja Gunje (Slika 10.). Prosječna koncentracija po uzorku iznosila je 1,1 x 10^6 CFU/g. Prosječna koncentracija *Fusarium* plijesni po uzorku zobi bila je 1,3 x 10^4 CFU/g, a najmanje roda *Fusarium* prosječno je bilo po uzorku ječma; oko 1,7 x 10^3 CFU/g. Uzorci kukuruza s kontrolne lokacije prosječno su sadržavali 1,8 x 10^3 CFU/g, a u uzorcima tritikala rod *Fusarium* nije pronađen.



Slika 10. Grafički prikaz prosječnih koncentracija *Fusarium* plijesni u uzorcima žitarica.

5. RASPRAVA

Rezultati su pokazali razliku vrsta i koncentracija plijesni između uzoraka s poplavljenih i kontrolnih područja. Na području Gunje prevladava rod *Fusarium* (4,5 x 10^6 CFU/g), u koncentraciji šest puta većoj od rodova *Penicillium* i *Cladosporium* zajedno. Sva tri roda razvila su se i na DRBC i DG-18 podlozi; no veća je koncentracija bila na DRBC podlozi. Na području Gornjeg Stupnika prevladava rod *Cladosporium* (1,8 x 10^4 CFU/g), ali njegova koncentracija nije nadmoćna nad rodovima *Penicillium* i *Fusarium* u onolikoj mjeri kao ona roda Fusarium na području Gunje. I u kontrolnim uzorcima plijesni su se bolje razvile na DRBC podlozi.

DRBC je podloga visokog aktiviteta vode (a_w 0,99), koja generalno pogoduje razvoju plijesni iz svježe hrane, a slabije ekstremnim kserofilima. Nasuprot tome, podloga DG-18 ima niži aktivitet vode (a_w 0,955), te se na njoj bolje razvijaju kserofilne plijesni (Taniwaki i sur., 2001). Rod *Penicillium* smatra se umjerenim kserofilom – takve plijesni uspijevaju u širokom rasponu aktiviteta, no bolje im odgovara nešto viši (idealni je oko 0,995) što objašnjava zašto se bolje razvio na DRBC podlozi (Beuchat i Hocking 2002).

Klimatski uvjeti vrlo su važni za razvoj roda *Fusarium*: odgovaraju mu toplije temperature (iznad 20˚C) i velika vlažnost zraka (85-90% u trajanju od 24-48h), iako postoje razlike između vrsta (Kotowicz i sur., 2014). Može se zaključiti kako će klimatske promjene imati sve veći utjecaj na kontaminaciju usjeva plijesnima *Fusarium* u budućnosti. Od povišenja temperature koje omogućava plijesnima kolonizaciju prije nedostupnih, hladnijih područja (a često potiče i povećanu proizvodnju mikotoksina), do promijenjenih količina dostupne vode koja je glavni čimbenik razvoja plijesni (Magan i sur., 2011). Vrsta *Fusarium moniliforme,* jedna od najčešćih plijesni u žitaricama za prehranu ljudi i životinja, proizvodila je više fumonizina B_1 u kukuruzu pri temperaturi 25˚C, a manje pri temperaturi od 20˚C (Alberts i sur., 1990). Sve češća je mogućnost poplava nastalih kao posljedica nepovoljnih klimatskih događanja. Ako je poplavi prethodilo dugotrajno sušno razdoblje, na stvrdnutom tlu nakupit će se organski ostaci, a usporiti otjecanje vode, što stvara idealne uvjete za rast plijesni (Rosenzweig, 1994). Poplavna voda prepuna je teških metala, fekalija, pesticida, plijesni i bakterija. Iz tog razloga FDA[4] preporučuje odbacivanje svih usjeva koji su bili izloženi poplavnim vodama nastalih izlijevanjem rijeka. Žitarice pohranjene u silosima također će biti pod povećanim rizikom za kontaminaciju plijesnima, te se u silosima mora redovito kontrolirati količina vlage (Mašek i

[4] U.S. Food and Drug Administration

Šerman, 2006). Dodatno, kod odlaganja propalih usjeva potrebno je pratiti propise kako ne bi došlo do slučajne kontaminacije zdravih biljaka. FDA u smjernicama preporučuje i odgađanje ponovne sjetve dok se ne utvrdi mikrobiološka ispravnost polja za sjetvu (www.fda.gov).

Najbrojnija plijesan u ječmu i kukuruzu s područja Gunje bio je rod *Fusarium* ($1{,}2 \times 10^3$ CFU/g i $5{,}2 \times 10^6$ CFU/g). U uzorcima zobi najviše je bilo roda *Cladosporium* ($8{,}7 \times 10^5$ CFU/g), a *Fusarium* je bio drugi po zastupljenosti ($5{,}3 \times 10^4$ CFU/g). U uzorcima kukuruza s područja Gornjeg Stupnika prevladavao je *Penicillium* ($1{,}3 \times 10^4$ CFU/g), a *Fusarium* je bio drugi ($1{,}1 \times 10^4$ CFU/g). U uzorcima tritikala bilo je najviše roda *Cladosporium* ($1{,}8 \times 10^4$ CFU/g), a *Fusarium* nije pronađen.

Kukuruz se pokazao posebno osjetljivim – prosječna koncentracija *Fusarium* plijesni po uzorku kukuruza iz Gunje bila je gotovo 84 puta veća od prosječne koncentracije u uzorku zobi; a čak 647 puta veća nego prosječna koncentracija u uzorku ječma s područja Gunje. I na području Gornjeg Stupnika, rod Fusarium pojavio se u kukuruzu, iako u značajno manjoj količini, dok u uzorcima tritikala nije pronađen.

Za sada se pretpostavlja kako je temeljni razlog rezultata u kojima je jedna žitarica kontaminirana većim količinama mikotoksina od drugih, posljedica razlika u agronomiji, a na drugom mjestu je razlika u otpornosti između vrsta žitarica (Edwards, 2009). Razlike u koncentracijama ovise o mnogobrojnim faktorima, a između ostaloga i o ispravnom čuvanju (temperatura spremišta drugi je najvažniji faktor iza već spomenute vlažnosti). Međutim, najbrojniji rodovi plijesni u Gunji – *Fusarium* i *Cladosporium* – generalno se smatraju plijesnima polja (engl. 'field fungi'), što znači da koloniziraju žitaricu prije sjetve - iako se ponekad u odgovarajućim uvjetima razvijaju i u spremištima (Magan i Lacey, 1984). S druge strane, koncentracije rodova *Penicillium* (i pogotovo *Aspergillus*), koje se smatraju plijesnima čuvanja (engl. 'storage fungi') i koje toleriraju i manji aktivitet vode, bile su osjetno manje. Možemo zaključiti kako postoji mogućnost da se kontaminacija događa još za vrijeme uzgoja.

Plijesni su identificirane usporedbom mikroskopskih i makroskopskih obilježja s podacima iz literature, a ova metoda ima nekoliko nedostataka. Prvi je dugo trajanje. Potrebno je razviti nove metode kako bi se brže moglo procijeniti je li u hrani prisutna plijesan koja proizvodi mikotoksine. Time se štedi vrijeme i novac, ali i povećava sigurnost. Brzo odstranjivanje kontaminirane hrane smanjuje mogućnost nastajanja biomasa u pogonima za proizvodnju. Drugi nedostatak je što ovakvu vrstu identifikacije može napraviti samo stručnjak za

taksonomiju. Nove metode trebale bi biti jeftine, lako dostupne, lako izvedive i relativno otporne na klimatske razlike kako bi se mogle koristiti i u zemljama u razvoju (Blackburn, ured., 2006).

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 ovome, uzorci ječma su ispunili zahtjev, dok niti jedan uzorak kukuruza nije bio ispravan. Odgovaralo je pola uzoraka zobi. Svi uzorci s područja Gornjeg Stupnika bili su ispravni.

Na području Gunje, potrebno je provjeriti kako nije došlo do nastajanja biomasa u skladišnim prostorima koje stalno iznova uzrokuju kontaminaciju žitarica, kao i provjeriti sastav tla, kako nalaže FDA za ovakve slučajeve. Poželjno bi bilo i razmotriti prilagodbu načina uzgoja. Naime, istraživanja su pokazala kako se koncentracija *Fusarium* plijesni smanjila rotacijom poljoprivrednih kultura na način da se izbjegavalo kontinuirano sijanje žitarica (kukuruz je pogotovo uzrokovao povećanje *Fusarium* plijesni u narednim usjevima); te da se broj plijesni povećavao korištenjem mineralnih gnojiva i, iznenađujuće, fungicida (Bernhoft i sur., 2002; Dill-Macky i Jones, 2000). Slično, insekticidi bi teoretski trebali smanjivati broj kukaca i time oštećenje žitarica koje nastaje nakon sjetve i plijesnima olakšava kolonizaciju; no i njihova upotreba pokazala se upitnom ili čak neuspješnom u nekim slučajevima (Abass i sur., 2018). Zaključak je kako bi bilo poželjno nastaviti s istraživanjem poplavom pogođenog područja, proučiti metode i tehnike uzgoja žitarica, te ih pokušati prilagoditi kako bi se što više smanjila kontaminacija plijesnima.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja dolazi se do slijedećih zaključaka:

- Plijesni rodova *Cladosporium, Fusarium* i *Penicillium* pojavile su se u najvećoj količini u uzorcima žitarica s područja Gunje i Gornjeg Stupnika.
- Prosječna količina plijesni je 70 puta veća za uzorke iz Gunje u odnosu na uzorak s kontrolne lokacije.
- Na području Gunje najbrojnije su bile plijesni roda *Fusarium*, a bolje su se razvile na DRBC podlozi. Na području Gornjeg Stupnika najbrojniji je rod *Cladosporium*, a slijedi rod *Fusarium*, ponovno na DRBC podlozi.
- Rod *Fusarium* pojavio se u svim uzorcima s područja Gunje. Najbrojniji je u uzorcima kukuruza, a slijede redom zob i ječam. Prosječan broj *Fusarium* plijesni u uzorku kukuruza iz Gunje veći je više od 600 puta u odnosu na uzorak kukuruza s kontrolne lokacije. U uzorcima tritikala s kontrolne lokacije, rod *Fusarium* nije pronađen.
- U jednom uzorku ječma s područja Gunje pronađen je rod *Phoma*. Na području Gornjeg Stupnika pronađen je rod *Alternaria* u jednom uzorku tritikala, rod *Mucor* u uzorku kukuruza, te rod *Aspergillus* u ukupno 2 uzorka (tritikal, kukuruz).
- Zbog velikog broja plijesni roda *Fusarium* u uzorcima žitarica, poželjno bi bilo proučiti i zatim prilagoditi trenutni način uzgoja žitarica.

7. LITERATURA

Abass AB, Fischler M, Schneider K, Daudi S, Gaspar A, Rüst J, Kabula E, Ndunguru G, Madulu D, Msola D. On-farm comparison of different postharvest storage technologies in a maize farming system of Tanzania Central Corridor. *J Stored Prod Res*, 2018, 77, 55-65.

Abramson D, Hulasare R, White NDG, Jayas DS, Marquardt RR. Mycotoxin formation in hulless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. *J Stored Prod Res*, 1999, 35, 297-305.

Alberts JF, Gelderblom WCA, Thiel PG, Marasas WFO, Van Schalkwyk DJ, Behrend Y. Effects of Temperature and Incubation Period on Production of Fumonisin B1 by Fusarium moniliforme. *Appl Environ Microb*, 1990, 56, 1729-1733.

Bernhoft A, Torp M, Clasen PE, Løes AK, Kristoffersen AB. Influence of agronomic and climatic factors on Fusarium infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway. *Food Addit Contam A*, 2012, 29, 1129-1140.

Beuchat LR, Hocking AD. Some Considerations When Analyzing Foods for the Presence of Xerophilic Fungi. *J Food Protect*, 1990, 53, 984-989.

Broom L. Mycotoxins and the intestine. *Anim Nutr*, 2015, 1, 262-265.

Burke RM, Jennings DH. Effect of sodium chloride on growth characteristics of the marine yeast Debaryomyces hansenii in batch and continuous culture under carbon and potassium limitation. *Mycol Res*, 1990, 94, 378-388.

Ciklona Donat u brojkama: Koliko je kiše palo?, 2014., https://www.crometeo.hr/, pristupljeno 25. 07. 2018.

Cousin MA. Detection, enumeration and identification methods for spoilage molds. U: Food Spoilage Microorganisms. Blackburn CW, urednik, Cambridge, Woodhead publishing Limited, 2006, str. 55-85.

Dagnas S, Membré JM. Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food Products. *J Food Protect*, 2013, 76, 538-551.

Desjardins AE, Hohn TM, McCormick SP. Trichothecene Biosynthesis in Fusarium Species: Chemistry, Genetics, and Significance. *Microbiol Rev*, 1993, 57, 595-604.

Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar, 1996, https://catalog.hardydiagnostics.com, pristupljeno 27. 07. 2018.

Dijksterhuis J, Houbraken J, Samson RA. Fungal Spilage of Crops and Food. U: Agricultural Applications. Kempken F, urednik, Berlin, Springer-Verlag, 2013, str. 35-56.

Dill-Macky R, Jones R. The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. *Plant Dis*, 2000, 84, 71-76.

Edwards GS. Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional oats. *Food Addit Contam A*, 2009, 26, 1063-1069.

Knutsen HK, Alexander J, Barregard L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B, Dinovi M, Edler L, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom LR, Nebbia CS, Petersen A, Rose M, Roudot AC, Schwerdtle T, Vleminckx C, Vollmer G, Wallace H, Dall'Asta C, Eriksen G-S, Taranu I, Altieri A, Roldán-Torres R, Oswald IP. Scientific opinion on the risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. *EFSA Journal*, 2018, 16, 1-144.

Foreman JH, Constable PD, Waggoner AL, Levy M, Eppley RM, Smith GW, Tumbleson ME, Haschek WM. Neurologic Abnormalities and Cerebrospinal Fluid Changes in Horses Administered Fumonisin B1 Intravenously. *J Vet Intern Med*, 2004, 18, 223–230.

Frisvald JC, Andersen B, Samson RA. Association of moulds to foods. U: Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food. Dijksterhius J, Samson RA, urednici, Boca Raton, Taylor and Francis, 2007, str. 199-239.

González-Hernández JC, Jiménez-Estrada M, Peña A. Comparative analysis of trehalose production by Debaryomyces hansenii and Saccharomyces cerevisiae under saline stress. *Extremophiles*, 2005, 9, 7-16.

Guidance for Industry: Evaluating the Safety of Flood-affected Food Crops for Human Consumption. 2018, www.fda.gov, pristupljeno 14. 08. 2018.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: Toxins Derived from Fusarium Graminearum, F. Culmorum and F. Crookwellense:

Zearalenone, Deoxynivalenol, Nivalenol and Fusarenone X; Ochratoxin A. 1993, IARC Monogr 56: 397–444, 489–521.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene: Fumonisin B1. 2002, IARC Monogr 82: 301–366.

Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2018., http://apps.who.int/, pristupljeno 16. 08. 2018.

Kalenić, S. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str 517.

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

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.

Magan N, Lacey J. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Trans Br Mycol Soc*, 1984, 82, 71-81.

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

Mannaa M, Kim KD. Influence of Temperature and Water Activity on Deleterious Fungi and Mycotoxin Production during Grain Storage. *Mycobiology*, 2017, 45, 240-254.

Mašek T, Šerman V. Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost preživača. *Krmiva*, 2006, 48, 19-31.

Maximum Recovery Diluent (Peptone Saline Diluent). 2018., http://foodsafety.neogen.com, pristupljeno 27. 07. 2018.

McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 2011, 3, 802-814.

Morozova EV, Kozlov VP, Tereshina VM, Memorskaya AS, Feofilova EP. Changes in Lipid Composition and Carbohydrate Composition of Aspergillus niger Conidia during Germination. *Appl Biochem Micro+*, 2002, 38, 129-133.

Oancea S, Stoia S. Mycotoxins: a review of toxicology, analytical methods and health risks. *Acta Univ Cibiniensis Ser E: Food Technol*, 2008, 12, 19-36.

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

Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage. Dordrecht/Heidelberg, Springer-Verlag, 2012, str. 519.

Pleadin J, Vahčić N, Perši N, Ševelj D, Markov K, Frece J. Fusarium mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Cont*, 2013, 32, 49-54.

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

Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, Garcia R, Ramos J. Mechanisms underlying the halotolerant way of Debaryomyces hansenii. *FEMS Yeast Res*, 2005, 5, 639-701.

Prusky D, Kolattukudy PE. Cross-talk between host and fungus in postharvest situations and its effect on symptom development. U: Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food. Dijksterhius J, Samson RA, urednici, Boca Raton, Taylor and Francis, 2007, str. 3-25.

Rajashekhara E, Suresh ER, Ethiraj S. Modulation of thermal resistance of ascospores of Neosartorya fischeri by acidulants and preservatives in mango and grape juice. *Food Microbiol*, 2000, 17, 269-275.

Rodrigues I, Naehrer K. A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed. *Toxins*, 2012, 4, 663-675.

Rosenzweig C, Parry ML. Potential impact of climate change on world food supply. *Nature*, 1994, 367, 133-138.

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

Stanciu O, Banc R, Cozma A, Filip L, Miere D, Mañes J, Loghin F. Occurence of Fusarium mycotoxins in wheat from Europe – a review. *Acta Univ Cibiniensis Ser E: Food Technol*, 2015, 19, 35-60.

Stoljetna poplava na donjem toku rijeke Save, 2014, http://klima.hr/ , pristupljeno 25. 07. 2018.

Šegvić Klarić M, Cvetnić Z, Pepeljnjak S, Kosalec I. Co-occurence of aflatoxins, ochratoxin a, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by CD-ELISA and TLC. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2009, 60, 427-434.

Taniwaki MH, Da Silva N, Banhe AA, Iamanaka BT. Comparison of Culture Media, Simplate, and Petrifilm for Enumeration of Yeasts and Molds in Food. *J Food Protect*, 2001, 64, 1592-1596.

Vesonder RF, Ciegler A, Rohwedder WK, Eppley R. Re-examination of 1972 Midwest corn for vomitoxin. *Toxicon*, 1979, 17, 658-660.

Yazar S, Omurtag GZ. Fumonisins, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *Int J Mol Sci*, 2008, 9, 2062-2090.

Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem Soc*, 2011, 15, 129-144.

8. **SAŽETAK/SUMMARY**

SAŽETAK

U svibnju 2014. godine područje istočne Hrvatske pogođeno je katastrofalnim poplavama, a najgore je stradalo područje Gunje. Poplavna voda donosi sa sobom fekalije, bakterije i plijesni, utječe na sastav tla na kojem se uzgajaju usjevi, ali i količinu vlage. Zato su 2017. godine prikupljeni uzorci žitarica s područja Gunje i Gornjeg Stupnika kao kontrolne lokacije. Kolonije porasle na odgovarajućim podlogama identificirane su usporedbom njihovih morfoloških svojstava s podacima iz literature.

Srednja vrijednost koncentracije plijesni u uzorcima prikupljenima na području Gunje iznosi 5,1 x 10^5 CFU/g i statistički je značajno veća od srednje vrijednosti u uzorcima s područja Gornjeg Stupnika (7,3 x 10^3 CFU/g)(p=0,0286).

Najbrojnije su bile plijesni rodova *Cladosporium*, *Fusarium* i *Penicillium*. *Fusarium* je pronađen u svim uzorcima s područja Gunje, *Cladosporium* samo u uzorcima zobi, a *Penicillium* u svim uzorcima osim jednog. Rod *Fusarium* pogotovo je dominantan u uzorcima kukuruza. Na području Gornjeg Stupnika prevladava rod *Cladosporium*. Rodovi *Alternaria*, *Mucor*, te *Phoma* pronađeni su u izoliranim slučajevima. Rod *Aspergillus* pronađen je u ukupno 2 uzorka s kontrolne lokacije.

Rod *Fusarium* jedan je od glavnih proizvođača mikotoksina – najviše su to trihoteceni, fumonizini i zearalenon. Kronična izloženost mikotoksinima donosi ozbiljne posljedice po zdravlje ljudi i životinja.

SUMMARY

In May 2014., catastrophical floods have devastated eastern areas of Croatia, particullarly village Gunja. Flood waters may bring feces, bacteria, and fungi; change composition of soil on which crops are cultivated, but also change moisture levels. For this reason, samples of cereals have been collected from areas of Gunja; and Gornji Stupnik as control. Colonies that grew on appropriate culture media were identified by comparing their morphological features with data from literature.

Average concentration of fungi in samples from Gunja is calculated at 5,1 x 10^5 CFU/g, which is statistically a significant increase compared to average concentration in samples collected in Gornji Stupnik (7,3 x 10^3 CFU/g)(p=0,0286).

Most numerous fungal genera were *Cladosporium*, *Fusarium* and *Penicillium. Fusarium spp.* were found in all the samples collected in Gunja, *Cladosporium spp.* were found only in oat samples, and *Penicillium spp.* appeared in all the samples but one. *Fusarium spp.* were especially dominant in corn. *Cladosporium spp.* were prevalent at Gornji Stupnik area. *Alternaria spp.*, *Mucor spp.* and *Phoma spp.* were found in isolated cases. *Aspergillus spp.* were found in 2 samples collected at control site.

Fusarium genus is one of the main producers of mycotoxins – mostly trichothecens, fumonisins and zearalenone. Chronic exposure to mycotoxins can have a serious impact on human and animal health.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za mikrobiologiju
Schrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb

Diplomski rad

BIORAZNOLIKOST PLIJESNI U ŽITARICAMA NAKON POPLAVE

Ivana Komac

SAŽETAK

U svibnju 2014. godine područje istočne Hrvatske pogođeno je katastrofalnim poplavama, a najgore je stradalo područje Gunje. Poplavna voda donosi sa sobom fekalije, bakterije i plijesni, utječe na sastav tla na kojem se uzgajaju usjevi, ali i količinu vlage. Zato su 2017. godine prikupljeni uzorci žitarica s područja Gunje i Gornjeg Stupnika kao kontrolne lokacije. Kolonije porasle na odgovarajućim podlogama identificirane su usporedbom njihovih morfoloških svojstava s podacima iz literature. Srednja vrijednost koncentracije plijesni u uzorcima prikupljenima na području Gunje iznosi 5,1 x 10^5 CFU/g i statistički je značajno veća od srednje vrijednosti u uzorcima s područja Gornjeg Stupnika (7,3 x 10^3 CFU/g)(p=0,0286). Najbrojnije su bile plijesni rodova *Cladosporium*, *Fusarium* i *Penicillium*. *Fusarium* je pronađen u svim uzorcima s područja Gunje, *Cladosporium* samo u uzorcima zobi, a *Penicillium* u svim uzorcima osim jednog. Rod *Fusarium* pogotovo je dominantan u uzorcima kukuruza. Na području Gornjeg Stupnika prevladava rod *Cladosporium*. Rodovi *Alternaria*, *Mucor*, te *Phoma* pronađeni su u izoliranim slučajevima. Rod *Aspergillus* pronađen je u ukupno 2 uzorka s kontrolne lokacije. Rod *Fusarium* jedan je od glavnih proizvođača mikotoksina – najviše su to trihoteceni, fumonizini i zearalenon. Kronična izloženost mikotoksinima donosi ozbiljne posljedice po zdravlje ljudi i životinja.

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

Rad sadrži: 33 stranice, 10 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: plijesni u žitaricama, poplave, mikotoksini, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić,** *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Daniela Jakšić, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Friščić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Microbiology
Schrottova 39/I. floor, 10000 Zagreb

Diploma thesis

POST-FLOOD BIODIVERSITY OF FUNGI IN CEREALS

Ivana Komac

SUMMARY

In May 2014., catastrophical floods have devastated eastern areas of Croatia, particullarly village Gunja. Flood waters may bring feces, bacteria, and fungi; change composition of soil on which crops are cultivated, but also change moisture levels. For this reason, samples of cereals have been collected from areas of Gunja; and Gornji Stupnik as control. Colonies that grew on appropriate culture media were identified by comparing their morphological features with data from literature. Average concentration of fungi in samples from Gunja is calculated at 5,1 x 10^5 CFU/g, which is statistically a significant increase compared to average concentration in samples collected in Gornji Stupnik (7,3 x 10^3 CFU/g)(p=0,0286). Most numerous fungal genera were *Cladosporium*, *Fusarium* and *Penicillium. Fusarium spp.* were found in all the samples collected in Gunja, *Cladosporium spp.* were found only in oat samples, and *Penicillium spp.* appeared in all the samples but one. *Fusarium spp.* were especially dominant in corn. *Cladosporium spp.* were prevalent at Gornji Stupnik area. *Alternaria spp.*, *Mucor spp.* and *Phoma spp.* were found in isolated cases. *Aspergillus spp.* were found in 2 samples collected at control site. *Fusarium* genus is one of the main producers of mycotoxins – mostly trichothecens, fumonisins and zearalenone. Chronic exposure to mycotoxins can have a serious impact on human and animal health.

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

Thesis includes: 33 pages, 10 figures, 1 table and 51 reference. Original is in Croatian language.

Keywords: fungi in cereals, floods, mycotoxins, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*

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. University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Friščić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.