

Bioraznolikost plijesni na žitaricama tijekom skladištenja

Škabić, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:163:825789>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-08**



Repository / Repozitorij:

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



Tea Škabić

**Bioraznolikost plijesni na žitaricama tijekom
skladištenja**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

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 dragoj mentorici, prof.dr.sc. Maji Šegvić Klarić na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju, strpljenju i pomoći tijekom izrade rada. Veliko hvala i ostalim djelatnicima Zavoda koji su nesebično prenijeli svoje znanje te uljepšali vrijeme provedeno u laboratoriju. Zahvaljujem se svojim prijateljima na svom veselju kojeg mi pružaju. Posebna i najveća zahvala mojoj obitelji, na svojoj podršci, motivaciji i ljubavi.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. UTJECAJ KLIME NA PLIJESNI I PRODUKCIJU MIKOTOKSINA	1
1.2. MIKOTOKSINI	1
1.3. KLIMATSKE PROMJENE I UTJECAJ NA BIORAZNOLIKOST PLIJESNI	4
2. OBRAZLOŽENJE TEME	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. MATERIJALI	7
3.1.1 HRANJIVE PODLOGE	7
3.1.2 KORIŠTENI UREĐAJI	8
3.2. METODA	8
3.2.1 UZORKOVANJE	8
3.2.2 MIKOLOŠKA ANALIZA	8
3.2.3 STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	9
4. REZULTATI	10
5. RASPRAVA	18
6. ZAKLJUČAK	22
7. LITERATURA	23
8. SAŽETAK/SUMMARY	27
Temeljna dokumentacijska kartica	29
Basic documentation card	30
Popis slika i tablica	31

1. UVOD

1.1.UTJECAJ KLIME NA PLIJESNI I PRODUKCIJU MIKOTOKSINA

Značaj klime i klimatskih promjena vremenom postaje sve veći. Globalno zatopljenje predstavlja puno veću opasnost od dosad poznatih pojava poput otapanja ledenjaka i toplinskih udara. Bitni pomaci se očekuju na razini biljnog, životinjskog, ali i mikrobiološkog svijeta. Porast temperature, povišenje koncentracije ugljikovog dioksida i promjena količine padalina ključni su čimbenici koji će, utjecanjem na rast plijesni i proizvodnju mikotoksina, utjecati i na sigurnost hrane te na zdravlje ljudi. Također, pretpostavlja se da će zbog izmjene klimatskih uvjeta doći do mijenjanja geografskog položaja kojeg vrste koloniziraju, mutacija koje će osigurati bolju prilagodbu ili pak dovesti do izumiranja (Russel i sur., 2010).

Pojava i širenje novih bolesti samo su jedne od opasnosti koje prijete. Naime, topliji uvjeti olakšavaju razvoj termotolerantnih vrsta poput *Aspergillus flavus*, izvora vrlo opasnih aflatoksina, na žitaricama poput kukuruza koje su u svakodnevnoj prehrani čovjeka. Smatra se da će produkcija aflatoksina biti veća od produkcija ostalih mikotoksina te da će ujedno predstavljati najveću opasnost izazvanu promjenom bioraznolikosti mikrobioma svijeta (Paterson i Lima, 2011).

Istraživanje provedeno u Italiji 2003. godine pokazalo je utjecaj porasta temperature i perioda suše tijekom samo nekoliko mjeseci na rast plijesni koje koloniziraju kukuruz, kao i njihovu produkciju mikotoksina. Analizirani su uzorci kukuruza iz šest regija sjeverne Italije koji se koriste kao prehrana za stoku čije se mlijeko i mliječni proizvodi konzumiraju. Dotad, najveću brigu izazivala je kontaminacija trihotecenima i fumonizinima (Giorni i sur., 2007). No, *Fusarium verticillioides* za produkciju prethodno spomenutih mikotoksina, zahtijeva aktivitet vode (a_w) > 0,93. Obzirom na malu količinu padalina, a_w se smanjio te pridonio stvaranju optimalnih uvjeta za rast plijesni *Aspergillus* sekcije *Flavi*. Naime, potreban a_w za rast i proizvodnju aflatoksina je između 0,73 i 0,83 te uz idealnu temperature za rast (između 19 i 35 °C) i produkciju aflatoksina (28 °C) koja je postignuta vrućinama, vrsta *Aspergillus flavus* je proširila svoju kolonizaciju kukuruza te povećala produkciju mikotoksina aflatoksina B1 i B2.

1.2.MIKOTOKSINI

Mikotoksini su sekundarni nisko-molekularni metaboliti plijesni. Dosad je otkriveno oko petsto toksina. Klima (temperatura, dostupnost vode, količina svjetlosti, suša..) predstavlja najvažniji

čimbenik koji utječe na životni ciklus plijesni i njihovu sposobnost da koloniziraju usjeve, prežive i stvaraju mikotoksine (Zingales i sur., 2022). Osim o klimi, produkcija toksina ovisi o stanju biljke (prisutnim insektima, ranama nastalim od sisavaca), uvjetima skladištenja, ali i bioraspoloživosti mikronutrijenata potrebnih za rast plijesni. Smatra se da je 25% usjeva svake godine kontaminirano mikotoksinima uzrokujući značajne ekonomske gubitke u agrikalnom sektoru (El Sayed i sur., 2022).

Interes za proučavanjem mikotoksina javio se nakon pojave „X bolesti“ koja je zahvatila purane u Ujedinjenom Kraljevstvu. Životinje su se hranile mljevenim kikirikijem koji je bio kontaminiran plijesnima *Aspergillus flavus* i *parasiticus*, koje su stvorile aflatoksine. Posljedično, uginulo je 100 000 purana i 10 000 ostale peradi. Zanimljiv povijesni primjer je i ergotizam, bolest koju karakteriziraju bolovi u abdomenu, halucinacije i unutarnje izgaranje po kojem je dobila naziv „vatra svetog Antuna“. Uzrok bolesti su ergot alkaloidi koje stvara *Claviceps purpurea*, u ovom slučaju na raži. S vremenom je primijećeno kako su izbijanja slučajeva trovanja mikotoksinima češća u ratnim i siromašnim područjima (Awuchi i sur., 2021). Primjerice, tijekom rata u Rusiji žito se nije moglo sakupiti na vrijeme već se sakupilo kasnije, za vrijeme otapanja snijega, kada su bili povoljni uvjeti za sintezu trihotecena (Peraica i sur., 2014). Kontaminacija trihotecenima dovela je do iritacije kože, gastrointestinalnih tegoba te pada broja bijelih krvnih stanica (aleukije). Nakon 2. svjetskog rata u Japanu se pojavljuje pojam „žuta riža“ koji zapravo predstavlja rižu punu jako toksičnih plijesni. Kasnije je iz uzorka izolirana plijesan *Penicillium citreoviridae* koji stvara mikotoksin citeoviridin (Kushiro, 2015). Također su poznati primjeri endemske nefropatije uzrokovane okratoksinom te leukoencefalomalacije kod konja uzrokovane fumonizinima.

Većina mikotoksina je kemijski stabilna i preživi procesuiranje hrane (<https://www.who.int/>). U ljudski organizam dospijevaju putem hrane, inhalacijom ili apsorpcijom preko kože, a bolesti koje uzrokuju nazivaju se mikotoksikoze. Ozbiljnost trovanja ovisi i o zdravstvenom stanju čovjeka: vitaminskoj deficijenciji, konzumaciji alkohola, kalorijskoj restrikciji te prisustvu drugih infekcija (Bennet i Klich, 2003). Konzumacija biljaka na kojima su narasle plijesni (voće, povrće, žitarice) predstavlja primarnu kontaminaciju. Unos proizvoda životinjskog podrijetla (mlijeko, sir, meso) koji sadrže metabolite mikotoksina naziva se sekundarna kontaminacija. Najveći značaj s javnozdravstvenog aspekta imaju aflatoksini, okratoksin A, patulin, fumonizini, zearalenon i trihoteceni.

Aflatoksine ubrajamo u najotrovnije mikotoksine. Stvaraju ih *Aspergillus flavus* (aflatoksin B1 i B2) i *Aspergillus parasiticus* (aflatoksin B1, B2, G1, G2). Koloniziraju žitarice prije žetve, tijekom skladištenja i prerade. Osim žitarica, zahvaćaju orašaste plodove (bademe, brazilski

oraščić, pistacije), začinsko bilje (đumbir, kurkumu, crni papar, korijandar) te sjemenke uljarica (kikiriki, suncokret). Izloženost visokim dozama vodi do akutnog trovanja (aflatoksikoze) koja značajno oštećuje jetru te ugrožava život. Kronična izloženost niskim dozama vodi do pojave raka ili imunosupresije. Aflatoksin B1 je prema Agenciji za istraživanje raka (IARC) karcinogen 1 skupine (dokazano uzrokuje karcinom u ljudi) te se pretpostavlja da je uzrok velikog broja hepatocelularnih karcinoma (Hussein, 2001). Osim karcinogenih i hepatotoksičnih, ispoljava mutagena, imunosupresivna i karcinogena svojstva. Nakon konzumacije u sisavaca podliježe reakcijama biotransformacije u jetri te nastaje veliki broj metabolita od kojih je jedan aflatoksin M1, također kancerogeni mikotoksin pronađen u mlijeku i mliječnim proizvodima. Za rast *Aspergila* pogoduju temperature 27-37°C, područja suše s malom količinom padalina stoga pretežito naseljavaju tropska i suptropska područja. U idućih 25-50 godina predviđa se porast temperature za 2-5 °C što će pridonijeti širenju roda *Aspergillus* u dotad nekolonizirana područja (Paterson i Lima, 2011). Smatra se da će aflatoksin B1 ugroziti sigurnost kukuruza u Europi, a aflatoksin M1 mlijeka (Battilani i sur., 2016). Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani ograničio je prisustvo aflatoksina B1 u žitaricama na 2 mikrograma po kilogramu (NN/146/2012).

Okratoksin A stvara nekoliko vrsta roda *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*) i roda *Penicillium* (*P. verrucosum*). Pretežito se nalazi u žitaricama, zrnima kave, sušenom voću, soku od grožđa i kikirikiju. Formira se tijekom skladištenja usjeva, a IARC ga je uvrstila u 2B skupinu karcinogena tj. potencijalno uzrokuje karcinom u ljudi. Ciljni organ jest bubreg te osim toga djeluje imunosupresivno, hepatotoksično i neurotoksično. Povezuje se s pojavom urotelijalnog tumora te endemskom nefropatijom, no uzročno-posljedična veza još uvijek nije potvrđena. Stvaranju ohratoksina A pogoduju vlažni uvjeti s visokim a_w (0,99) i temperaturom između 25 i 30 °C (Milani, 2013). Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani ograničio je prisustvo ohratoksina A u neprerađenim žitaricama na 5 mikrograma po kilogramu (NN/146/2012).

Patulin je mikotoksin kojeg stvara prvenstveno vrsta *Penicillium expansum*. Kontaminira trule jabuke, žitarice i voćne sokove (posebice na bazi jabuka). Prvotno je korišten kao širokospektralni antibiotik, ali je zbog svoje toksičnosti izgubio farmakološku upotrebu. Uzrokuje jaku mučninu i gastrointestinalne tegobe te ima neuro i gastrotoksično djelovanje. Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani ograničio je prisustvo patulina u voćnim sokovima na 50 mikrograma po kilogramu (NN/146/2012).

Zearalenon je sekundarni metabolit vrste *Fusarium graminearum*. Osim žitarica poput kukuruza i riže, izvor su meso, mlijeko, sir te kikiriki. Optimalni uvjeti za rast su temperatura oko 25 °C i a_w 0,96 (Milani, 2013). Sam mikotoksin, kao i njegovi metaboliti poput zearalenola imaju jako estrogeno djelovanje. Povezuje se s pojavom povećanja grudi te preuranjenog puberteta. U Puerto Ricu zabilježeni su slučajevi preuranjenog ulaska u pubertet kod djece te je u krvi pronađen zearalenon. S obzirom na to da se kukuruz tamo ne proizvodi, pretpostavljeni izvor mikotoksina bila je piletina porijeklom iz SAD-a (Domijan, 2013). Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani ograničio je prisustvo zearalenona u neprerađenim žitaricama (osim u kukuruзу) na 100 mikrograma po kilogramu.

Plijesni roda *Fusarium* stvaraju dvije skupine mikotoksina : fumonizine i trihotecene. Za rast im je povoljan širok raspon temperatura, pH te visoki a_w (iznad 0,9), stoga su vrlo rašireni kontaminanti na velikom broju namirnica diljem svijeta (Domijan, 2013). Ipak, fumonizini najčešće kontaminiraju kukuruz ili proizvode na bazi kukuruza. Najtoksičniji predstavnik skupine je fumonizin B1 koji je prema IARC-u uvršten u 2B skupinu karcinogena (potencijalno uzrokuje rak u ljudi). Ispoljavaju hepato i nefrotoksična te imunosupresivna svojstva te su u nekim državama poput Italije i Kine povezani s ezofagealnim rakom (Xue i sur., 2019). Osim toga, prehrana domaćih životinja koja se temeljila na krmivu na bazi kukuruza pokazala je kardiotoksičnost fumonizina za svinje (Domijan, 2013).

U trihotecene ubrajamo T-2, HT-2, deoksinivalenol (vomitoksin) i diacetoksiscirpenol (DAS). Pretežito kontaminiraju žitarice poput zobi, pšenice i kukuruza. U prošlosti, posebice nakon 2. svjetskog rata, istraživana je upotreba T-2 toksina kao biološkog oružja. Naime, Rusija je proizvodila „žutu kišu“, tj. aerosol i kapljice mikotoksina otpuštalo se iz aviona što je dovelo do snažne iritacije kože i očiju (Vitanovski i Sovilj, 2017). T-2, HT-2 i DAS pokazuju citotoksična svojstva, vode do upale gastrointestinalnog trakta, edema i povraćanja, dok vomitoksin uzrokuje snažnu mučninu i povraćanje. Za produkciju mikotoksina povoljna je temperatura između 25 i 30 °C te a_w 0,995 (Milani, 2013). Uz aflatoksine, dominantno su prisutni u tropskim i subtropskim područjima.

1.3.KLIMATSKE PROMJENE I UTJECAJ NA BIORAZNOLIKOST PLIJESNI

Velik broj osnovnih namirnica poput žitarica, orašastih plodova te voća već je i sada kolonizirano plijesnima, posebice roda *Aspergillus*, *Penicillium* te *Fusarium* i kontaminirano mikotoksinima (Magan i sur., 2011). Iako su uvjeti života znatno bolji nego u prošlosti kada su se prvi put javila izbijanja mikotoksikoza te su zakonskom regulativom ograničene dopuštene

količine mikotoksina u hrani što doprinosi sigurnosti hrane, klimatske promjene sve više ispoljavaju negativan utjecaj na pojavnost plijesni i mikotoksina što zahtjeva pronalaženje novih načina njihove kontrole. Zbog promjena klimatskih uvjeta predviđaju se migracije patogena te veća izloženost istima.

Trenutan je fokus na bakterijskoj rezistenciji na antibiotike i opasnost koje predstavljaju ljudskom zdravlju, no jesmo li „očuvani“ od plijesni? Ne postoji dostupno cjepivo, spektar antimikrobne terapije je limitiran, a sve nadolazeće promjene upravo idu u korist ekspanzije plijesni (Jabra-Rizk i sur., 2004). Nadalje, mikotoksini su termostabilni, teško ih je uništiti procesuiranjem hrane, a uza sve to neki djeluju karcinogeno te predstavljaju veliku prijetnju sigurnosti hrane, ali i ljudskom zdravlju.

Sinergija porasta koncentracije ugljikovog dioksida, temperature i promjene dostupnosti vode stimulirat će rast mikotoksikotvornih plijesni. Određeni usjevi mogu biti inficirani različitim vrstama plijesni te može doći i do multimikotoksikološke kontaminacije (Perrone i sur., 2020). Izvještaj Međuvladinog panela o klimatskim promjenama (IPCC) smatra područje Mediterana najugroženijim i najdostupnijim utjecaju globalnog zatopljenja. Umjerenu klimu zamijenit će toplinski valovi, dulja razdoblja suše te smanjena količina padalina. Kserofilne vrste poput *Wallemia sebi*, *Xeromyces bisporus* te *Chyrsosporium spp.* postat će dominantni kolonizatori hrane (Magan i sur., 2011). Osim njih, najveću prijetnju predstavljaju vrste roda *Aspergillus* i njihovi mikotoksini s obzirom na to da predviđene promjene upravo idu u korist njihovom razvoju i širenju.

Očekuje se i porast ekonomskih troškova zbog većih ulaganja u nova istraživanja i mjere sprječavanja izloženosti mikotoksinima, kao i zbog uništavanja kontaminiranih usjeva te različitih zdravstvenih i veterinarskih troškova (Hussein, 2001). Razmišljanja idu i u smjeru korištenja modela kojim bi se predvidio rizik od deoksinivalenola u pšenici, fumonizina B skupine te aflatoksina u kukuruzu (Magan i sur., 2011). Osim na razini razvoja plijesni, promjene se predviđaju i na razini dobre poljoprivredne prakse (GAP) te sustava za očuvanje sigurnosti hrane (engl. *Hazard Analysis and Critical Control Point* - HAACP).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Žitarice se ubrajaju u jedne od najčešće kontaminiranih namirnica u prehrani. Rast plijesni i produkcija mikotoksina se odvija tijekom njihova rasta, ali i nakon žetve te tijekom skladištenja. Zbog nadolazećih porasta temperature i štete koju ona izaziva na biljkama, očekuju se značajne promjene u rastu plijesni i kontaminaciji mikotoksinima. Posebice tome pogoduju toplija podneblja s manje padalina i duljim razdobljima suhog vremena. Među plijesnima koje rastu u ovakvim uvjetima osobito su učestale vrste roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Sekundarni metaboliti ovih plijesni vrlo su opasni i toksični spojevi koji predstavljaju javnozdravstvenu prijetnju.

Specifični ciljevi ovog rada su :

1. Odrediti koncentraciju plijesni u uzorcima kukuruza, ječma i pšenice na području sjeverne, istočne i središnje Hrvatske uzetih iz skladišta u ožujku 2022.
2. Na temelju morfoloških i mikromorfoloških obilježja identificirati plijesni narasle na odgovarajućim hranjivim podlogama do razine roda/vrste.

3. MATERIJALI I METODE

Korištena metoda jest brojanje plijesni i kvasaca postupkom brojanja kolonija u uzorcima žitarica namijenjeni ljudskoj ili životinjskoj prehrani pri 25 °C.

3.1.MATERIJALI

Korištene su DRBC i DG-18 hranjive podloge, peptonska voda, sterilne tikvice do 500 ml, Petrijeve zdjelice, tipsevi, epruvete, L-štipci, termostatirana tresilica i autoklav.

3.1.1 HRANJIVE PODLOGE

- Peptonska voda (Biolife, Italija) dobivena je otapanjem 1 g kazeina i 8,5 g natrijevog klorida u 1 L destilirane vode te se zagrijavala do vrenja. Sterilizirana je autoklaviranjem 15 min na 121 °C te joj je potom dodan polisorbit 80 (Tween 80; Sigma-Aldrich, Njemačka).
- Dikloran rose bengal kloramfenikol agar (DRBC) priređen je otapanjem 10 g glukoze, 5 g peptona, 1 g monokalijeveg fosfata (KH₂PO₄), 0,5 g magnezijevog sulfata heptahidrata (MgSO₄*7H₂O), 15 g agara, 2 mg diklorana (0,2% w/v u EtOH, 1 mL) te 100 mg kloramfenikola u 1 L destilirane vode. Dobivena otopina se zagrijavala do vrenja te je sterilizirana autoklaviranjem 15 min na 121 °C. Potom joj je dodano 25 mg rose bengala (5% w/v u H₂O, 0,5 mL) te se čuvala zaštićena od svjetlosti.
- DG-18 (dikloran 18% glicerolni) agar dobiven je otapanjem 10 g glukoze, 5 g peptona, 1 g monokalijeveg fosfata (KH₂PO₄), 0,5 g magnezijevog sulfata heptahidrata (MgSO₄*7H₂O), 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. Pripremljena otopina se zagrijavala do vrenja te je sterilizirana autoklaviranjem 15 min na 121°C.

Agar DG-18 se upotrebljava za brojanje osmofilnih kvasaca i kserofilnih plijesni tehnikom brojanja kolonija, pri čemu je aktivitet vode $\leq 0,95$. Potrebno smanjenje aktiviteta vode postiže se povećanjem udjela glicerola na 18 %. Takvi uvjeti su potrebni s obzirom na to da mnogi kvasci i plijesni za svoj rast zahtijevaju niži aktivitet vode. DRBC podloga se također koristi za brojanje kvasaca i plijesni, ali osigurava $a_w > 0,95$. Osim toga, podloga u svom sastavu sadrži dikloran, antifungalni agens koji onemogućava rast i širenje plijesni reda *Mucorales* koje bi

ometale i ograničile rast proučavanih vrsta. S ciljem smanjenja kontaminacije uzoraka drugim kolonijama, DRBC ima i rose bengal, a dodatak kloramfenikola (termostabilnog antibiotika) omogućava selektivno djelovanje protiv rasta bakterija. Glukoza je izvor ugljikohidrata, a probavni enzimi osiguravaju esencijalne mikronutrijente (vitamine i minerale), kao i aminokiseline, dušik i ugljik.

3.1.2 KORIŠTENI UREĐAJI

- Autoklav ((\varnothing 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

Korišteni uzorci žitarica (kukuruza, ječma i pšenice) prikupljeni su iz skladišta na području sjeverne, srednje i istočne Hrvatske u ožujku 2022. godine. Prikupljeno je ukupno 90 uzoraka (10 uzoraka za svaku žitaricu na pojedinom području). Uzorci su se prije analize čuvali u plastičnim posudama na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 MIKOLOŠKA ANALIZA

Odvaže se 10 g uzorka te mu se pomoću staklene menzure doda 90 ml peptonske vode (omjer uzorka i peptonske vode 1:9). Uzorak se potom u termostatiranoj tresilici homogenizira te ostavi da se talog slegne. Time je dobivena početna suspenzija koncentracije 10^{-1} . Radne suspenzije su dobivene razrjeđivanjem početne do koncentracija redom 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5} .

Za svaki od 90 uzoraka pripremljene su navedene suspenzije. Po 100 mikrolitara iz početne suspenzije svake od radnih suspenzija prenese se na DRBC i DG-18 hranjive podloge te se rasporede steriliziranim L-štapićem. Pripremljene ploče s podlogama inkubiraju se pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 do 7 dana nakon čega su izbrojane narasle kolonije, pri čemu se odbacuju ploče s brojem kolonija iznad 150.

Koncentracija plijesni u g uzorka žitarice tijekom brojanja dva uzastopna razrjeđenja izračunava se prema formuli:

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

pri čemu je:

ΣC – zbroj kolonija izbrojenih na svim pločama

V – volumen inokuluma u mililitrima stavljenog na hranjivu podlogu

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

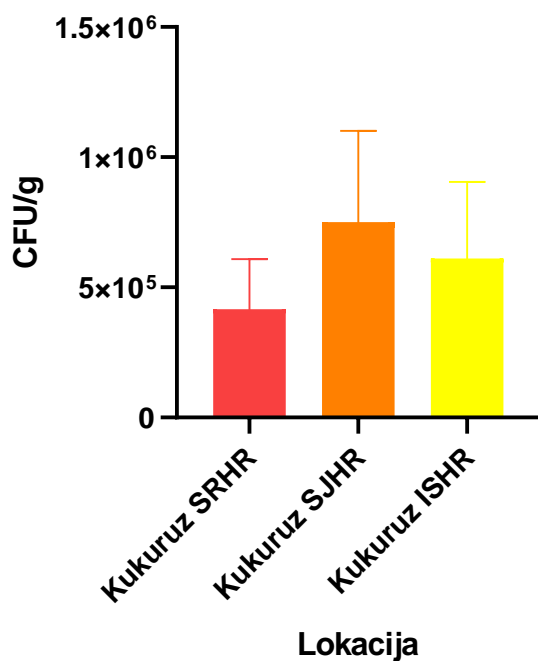
Rezultati su iskazani kao broj jedinica koje formiraju kolonije – CFU (engl. *Colony forming unit*) po gramu uzorka (CFU/g). Podaci su analizirani one way ANOVA metodom (jednosmjernom analizom varijance) te su se pritom uspoređivale različite skupine podataka. Značajna razlika između skupina iskazuje se preko P vrijednosti te ako njena vrijednost iznosi manje od 0,05, prisutnost značajne razlike je potvrđena. Korišteni su i tablični prikazi udjela pojedinih rodova i vrsta plijesni u analiziranim područjima.

4. REZULTATI

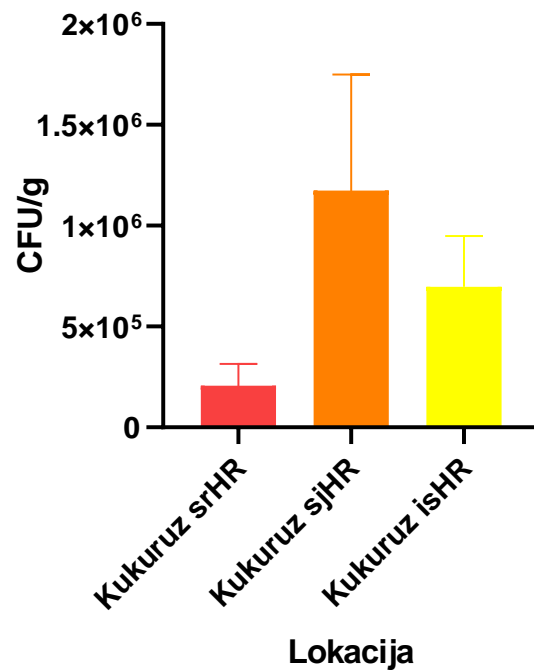
Srednja vrijednost koncentracije plijesni u uzorcima kukuruza prikupljenim u skladištima na području sjeverne Hrvatske te uzgajanim na DG-18 hranjivoj podlozi jest $7,5 \times 10^5$ CFU/g. U uzorcima sakupljenim u središnjoj Hrvatskoj zabilježen je porast plijesni od $4,16 \times 10^5$ CFU/g, a u istočnoj Hrvatskoj od $6,51 \times 10^5$ CFU/g (Slika 1A).

Uzorci kukuruza na DRBC hranjivoj podlozi imaju slične koncentracije plijesni kao i na DG-18. Srednje koncentracije su najveće na uzorcima iz sjeverne Hrvatske, ($1,17 \times 10^6$ CFU/g), nakon toga slijedi srednja koncentracija plijesni u području istočne ($6,97 \times 10^5$ CFU/g) te na posljepku središnje Hrvatske ($2,07 \times 10^5$ CFU/g) (Slika 1B).

A



B

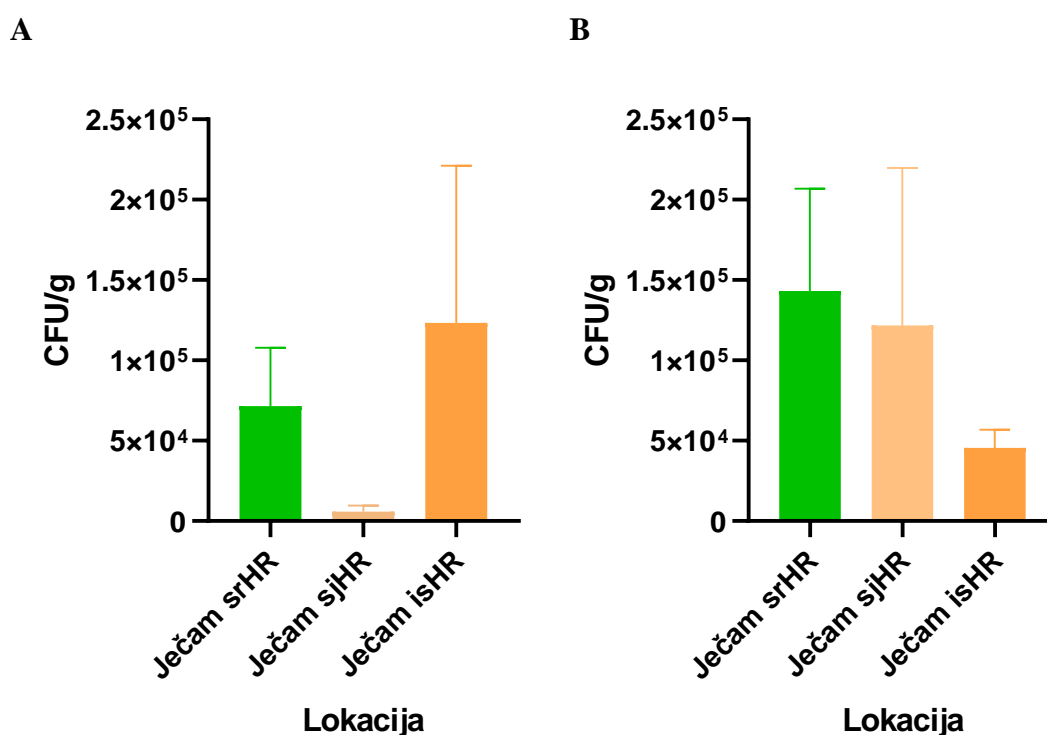


Slika 1. Koncentracija plijesni naraslih na DG-18 (A) i DRBC (B) podlogama iz uzoraka kukuruza sakupljenih u području središnje, sjeverne i istočne Hrvatske.

U uzorcima ječma sakupljenim na području središnje Hrvatske te uzgojenim na DG-18 agaru srednja koncentracija naraslih plijesni iznosila je $7,15 \times 10^4$ CFU/g. To je najveća zabilježena

vrijednost porasta plijesni na ječmu obzirom na srednje koncentracije plijesni u uzorcima iz sjeverne ($5,8 \times 10^3$ CFU/g) i istočne ($1,2 \times 10^5$ CFU/g) Hrvatske. Također, značajno je manji broj poraslih plijesni u odnosu na uzorke kukuruza (Slika 2A).

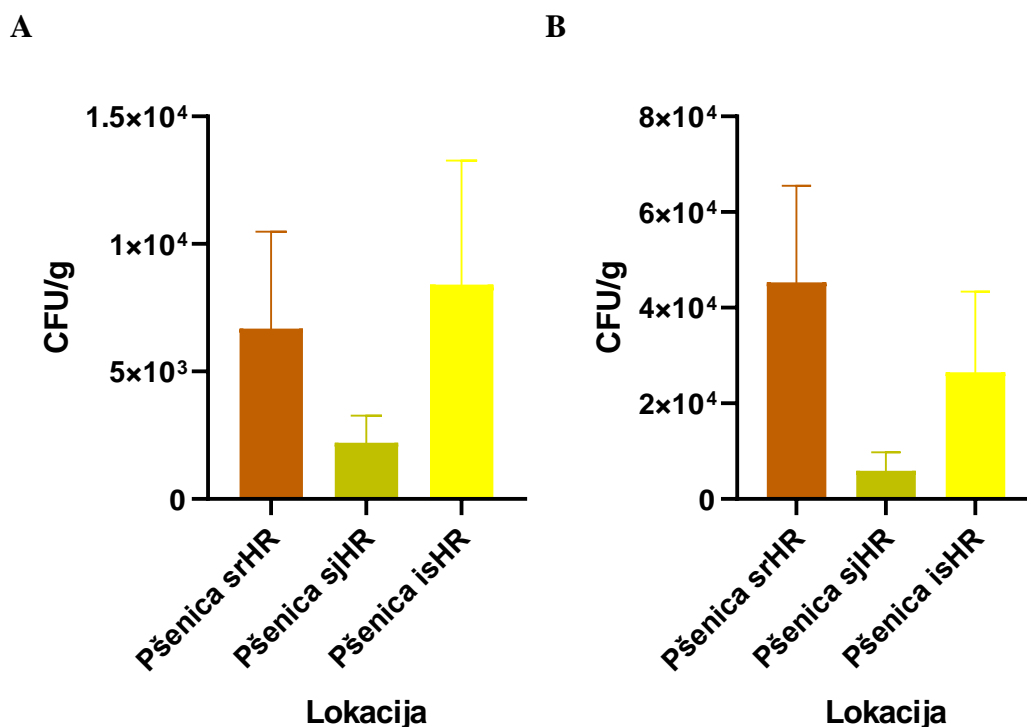
Uzorci obrađeni na DRBC hranjivoj podlozi pokazuju drugačije mikološko opterećenje od rezultata dobivenih na DG-18 podlozi. Najveću koncentraciju plijesni imaju uzorci ječma iz središnje Hrvatske sa srednjom koncentracijom plijesni od $1,4 \times 10^5$ CFU/g. Na uzorcima iz sjeverne Hrvatske srednja koncentracija iznosila je $1,2 \times 10^5$ CFU/g, a na uzorcima iz istočne Hrvatske $4,6 \times 10^4$ CFU/g (Slika 2B).



Slika 2. Koncentracija plijesni u uzorcima ječma iz tri područja Hrvatske naraslih na DG-18 (A) i DRBC (B) agaru.

Najmanji porast plijesni zabilježen je u uzorcima pšenice na DG-18 agaru. Naime, najveća srednja koncentracija plijesni jest $8,4 \times 10^3$ CFU/g i to na području istočne Hrvatske. Uzorci pšenice iz središnje Hrvatske imaju srednju koncentraciju $6,7 \times 10^3$ CFU/g, a iz sjeverne Hrvatske tek $2,2 \times 10^3$ CFU/g (Slika 3A).

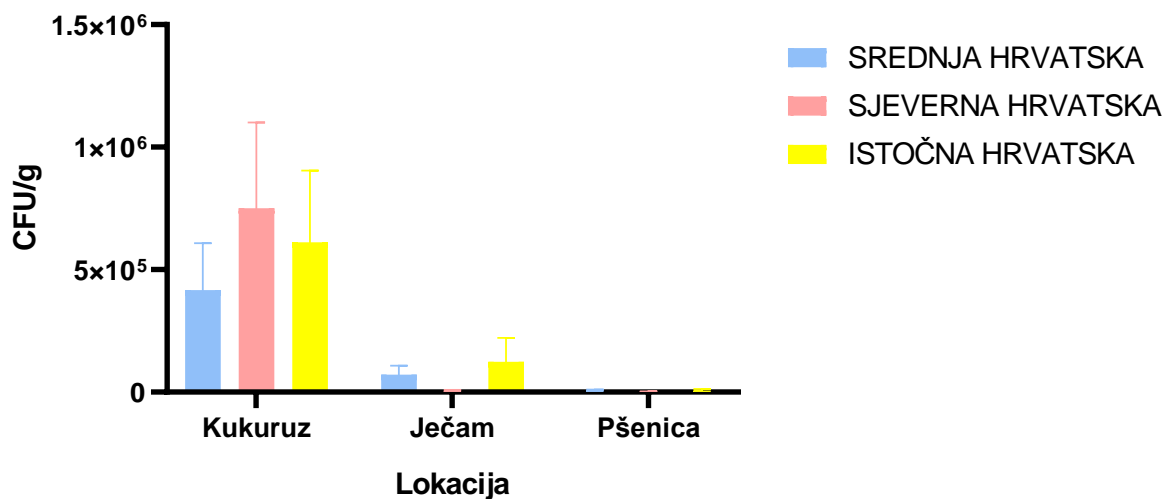
S druge strane, najveća srednja koncentracija plijesni iz uzoraka pšenice naraslih na DRBC agaru iznosila je $4,5 \times 10^5$ CFU/g na području središnje Hrvatske. Potom slijedi istočna Hrvatska sa srednjom koncentracijom od $2,67 \times 10^5$ CFU/g, a najmanji porast zabilježen je na uzorcima sjeverne Hrvatske sa srednjom koncentracijom od $5,9 \times 10^3$ CFU/g (Slika 3B).



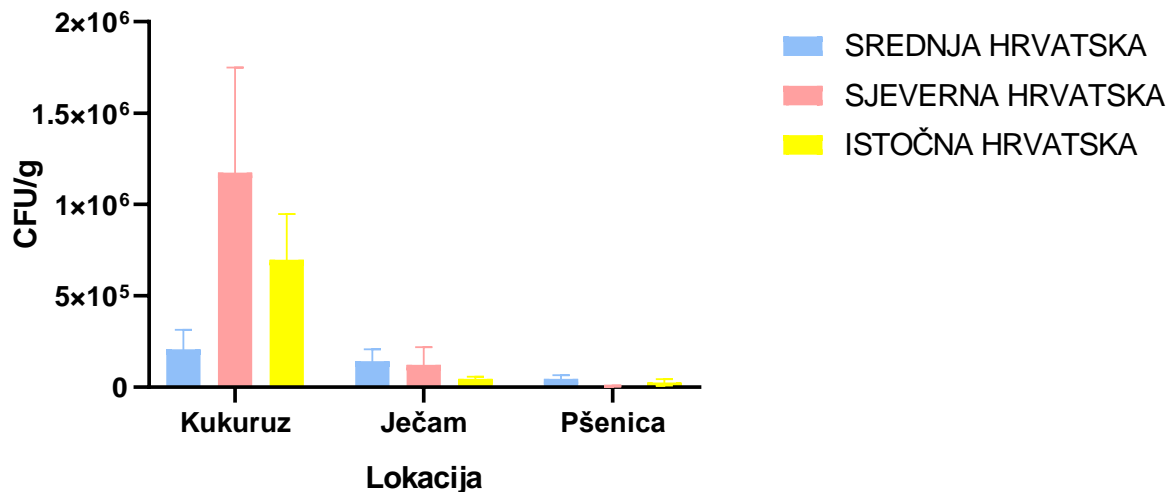
Slika 3. Koncentracija plijesni u uzorcima pšenice na DG-18 (A) i DRBC (B) agaru iz tri područja Hrvatske.

Općenito, uspoređujući kukuruza, pšenicu i ječam međusobno, zabilježene su značajne razlike u porastu plijesni na DG-18 agaru. Naime, najveći porast vidljiv je na uzorcima kukuruza, posebice prednjače uzorci iz sjeverne Hrvatske. Zatim slijede uzorci iz istočne Hrvatske, a najmanja srednja koncentracija plijesni zabilježena je u središnjoj Hrvatskoj (Slika 4).

S druge strane, čak i na DRBC agaru najveći porast plijesni primjećen je na uzorcima kukuruza. Srednja koncentracija plijesni u uzorcima kukuruza iz sjeverne Hrvatske opet je bila vodeća pred uzorcima iz istočne te naposljetku i središnje Hrvatske (Slika 5). Koncentracije plijesni poraslih na uzorcima žitarica iz tri područja Hrvatske međusobno su uspoređivane jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) te prema p vrijednosti nije bilo statistički značajne razlike između analiziranih podataka.



Slika 4. Koncentracija plijesni poraslih na DG-18 agaru iz uzoraka triju žitarica prikupljenih na području srednje, sjeverne i istočne Hrvatske.



Slika 5. Koncentracija plijesni poraslih na DRBC agaru iz uzoraka triju žitarica prikupljenih na području srednje, sjeverne i istočne Hrvatske.

U tablici 1. prikazana je učestalost (%) pojavljivanja određenih rodova i vrsta plijesni u uzorcima žitarica sakupljenih u sjevernoj, središnjoj i istočnoj Hrvatskoj, a naraslih na DG-18

agaru. Zabilježen je rast osam različitih rodova plijesni, pri čemu su najbrojniji rodovi *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* (posebice sekcija *Aspergillus*) te kvasci.

Plijesni koje predvladavaju na uzorcima kukuruza iz sjeverne Hrvatske pripadaju rodovima *Penicillium* (100%), *Fusarium* (60%) te *Cladosporium* (50%). U manjem udjelu (30%) narasle su plijesni roda *Aspergillus* sekcija *Aspergillus*, a u udjelu od 10% pojavljuju se *Aspergillus* sekcija *Flavi* i *Nigri* kao i kvasci.

Na uzorcima kukuruza prikupljenim u istočnoj Hrvatskoj najviše je naraslo plijesni roda *Fusarium* (100%), *Penicillium* (80%) te *Cladosporium* (80%). Iz roda *Aspergillus* zabilježen je porast sekcije *Aspergillus* (40%), *Flavi* (30%) i *Nigri* (20%).

Plijesni roda *Penicillium* porasle su na svim uzorcima kukuruza prikupljenog u istočnoj Hrvatskoj (100%). Idući po učestalosti su bili rodovi *Penicillium* (70%) i *Cladosporium* (60%). U manjoj mjeri zabilježen je i porast *Aspergillus* sekcije *Flavi* (20%), a najmanje (10%) su zastupljene *Aspergillus* sekcije *Aspergillus*, *Circumdati*, rod *Botrytis* te kvasci.

Na uzorcima ječma iz područja sjeverne Hrvatske dominiraju plijesni roda *Cladosporium* (80%) i kvasci (70%). Na četiri uzorka došlo je do porasta plijesni roda *Penicillium* i *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (40%). Manje su zastupljeni rodovi *Fusarium* (20%), *Phoma* (10%), *Althernarium* (10%) i *Aspergillus* sekcija *Candidus* (10%).

Dominacija roda *Penicillium* očituje se na uzorcima ječma iz istočne Hrvatske (100%). Potom slijedi rod *Cladosporium* (90%) i kvasci (80%). U šest uzoraka narasle su plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (60%), a na tri uzorka plijesni roda *Fusarium* (30%).

Plijesni koje predvladavaju na uzorcima ječma iz središnje Hrvatske jesu roda *Penicillium* (80%) i *Cladosporium* (70%). Osim njih, visok udio zastupljenosti zabilježen je za *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (60%) i *Candidus* (60%) te kvasce. U manjoj mjeri porasle su i plijesni roda *Fusarium* (30%), *Althernariae* (10%) i *Mucor* (10%).

Na uzorcima pšenice prikupljene u sjevernoj Hrvatskoj najzastupljeniji rodovi su *Penicillium* (80%) i *Aspergillus* sekcija *Aspergillus* (70%). Na pola uzoraka narasle su plijesni roda *Cladosporium* i *Aspergillus* sekcija *Flavi* (50%). Zastupljenost od 20% imao je rod *Fusarium* te *Aspergillus* sekcija *Flavi*, *Nigri* i *Candidus*.

Plijesni roda *Penicillium* narasle su na svim uzorcima pšenice sakupljenih u istočnoj Hrvatskoj (100%). Na više od pola uzoraka zabilježen je rast rodova *Fusarium* (60%), *Cladosporium* (60%) i *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (60%). Prisutnost kvasaca i *Aspergillus* sekcije *Flavi* uočena je na dva uzorka (20%).

Skoro na svim uzorcima pšenice iz središnje Hrvatske zabilježen je porast plijesni roda *Penicillium* (90%). Plijesni roda *Cladosporium* i kvasci dijele drugo mjesto po zastupljenosti (70%). U manjoj mjeri zabilježen je rast roda *Fusarium* (40%). Najmanji porast imali su rodovi *Phoma* i *Aspergillus* sekcija *Flavi* (10%).

Tablica 1. Učestalost plijesni (%) naraslih na DG-18 agaru iz uzoraka žitarica prikupljenih iz sjeverne (SJHR), središnje (SRHR) i istočne (ISHR) Hrvatske.

Gljivice	Kukuruz			Ječam			Pšenica		
	SJHR	ISHR	SRHR	SJHR	ISHR	SRHR	SJHR	ISHR	SRHR
DG-18									
<i>Althernarium</i> spp.				10		10			
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Aspergillus</i>	30	40	10	40	60	60	70	60	
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Candidus</i>				10		60	20		
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Circumdati</i>			10						
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Flavi</i>	10	30	20				20	20	10
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Nigri</i>	10	20					20		
<i>Botrytis</i>			10						
<i>Cladosporium</i> spp.	50	80	60	80	90	70	50	60	70
<i>Fusarium</i> spp.	60	100	100	20	30	30	20	60	40
Kvasci	10		10	70	80	60		20	70
<i>Mucor</i>						10			
<i>Penicillium</i> spp.	100	80	70	40	100	80	80	100	90

<i>Phoma</i> spp.				10					10
--------------------------	--	--	--	----	--	--	--	--	----

U tablici 2. prikazana je učestalost (%) pojedinih rodova i vrsta plijesni u uzorcima žitarica (kukuruz, ječam, pšenica) poraslih na DRBC agaru. Uzorci su sakupljeni u sjevernoj, istočnoj i središnjoj Hrvatskoj. Primijećen je rast sedam različitih rodova plijesni, pri čemu su najučestalije plijesni roda *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* te kvasci.

Na uzorcima kukuruza prikupljenim u sjevernoj Hrvatskoj, a uzgojenim na DRBC agaru, najviše su narasle plijesni roda *Fusarium* (100%). Sljedeće po učestalosti su plijesni roda *Penicillium* (70%) te kvasci (50%). U najmanjoj mjeri zabilježen je porast roda *Cladosporium* i *Aspergillus* sekcije *Flavi* (10%).

Plijesni roda *Penicillium* i *Fusarium* prisutne su na svim uzorcima kukuruza iz istočne Hrvatske (100%). Na pola uzoraka vidljiv je rast kvasaca (50%), a manje su zastupljene plijesni roda *Cladosporium* (30%), *Aspergillus* sekcije *Nigri* (10%) i sekcije *Aspergillus* (10%).

U središnjoj Hrvatskoj, na uzorcima kukuruza, najveći porast imale su plijesni roda *Fusarium* (100%). Sljedeće po zastupljenosti bile su plijesni roda *Penicillium* (60%) i kvasci (60%). Najmanja učestalost evidentirana je za rodove *Cladosporium* (30%), *Aspergillus* sekcije *Flavi* (10%) i *Nigri* (10%).

Na uzorcima ječma prikupljenim u sjevernoj Hrvatskoj najučestaliji su kvasci (100%) i plijesni roda *Penicillium* (80%). Na pola uzoraka zabilježen je porast plijesni roda *Fusarium* (50%). Manje su prisutni rodovi *Cladosporium* (30%) i *Phoma* (10%).

Kvasci (90%) i plijesni roda *Penicillium* (80%) bile su dominantne na uzorcima iz istočne Hrvatske. Zatim po zastupljenosti slijede plijesni roda *Cladosporium* (70%) i *Fusarium* (50%). Na jednom uzorku vidljiv je porast plijesni roda *Phoma* i *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (10%). Na najvećem broju uzoraka ječma iz središnje Hrvatske zabilježen je rast plijesni roda *Fusarium* (90%) i kvasaca (70%). Velika je učestalost penicilija (50%) i plijesni roda *Cladosporium* (50%). Najmanja je pojavnost rodova *Aspergillus* sekcije *Candidus*, sekcije *Flavi* i *Aspergillus* (10%).

Kvasci (90%) i plijesni roda *Fusarium* (80%) dominiraju na uzorcima pšenice iz sjeverne Hrvatske. Manja je zastupljenost rodova *Penicillium* (40%), *Cladosporium* (40%) te *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (30%). Na malom broju uzoraka primijećen je rast plijesni roda *Mucor* (20%), *Aspergillus* sekcije *Flavi* i sekcije *Nigri* (10%).

Na uzorcima pšenice iz istočne Hrvatske prevladavaju plijesni roda *Fusarium* (90%), *Cladosporium* (80%) i kvasci (80%). Učestalost roda *Penicillium* je 50%, a *Aspergillus* sekcije *Flavi* te *Nigri* 10%.

Plijesni roda *Fusarium* prevladavaju na uzorcima pšenice iz središnje Hrvatske (100%). Visoku zastupljenost imaju i kvasci (90%) te plijesni roda *Penicillium* (80%). Na tri uzorka narasle su plijesni roda *Phoma* (30%), a u najmanjoj mjeri prisutne su plijesni roda *Althernariae* (10%) i *Cladosporium* (10%).

Tablica 2. Učestalost plijesni (%) naraslih na DRBC agaru iz uzoraka žitarica prikupljenih iz sjeverne (SJHR), središnje (SRHR) i istočne (ISHR) Hrvatske.

Gljivice	Kukuruz			Ječam			Pšenica		
	SJHR	ISHR	SRHR	SJHR	ISHR	SRHR	SJHR	ISHR	SRHR
<i>Althernarium spp.</i>									10
<i>Aspergillus spp.</i>			10						
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Aspergillus</i>		10			10	10	30		
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Candidus</i>						20			
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Flavi</i>	10		10			10	10	10	
<i>Aspergillus</i> sek. <i>Nigri</i>		10	10				10	10	
<i>Cladosporium spp.</i>	10	40	30	30	70	50	40	80	10
<i>Fusarium spp.</i>	100	100	100	50	50	90	80	90	100
Kvasci	50	50	60	100	90	70	90	80	90
<i>Mucor</i>							20		
<i>Penicillium spp.</i>	70	100	60	80	80	50	40	50	80
<i>Phoma spp.</i>				10	10				30

5. RASPRAVA

Provedeno istraživanje pokazalo je značajne razlike u koncentraciji poraslih plijesni (CFU/g) i rodovima plijesni koji koloniziraju žitarice ovisno o lokaciji uzorkovanja. Analizirani su uzorci kukuruza, pšenice i ječma prikupljeni iz skladišta u ožujku 2022.

Općenito, uzimajući u obzir sva tri područja uzorkovanja i tri vrste žitarica, najveći porast plijesni bilježi se na kukuruзу i to s područja sjeverne Hrvatske, neovisno o vrsti korištene hranjive podloge. Na uzorcima prevladavaju plijesni roda *Penicillium* i *Fusarium* što dovodi u pitanje uvjete rasta i skladištenja žitarice. Istraživanje provedeno na uzorcima žitarica nakon poplave u Gunji također pokazuje dominantnu učestalost plijesni roda *Fusarium*, uz rodove *Cladosporium* i *Aspergillus* (Kifer i sur., 2021). U Poljskoj je prije pet godina kultivirano 1,2 milijuna hektara kukuruza od čega je 645 000 namijenjeno produkciji žitarica, a 601 000 za krmivo. (Czarnecka i sur., 2022). Smatra se da će do 2050. porasti potražnja za kukuruzom na 3,3 milijarde tona te da će do 2025. godine postati najkorištenija žitarica (Mirsam i sur., 2021). Analogno tome, kukuruz će postati sve veća prijetnja zdravlju zbog učestale primjene u prehrani i velikog broja plijesni koje nosi sa sobom.

Rast kvasaca i plijesni iz analiziranih uzoraka praćen je na dvije podloge : DRBC i DG-18. Veći a_w (>0,95) karakterizira DRBC agar te je pogodan za porast plijesni iz svježje hrane, dok je DG-18 podloga s nižim aktivitetom vode te se koristi za prebrojavanje osmofilnih i kserofilnih kvasaca i plijesni.

Porast plijesni roda *Penicillium* brojniji je od svih analiziranih rodova. Zabilježen je na svih 90 uzoraka s učestalošću od 40 do 100 %, s time da se dominantan rast ističe na svim uzorcima kukuruza iz sjeverne Hrvatske te svim uzorcima ječma i pšenice iz istočne Hrvatske (100%, DG-18).

U visokom udjelu na DG-18 agaru zastupljene su i plijesni roda *Cladosporium*. Najveći porast je zabilježen na uzorcima ječma iz istočne Hrvatske (90%) te sjeverne Hrvatske (80%), kao i na uzorcima kukuruza iz istočne Hrvatske (80%). Iduće po zastupljenosti bile su plijesni roda *Fusarium*. Rast je evidentiran na svim analiziranim uzorcima, a prevladavao je na kukuruзу, posebice uzorcima iz istočne i središnje Hrvatske (100%, DG-18).

Plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Flavi* narasle su u manjoj mjeri s maksimalnim udjelom od 30% na uzorcima kukuruza iz istočne Hrvatske. Na uzorcima ječma analiziranih na DG-18 podlozi nije zabilježen porast vrsta iz sekcije *Flavi*.

S druge strane, najveći udio plijesni poraslih na DRBC agaru pripada rodu *Fusarium*. Pojavnost je visoka na svim analiziranim uzorcima, neovisno o lokaciji uzorkovanja. Učestalost je zabilježena na svim uzorcima kukuruza te uzorcima pšenice iz središnje Hrvatske (100%). Visok porast primijećen je i na preostalim uzorcima pšenice (90%). Plijesni roda *Fusarium* sveprisutan su toksikološki problem u umjerenim klimatskim područjima, neovisno o količini oborina (Kifer i sur., 2021). Prema Uredbi o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanta u hrani, rezultati kontrolnog praćenja berbi ukazuju na to da kukuruz, kao i proizvodi od kukuruza, mogu biti u velikoj mjeri kontaminirani fumonizinima te je potrebno poduzeti mjere da bi se spriječio ulazak neprihvatljivo kontaminiranog kukuruza u hranidbeni lanac.

Također, na svim je uzorcima vidljiv i porast kvasaca, posebice na uzorcima kukuruza iz sjeverne Hrvatske (100%). Plijesni roda *Fusarium* značajno su kolonizirale sve uzorke kukuruza (100%) te pšenice iz središnje Hrvatske (100%). Porast *Aspergillus* sekcije *Flavi* vidljiv je tek na ponekim uzorcima (10%).

Prema Pravilniku o sigurnosti hrane za životinje dozvoljena granica koncentracije plijesni po gramu kukuruzne prekrupe iznosi 30×10^3 CFU/g (NN/102/2016). Većina analiziranih uzoraka kukuruza (80%) pokazuje veće vrijednosti od dozvoljene te se prema razredu kvalitete smatraju loše kvalitetnim ili neprihvatljivim za hranidbu životinja. Uzorci ječma su uglavnom poželjne ili smanjene kvalitete, a manje od 10% uzoraka pšenice je bilo smanjene ili loše kvalitete. Porast kvasaca dominirao je na uzorcima ječma i pšenice te je većina uzoraka poželjne kvalitete.

Analizirani uzorci sadržavali su u velikom broju plijesni polja (*Fusarium*), posebice uzorci kukuruza, ali i plijesni skladišta (*Aspergillus* i *Penicillium*). Plijesni polja napadaju i oštećuju žitarice prije žetve, dok je usjev još u polju, a njihovom rastu pogoduje veća količina padalina. Mogu utjecati na izgled i kvalitetu žitarica te ukoliko se provodi kontrolna obrada prije skladištenja može se spriječiti rast plijesni u skladištu, ovisno o uvjetima čuvanja. Plijesni skladišta obično nisu jako zastupljene prije žetve te invadiraju u skladištu. Njihov rast ovisi o vlažnosti, temperaturi, duljini vremena skladištenja te stanju žitarica prije ulaska u skladište (Mohapatra i sur., 2017).

Izvešće Državnog hrvatskog meteorološkog zavoda o 2021. godini pokazuje pet toplinskih valova tijekom ljeta te veliku količinu oborina u listopadu i studenom. Odstupanja količine oborine u listopadu 2021. godine u odnosu na normalu 1981. – 2010. nalaze se u rasponu od 10 % višegodišnjeg prosjeka u Senju (13,0 mm oborine) do 221 % u Komiži (124,5 mm). Više temperature tijekom ljeta te manja količina padalina pogoduje rastu *Aspergillus* sekcije *Flavi*

te stvaranju aflatoksina dok visoke količine padalina tijekom jeseni olakšavaju porast roda *Fusarium* koji je u velikoj mjeri pronađen u uzorcima kukuruza (Pleadin i sur., 2020).

Vruće i suho ljeto 2021. dovelo je do visoke učestalosti aflatoksina u kukuruзу u Hrvatskoj i Srbiji. Najveća količina zabilježena je u uzorcima iz istočne Hrvatske te je iznosila 422,2 µg/kg (Pleadin i sur., 2023). Tijekom jeseni su prevladavale su normalne oborinske prilike, osim u krajnjem istoku Hrvatske gdje je pretežito vladalo kišno podneblje te također oko Siska u središnjoj Hrvatskoj gdje je zabilježeno vrlo kišno vrijeme. Utjecaj velike količine padalina na porast plijesni roda *Fusarium* vidljiv je na uzorcima iz središnje Hrvatske s učestalošću od 90 do 100% na DRBC agaru.

Prevenција štetnih učinaka mikotoksina treba započeti sprječavanjem rasta plijesni na žitaricama u polju, prilikom žetve, tijekom skladištenja i prerade hrane. Primjerice, plijesni roda *Fusarium* mogu kolonizirati kukuruz, stvarati mikotoksine i akumulirati se u žitarici sve dok se aktivitet vode ne smanji dovoljno da se kontrolira rast plijesni (Sanchis i sur., 2004). Stoga, trebaju se upotrebljavati procesi analize opasnosti i kontrole kritičnih točaka putem HAACP kako bi se utvrdila ulazna vrata mikotoksikotvornih plijesni u hranidbeni lanac (Pleadin i sur., 2020).

Strategija minimizacije kontaminacije uključuje upotrebu relativno otpornih kultivara, učinkovite poljoprivredne prakse prije žetve, primjenu bioloških ili kemijskih tretmana za štetočine, infekciju gljivicama i regionalno proučavanje vremenskih uvjeta. Kemijske metode uglavnom nisu najbolji odabir zbog negativnog učinka na nutritivna svojstva proizvoda te se koriste samo za smanjenje prisutnosti aflatoksina B1 u krmivima (Pleadin i sur., 2020).

S ciljem prevencije ulaska mikotoksikotvornih plijesni u hranidbeni lanac, potrebno je provesti sušenje, skladištenje sirovina te gotovih namirnica u uvjetima koji onemogućuju rast plijesni i produkciju mikotoksina. Tijekom sušenja žitarica treba se postići niža razina vlage od one potrebne za rast plijesni tijekom skladištenja. Aktivitet vode manji od 0,65 odgovara sadržaju vlage manjem od 15% što je značajno u prevenciji rasta plijesni koje bi mogle biti prisutne u svježem žitu, a već male promjene u udjelu vlage mogu povećati kontaminaciju plijesnima (Sanchis i sur., 2004).

Tijekom 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. Održavanje higijenskih uvjeta predstavlja kritičnu točku tijekom srednjoročnog i dugoročnog skladištenja te tijekom prijevoza robe, budući da se na globalnom tržištu sirovine i gotovi proizvodi prevoze na velike udaljenosti kroz različite klimatske uvjete. 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).

Uzgajivači kukuruza će doživjeti veći ekonomski gubitak zbog odbačenih ili uništenih usjeva s pretjerano visokom kontaminacijom mikotoksinima, potencijalno ostavljajući mnoge uzgajivače bez posla i ugrožavanje egzistencije drugih (Wu i sur., 2011). Već sada se koristi prediktivno modeliranje s ciljem identifikacije geografskih regija u kojima može doći do najvećeg utjecaja klimatskih promjena na mikotoksine i plijesni (Pleadin i sur., 2020). Pokušava se pronaći metoda koja će omogućiti dobivanje ranog upozorenja za rizik od neprihvatljivih razina mikotoksina, uključujući dostupne informacije o vremenskoj prognozi kako bi se smanjili ekonomski troškovi i izloženost plijesnima (Wu i sur., 2011).

Definirani su dugoročni planovi s ciljem predviđanja utjecaja klimatskih promjena na rast plijesni (Wu i sur., 2011) : 1) koristiti dostupne simulacije budućih klimatskih scenarija na regionalnoj razini kako bi se utvrdili uvjeti koji moraju biti ispitani u laboratoriju; (2) koristiti postojeće podatke te provesti nova istraživanja s ciljem prikupljanja podataka o tome kako klimatski uvjeti u budućnosti mogu utjecati na pojavnost različitih vrsta plijesni, koncentraciju mikotoksina i insekata; (3) razviti modele koji predviđaju razine aflatoksina, fumonizina i DON-a, posebice u kukuruzu u budućim klimatskim scenarijima; (4) odrediti utjecaj klime na budućnost hrane, ekonomske i zdravstvene rizike. Najveću pozornost i dalje treba dati ključnim rodovima plijesni : *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium* (Pleadin i sur., 2020).

6. ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje vodi do sljedećih zaključaka:

- Najveći porast plijesni zabilježen je na uzorcima kukuruza prikupljenim na području sjeverne Hrvatske ($2,8 \times 10^6$ CFU/g na DG-18 agaru te $5,3 \times 10^6$ CFU/g na DRBC agaru)
- Na uzorcima kukuruza koncentracije plijesni na DG-18 podlozi odgovaraju koncentracijama utvrđenim na DRBC dok su za ječam i pšenicu dobivene razlike u porastu plijesni ovisno o hranjivoj podlozi. Toj razlici najviše je pridonijela zastupljenost vrsta iz roda *Fusarium* i kvasci koji su bili više zastupljeni na DRBC podlozi
- Plijesni polja (*Fusarium*) značajno su kontaminirale analizirane uzorke, posebice uzorke kukuruza. U uzorcima su u velikoj mjeri pronađene su i plijesni roda *Aspergillus* te *Penicillium* (plijesni skladišta)
- Najučestalije plijesni pripadaju rodu *Penicillium* neovisno o vrsti korištene hranjive podloge
- Iduće po učestalosti bile su plijesni roda *Fusarium* čiji je rast dominirao na svim uzorcima kukuruza te uzorcima pšenice iz središnje Hrvatske (100%, DRBC). Zastupljenost je upečatljiva i na uzorcima kukuruza iz istočne te središnje Hrvatske (100%, DG-18)
- Iako se aflatoksini smatraju najvećom prijetnjom ljudskom zdravlju, u provedenom istraživanju rast je plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Flavi* zabilježen s maksimalnom učestalošću od tek 30% na uzorcima kukuruza iz istočne Hrvatske (DG-18)
- Narušenost kvalitete žitarica najviše je vidljiva na uzorcima kukuruza koji se smatraju čak neprihvatljivim za hranidbu životinja
- Cilj je postići prevenciju kontaminacije mikotoksinima te njihov ulazak u hranidbeni lanac. Bitno je osigurati pravilne uvjete za rast na polju te naposljetku skladištenje žitarice. Posebnu pozornost treba obratiti na kritične točke poput sušenja žitarica pri čemu treba izbjegavati oštećenja zrna te a_w održavati manjim od 0,65 s ciljem prevencije rasta plijesni.

7. LITERATURA

Awuchi GC, Ondari EN, Ogbonna CU, Upadhyay AK, Baran K, R.Okpala CO, Korzeniowska M, Guiné R. Mycotoxins Affecting Animals, Foods, Humans, and Plants: Types, Occurrence, Toxicities, Action Mechanisms, Prevention, and Detoxification Strategies—A Revisit. *Foods*, 2021, 10, 1279.

Battilani P, Toscano P, Van der Fels-Klerx HJ, Moretti A, Leggieri Camardo M, Brera C, Rortais A, Goumperis T, Robinson T. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. <https://www.nature.com/srep/>, 2016, pristupljeno 28.04.2023.

Bennet JW, Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16, 497-516.

Bryla M, Pierzgalski A, Zapaśnik A, Uwineza PA, Ksieniewicz-Woźniak E, Modrzewska M, Waśkiewicz A. Recent Research on Fusarium Mycotoxins in Maize—A Review. *Foods*, 2022, 11, 3465.

Czarnecka D, Czubacka A, Agacka- Moldoch M, Trojak-Goluch A, Księżak J. The Occurrence of Fungal Diseases in Maize in Organic Farming Versus an Integrated Management System. *Agronomy*, 2022, 12, 558.

Desai S, Dubey SC, Prasad RD. Impacts of climate change on Fusarium species vis-à-vis adaptation strategies. *Indian Phytopathology*, 2020, 73, 593-603.

Domijan AM. Rezultati nedavnih studija o mehanizmu neurotoksičnosti fumonizina B1. *Krmiva*, 2013, 55, 25-33.

Državni hidrometeorološki zavod, 2021, <https://meteo.hr/index.php>, pristupljeno 17.05.2023.

El-Sayes RA, Jebur AB, Kang W, Demerdash FM. An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2022, 2, 91-102.

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 H. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 2001, 167(2), 101–134.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerging infectious diseases*, 2004, 10, 14-9.

Kifer D, Sulyok M, Jakšić D, Krska R, Šegvić Klarić M. Fungi and their metabolites in grain from individual households in Croatia. *Food Additives & Contaminants*, 2021, 2, 98-109.

Kotowicz NK .The Importance of Fusarium Fungi in Wheat Cultivation – Pathogenicity and Mycotoxins Production: A Review. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2014, 21, 3326-3343.

Kushiro M. Historical review of researches on yellow rice and mycotoxigenic fungi adherent to rice in Japan. *JSM Mycotoxins*, 2015, 65, 19-23.

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

Medina A, Rodriguez A, Magan N. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5, 348.

Milani JM. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. *Veterinarni Medicina*, 2013, 58, 405-411.

Mirsam H, Kalqutny SH, Suriani, Aqil M, Azrai M, Pakki S, Muis A, Djaenuddin N, Wahid Rauf A, Muslimin. Indigenous fungi from corn as a potential plant growth promoter and its role in *Fusarium verticillioides* suppression on corn. *Heliyon*, 2021, 7, e07926.

Mohapatra D, Kumar S, Kotwaliwale S, Kumar Singh K. Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. *Industrial Crops and Products*, 2017, 108, 162-182.

Mycotoxins, 2018, <https://www.who.int/>, pristupljeno 26.04.2023.

Nnadi EN, Carter DA. Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PloS Pathogens*, 2021, 17, e1009503.

Omotayo O, Omotayo O, Mwanza M, Babalola O. Prevalance of Mycotoxins and Their Consequences on Human Health. *Toxicological Research*, 2019, 35(1). 1-7.

Paterson RRM, Lima N. Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International*, 2011, 44, 2555–2566.

Peraica M, Domijan AM. Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 2001, 52, 23-35.

Peraica M, Richter D, Rašić D. Mycotoxicoses in children. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 2014, 65, 347-363.

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, 1496.

Pleadin J, Frece J, Markov K. Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 2014, 9, 75-82.

Pleadin J, Kos J, Radić B, Vulić A, Kudumija N, Radović R, Janić Hajnal E, Mandić A, Anić M. Aflatoxins in Maize from Serbia and Croatia: Implications of Climate Change. *Foods*, 2023, 12, 548.

Pleadin J, Vulić A, Perši N, Šrivanko 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, Šrivanko 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 najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani, 2012, Zagreb, Narodne novine, broj 146 (NN/146/2012).

Pravilnik o sigurnosti hrane za životinje, 2016, Zagreb, Narodne novine, broj 102 (NN/102/2016).

Russel R, Paterson M, Lima N. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 2010, 43, 1902-1914.

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.

Sokolović M. Značaj trihotecenskih mikotoksina u hrani za perad. *Stočarstvo*, 2005, 59, 289-300.

Uredba komisije o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani, 2006, Službeni list Europske Unije, Republika Hrvatska, broj 1881 (SLL/1881/2006).

Vitanovski N, Sovilj D. Biološki agensi – nečujno oružje oko nas, jesmo li pripralni? *Policija i sigurnost*, 2017, 4, 375-385.

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.

Xue KS, Tang L, Sun G, Wang S, Hu X, Wang JS. Mycotoxin exposure is associated with increased risk of esophageal squamous cell carcinoma in Huaian area, China. *BMC Cancer*, 2019, 19, 1218.

Zingales V, Taroncher M, Martino PA, Ruiz M-J, Caloni F. Climate Change and Effects on Molds and Mycotoxins. *Toxins*, 2022, 14, 445.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Klimatske promjene postaju sve izraženije te ispoljavaju značajan učinak na rast plijesni i produkciju mikotoksina. Porast temperature i koncentracije ugljikovog dioksida uz promjene količine padalina vode do promjene bioraznolikosti mikrobioma te veće kontaminacije prehrambenih namirnica. Kolonizirani usjevi predstavljaju veliku štetu agrikulturalnom sektoru, ali i prijetnju ljudskom zdravlju.

Analizirano je 90 uzoraka žitarica iz skladišta u ožujku 2022., prikupljenih na području sjeverne, središnje i istočne Hrvatske. Istraživanje je pokazalo najveću koncentraciju plijesni na uzorcima kukuruza iz sjeverne Hrvatske na obje hranjive podloge ($2,8 \times 10^6$ CFU/g na DG-18 agaru te $5,3 \times 10^6$ CFU/g na DRBC agaru).

Superioran rast pokazale su plijesni roda *Penicillium* s prosječnom zastupljenošću iznad 50%. Iduće po učestalosti bile su plijesni roda *Fusarium* čiji je rast dominirao na uzorcima kukuruza. Porast plijesni roda *Cladosporium*, kao i kvasaca također je u većoj mjeri bio prisutan. Iako se aflatoksini smatraju najvećom prijetnjom ljudskom zdravlju, u provedenom istraživanju rast je plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Flavi* zabilježen s maksimalnom učestalošću od tek 30% na uzorcima kukuruza iz istočne Hrvatske (DG-18). Narušenost kvalitete žitarica najviše je vidljiva na uzorcima kukuruza koji se smatraju čak neprihvatljivim za hranidbu životinja.

Briga o ispravnom sušenju te skladištenju žitarica, kao i spriječavanje nastanka rana od strane insekata, kritične su točke životnog ciklusa žitarica. Zadržavanje kvalitete i sigurnosti žitarica može se postići osiguravanjem dobre poljoprivredne prakse (GAP) te pomoću sustava za očuvanje sigurnosti hrane (HAACP).

Utjecaj na industrijsku emisiju plinova može biti od ključne važnosti za prevenciju rasta plijesni te očuvanje ljudskog zdravlja, posebice uzimajući u obzir promjene koje se očekuju na razini klimatskih uvjeta.

SUMMARY

Climate changes are becoming more pronounced and have a significant effect on mold growth and mycotoxin production. An increase in temperature and concentration of carbon dioxide along with changes in the amount of rainfall lead to a change in the biodiversity of the microbiome and greater contamination of foodstuffs. Colonized crops represent a great damage to the agricultural sector, but also a threat to human health.

90 grain samples from warehouses in March 2022, collected in northern, central and eastern Croatia, were analyzed. The research showed the highest concentration of mold on corn samples from northern Croatia on both used media (2.8×10^6 CFU/g on DG-18 agar and 5.3×10^6 CFU/g on DRBC agar).

Superior growth was shown by the mold genera *Penicillium* with an average frequency above 50%. Next in order of frequency were molds of the genera *Fusarium*, whose growth dominated on the corn samples. The growth of molds of the genera *Cladosporium*, as well as yeasts, was also present to a greater extent. Although aflatoxins are considered the greatest threat to human health, in the present study, the growth of Aspergilli section *Flavi* was recorded with a maximum frequency of only 30% on corn samples from eastern Croatia (DG-18). The impairment of grain quality is most visible on corn samples that are considered even unacceptable for feeding animals.

Taking care of the drying and storage conditions as well as the prevention of wounding by insects, are critical points in the life cycle of grains. Maintaining the quality and safety of grains can be achieved by ensuring Good Agricultural Practices (GAP) and using the Hazard Analysis and Critical Control Point (HAACP).

The impact on industrial gas emissions can be of crucial importance for the prevention of mold growth and the preservation of human health, especially taking into account the expected changes in climate conditions.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

BIORAZNOLIKOST PLIJESNI NA ŽITARICAMA TIJEKOM SKLADIŠTENJA

Tea Škabić

SAŽETAK

Klimatske promjene postaju sve izraženije te ispoljavaju značajan učinak na rast plijesni i produkciju mikotoksina. Porast temperature i koncentracije ugljikovog dioksida uz promjene količine padalina vode do promjene bioraznolikosti mikrobioma te veće kontaminacije prehrambenih namirnica. Kolonizirani usjevi predstavljaju veliku štetu agrikulturalnom sektoru, ali i prijetnju ljudskom zdravlju.

Analizirano je 90 uzoraka žitarica iz skladišta u ožujku 2022., prikupljenih na području sjeverne, središnje i istočne Hrvatske. Istraživanje je pokazalo najveću koncentraciju plijesni na uzorcima kukuruza iz sjeverne Hrvatske na obje hranjive podloge (2,8 x 10⁶ CFU/g na DG-18 agaru te 5,3 x 10⁶ CFU/g na DRBC agaru).

Superioran rast pokazale su plijesni roda *Penicillium* s prosječnom zastupljenošću iznad 50%. Iduće po učestalosti bile su plijesni roda *Fusarium* čiji je rast dominirao na uzorcima kukuruza. Porast plijesni roda *Cladosporium*, kao i kvasaca također je u većoj mjeri bio prisutan. Iako se aflatoksini smatraju najvećom prijetnjom ljudskom zdravlju, u provedenom istraživanju rast je plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Flavi* zabilježen s maksimalnom učestalošću od tek 30% na uzorcima kukuruza iz istočne Hrvatske (DG-18). Narušenost kvalitete žitarica najviše je vidljiva na uzorcima kukuruza koji se smatraju čak neprihvatljivim za hranidbu životinja.

Briga o ispravnom sušenju te skladištenju žitarica, kao i spriječavanje nastanka rana od strane insekata, kritične su točke životnog ciklusa žitarica. Zadržavanje kvalitete i sigurnosti žitarica može se postići osiguravanjem dobre poljoprivredne prakse (GAP) te pomoću sustava za očuvanje sigurnosti hrane (HAACP).

Utjecaj na industrijsku emisiju plinova može biti od ključne važnosti za prevenciju rasta plijesni te očuvanje ljudskog zdravlja, posebice uzimajući u obzir promjene koje se očekuju na razini klimatskih uvjeta.

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

Rad sadrži: 31 stranicu, 8 grafičkih prikaza, 2 tablice i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

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

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. Dubravka Vitali Čepo, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

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

Rad prihvaćen: 28. lipnja 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Pharmacy
Department of Microbiology
Schrottova 39, I.kat, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

BIODIVERSITY OF MOULDS ON STORED CEREALS

Tea Škabić

SUMMARY

Climate changes are becoming more pronounced and have a significant effect on mold growth and mycotoxin production. An increase in temperature and concentration of carbon dioxide along with changes in the amount of rainfall lead to a change in the biodiversity of the microbiome and greater contamination of foodstuffs. Colonized crops represent a great damage to the agricultural sector, but also a threat to human health.

90 grain samples from warehouses in March 2022, collected in northern, central and eastern Croatia, were analyzed. The research showed the highest concentration of mold on corn samples from northern Croatia on both used media (2.8×10^6 CFU/g on DG-18 agar and 5.3×10^6 CFU/g on DRBC agar).

Superior growth was shown by the mold genera *Penicillium* with an average frequency above 50%. Next in order of frequency were molds of the genera *Fusarium*, whose growth dominated on the corn samples. The growth of molds of the genera *Cladosporium*, as well as yeasts, was also present to a greater extent. Although aflatoxins are considered the greatest threat to human health, in the present study, the growth of *Aspergilli* section *Flavi* was recorded with a maximum frequency of only 30% on corn samples from eastern Croatia (DG-18). The impairment of grain quality is most visible on corn samples that are considered even unacceptable for feeding animals.

Taking care of the drying and storage conditions as well as the prevention of wounding by insects, are critical points in the life cycle of grains. Maintaining the quality and safety of grains can be achieved by ensuring Good Agricultural Practices (GAP) and using the Hazard Analysis and Critical Control Point (HAACP).

The impact on industrial gas emissions can be of crucial importance for the prevention of mold growth and the preservation of human health, especially taking into account the expected changes in climate conditions.

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

Thesis includes: 31 pages, 8 figures, 2 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

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

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

Dubravka Vitali Čepo, Ph.D., Full 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: June 28, 2023

Popis slika i tablica

- Slika 1.** Koncentracija plijesni naraslih na DG-18 (A) i DRBC (B) podlogama iz uzoraka kukuruza sakupljenih u području središnje, sjeverne i istočne Hrvatske. _____ 10
- Slika 2.** Koncentracija plijesni u uzorcima ječma iz tri područja Hrvatske naraslih na DG-18 (A) i DRBC (B) agaru. _____ 11
- Slika 3.** Koncentracija plijesni u uzorcima pšenice na DG-18 (A) i DRBC (B) agaru iz tri područja Hrvatske. _____ 12
- Slika 4.** Koncentracija plijesni poraslih na DG-18 agaru iz uzoraka triju žitarica prikupljenih na području srednje, sjeverne i istočne Hrvatske. _____ 13
- Slika 5.** Koncentracija plijesni poraslih na DRBC agaru iz uzoraka triju žitarica prikupljenih na području srednje, sjeverne i istočne Hrvatske. _____ 13
- Tablica 1.** Učestalost plijesni (%) naraslih na DG-18 agaru iz uzoraka žitarica prikupljenih iz sjeverne (SJHR), središnje (SRHR) i istočne (ISHR) Hrvatske. _____ 15
- Tablica 2.** Učestalost plijesni (%) naraslih na DRBC agaru iz uzoraka žitarica prikupljenih iz sjeverne (SJHR), središnje (SRHR) i istočne (ISHR) Hrvatske. _____ 17