

# Razvoj plijesni na žitaricama za vrijeme skladištenja

---

**Tudorović, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:496550>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Lucija Tudorović**

**Razvoj plijesni na žitaricama za vrijeme  
skladištenja**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na uloženom vremenu i trudu te pruženoj pomoći u svakom koraku izrade ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem svojoj obitelji na velikoj podršci i strpljenju tijekom cijelog razdoblja mog studiranja. Hvala i posebnim prijateljicama bez kojih bi ovih pet godina bilo nezamislivo.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Mikotoksini i plijesni.....	1
1.1.1. Rod <i>Aspergillus</i> .....	1
1.1.2. Rod <i>Fusarium</i> .....	2
1.1.3. Rod <i>Penicillium</i> .....	4
1.2. Mikotoksini u žitaricama.....	5
1.2.1. Kukuruz.....	6
1.2.2. Pšenica.....	7
1.2.3. Ječam.....	7
1.3. Klimatske promjene.....	8
1.3.1. Utjecaj na različite regije.....	8
1.3.2. Utjecaj na plijesni i mikotoksine žitarica.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Materijali.....	14
3.1.1. Priprema peptonske vode i hranjivih podloga.....	14
3.1.2. Uređaj.....	15
3.2. Metoda.....	15
3.2.1. Uzorkovanje.....	15
3.2.2. Mikološka analiza.....	15
3.2.3. Statistička obrada podataka.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
4.1. Rezultati.....	18
4.1.1. Usporedba istih vrsta žitarica iz različitih regija.....	24
4.1.2. Usporedba svih vrsta žitarica po regijama.....	27
4.2. Rasprava.....	29
5. ZAKLJUČAK.....	33
6. LITERATURA.....	34
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	37

Temeljna dokumentacijska kartica

Basic documentation card

## 1. UVOD

### 1.1. Mikotoksini i plijesni

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni u čije najvažnije predstavnike ubrajamo aflatoksine, trihotecene, fumonizine, zearalenon, okratoksin A i ergot alkaloide. Intoksikacije ovim metabolitima nazivaju se mikotoksikoze, a mogu biti prisutne u ljudi i životinja te izazvati teške zdravstvene probleme i smrt (CAST, 2003). Njihovu proizvodnju potiču različiti faktori stresa iz okoliša pa ona stoga ovisi o prilagodbi plijesni na postojeće klimatske i okolišne uvjete (Ráduly i sur., 2020). Najveću količinu ovih mikotoksina stvaraju plijesni rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. Oni kontaminiraju hranu i prehrambene sirovine zbog čega je njihova rasprostranjenost i zastupljenost predmet proučavanja brojnih studija. Najviše su kontaminirane žitarice, uglavnom kukuruz i pšenica, te različiti orašasti plodovi (Perrone i sur., 2020). Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (Food and Agricultural Organization, FAO) pretpostavlja da je 25% prehrambenih usjeva svijeta kontaminirano mikotoksinima (Navale i sur., 2021).

#### 1.1.1. Rod *Aspergillus*

Vrste roda *Aspergillus* raširene su po cijelom svijetu, no najviše u tropskim i suptropskim područjima pri uvjetima visoke temperature i niskog aktiviteta vode (Perrone i sur., 2020). Ovaj rod plijesni proizvodi primarno aflatoksine i okratoksin A, a kontaminira najviše kukuruz, pamuk, kikiriki i neke druge orašaste plodove kao i mliječne proizvode te svježe i sušeno voće i povrće (CAST, 2003). Radi se rodu od nekoliko stotina vrsta koje se šire nesporno putem spora nastalim u višestaničnim tvorevinama konidioforama. Možemo ih podijeliti u čak 19 sekcija od kojih su neke od značajnijih sekcije *Aspergillus*, *Flavi*, *Nigri* i *Circumdati*. (Park i sur., 2017). *Aspergillus* vrste najbolje rastu na temperaturama između 23°C i 26°C, a proizvodnja mikotoksina ovih plijesni uvjetovana je različitim parametrima uključujući još i aktivitet vode, pH i dostupnost nutrijenata (Battilani i sur., 2009).

Aflatoksini su najproučavanija i široko zastupljena skupina mikotoksina. Najviše ih proizvode vrste *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* i *Aspergillus pseudotamarii*, a javljaju se u više od 20 različitih tipova od kojih su najopasniji za ljude i životinje tipovi B1, B2, G1 i G2 (Ráduly i sur., 2020). Po svojoj strukturi furanokumarinski su spojevi i ostvaruju genotoksično, hepatotoksično, mutageno, teratogeno i karcinogeno djelovanje. Aflatoksini B2 i G2 su bezopasni dok se ne metaboliziraju u toksine B1 i G1 (Navale i sur., 2021). Aflatoksin B1 je najpotentniji poznati prirodni karcinogen i najznačajniji

aflatoksin (Battilani i sur., 2009). U toksične metabolite transformiraju se uglavnom putem CYP450 enzima u jetri, pa se tako u jetri aflatoksin B1 metabolizira do aflatoksina M1 koji se može izlučiti u majčino mlijeko u ljudi i životinja. Organ koji je najviše pogođen njihovim djelovanjem upravo je jetra koja može biti zahvaćena akutnim ili kroničnim bolestima. Pokazalo se da akutne aflatoksikoze mogu dovesti do smrti, a kronična izloženost dovodi do raka, imunosupresije i razvoja drugih patoloških stanja (Raduly i sur., 2020). Karcinogeni učinak postižu tako da metaboliti ovih mikotoksina formiraju kovalentne veze s dušikom na položaju N-7 u gvaninskom prstenu DNA dok se citotoksični učinak očituje indukcijom lipidne peroksidacije u jetri, što su pokazali eksperimenti na štakorima, koja dovodi do oksidativnih oštećenja hepatocita (Hussein i Brasel, 2001).

Okratoksin A najviše proizvode vrste *A. ochraceus*, *A. carbonarius* i *A. niger*. Može se detektirati na poljoprivrednim područjima diljem svijeta kao mikotoksin žitarica, orašastih plodova, sušenog voća, kakaa ili kave. Posebno je široko rasprostranjen zbog sposobnosti vrste *A. ochraceus* da ga sintetizira pri temperaturama od 12°C do 37°C, a dodatno ga proizvodi i jedna vrsta roda *Penicillium* na temperaturama do 31°C (Lee i Ryu, 2017). Radi se o spoju s dihidrokumarinskom strukturom koji pokazuje karcinogena, nefrotoksična, hepatotoksična, embriotoksična, teratogena, neurotoksična, imunotoksična i genotoksična svojstva. U čovjeka često uzrokuje rak i oštećenje ili zatajenje bubrega te je poznat slučaj tzv. balkanske endemske nefropatije. Radi se o brojnim slučajevima nefropatije primijećenima dvadesetih godina prošlog stoljeća na području balkanskih zemalja, uključujući Hrvatsku, čijim se uzročnikom smatra upravo okratoksin A. Ovaj toksin može stvarati kovalentne adukte s molekulom DNA ili izazvati njena oksidativna oštećenja te dovesti do stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva odgovornih za citotoksičnost. Nefrotoksičnost, hepatotoksičnost i imunotoksičnost povezuju se s inhibicijom sinteze proteina, lipidnom peroksidacijom i promjenama u kaskadi signalnog puta MAP kinaze (Raduly i sur., 2020).

### **1.1.2. Rod *Fusarium***

Vrste roda *Fusarium* prvenstveno su proizvođači deoksinivalenola i drugih trihotecena, fumonizina te zearalenona, adaptirane su na različite uvjete širokog raspona te ih nalazimo po cijelom svijetu (Perrone i sur., 2020). Ipak, postoje geografske razlike u zastupljenosti ove plijesni i njihovih mikotoksina koje su uzrokovane okolišnim čimbenicima, načinom uzgoja usjeva i različitim metodama skladištenja (Battilani i sur., 2009). Ove plijesni među najznačajnijim su biljnim patogenima, a inficiraju pšenicu, ječam, zob, rižu, kukuruz, krumpir te brojne druge biljne vrste. Za lakše širenje prirodom *Fusarium* vrste imaju dugačke

višestanične makrokonidije dok neke vrste imaju i manje, uglavnom jednostanične, mikrokonidije. Također, kod nekih se javljaju i klamidospore ključne za dugoročno preživljavanje (Nešić i sur., 2014). Nakon žetve mogu preživjeti u ostacima usjeva u prirodi što predstavlja inokulum za usjeve sljedeće godine. Takva kontaminacija nastoji se priječiti provođenjem i razvijanjem kontrolnih strategija kao što su duboka obrada tla, navodnjavanje tijekom razdoblja suše, uzgoj biljnih vrsta rezistentnih na patogene i insekte te genetski inženjering (CAST, 2003). Plijesni ovog roda toksine proizvode najviše pri uvjetima visoke vlage te u ili blizu vremena žetve. Količina proizvedenih toksina ovisi o fizikalnim faktorima kao što su relativna vlažnost, temperatura i mehanička oštećenja, o kemijskim faktorima od kojih su najznačajniji prisutnost ugljikovog dioksida, kisika i korištenost pesticida te o biološkim faktorima poput biljne raznolikosti, stresa, insekata i količine spora. *Fusarium* toksini su stabilni pri visokim temperaturama i tijekom skladištenja, procesiranja i kuhanja namirnica (Nešić i sur., 2014).

Trihoteceni su velika skupina koju čini skoro 150 različitih mikotoksina koje dijelimo na tip A i tip B trihotecene. U svojoj strukturi imaju seskviterpenske prstene, a drugačiji tipovi razlikuju se po prisutnosti karbonilne ili kisikove funkcionalne skupine na položaju C-8. Najviše se ističu deoksinivalenol kao tip B mikotoksina i T-2 toksin koji spada u mikotoksine tipa A. Proizvodnja različitih tipova ovih mikotoksina karakteristična je za pojedine vrste. Tako tip A mikotoksina najviše proizvode *F. sporotrichioides* i *F. poae*, a tip B proizvode primarno *F. culmorum* i *F. graminearum* (Battilani et al., 2009). Trihoteceni su se pokazali potentnim inhibitorima sinteze proteina, RNA i DNA. Također, remete transmembranski transport u stanicama, dovode do supresije imunskog odgovora i abnormalnosti u krvi. Studije su pokazale da stoga djeluju kao gastrointestinalni toksini, dermatotoksini, imunotoksini, hematotoksini i genski toksini (Hussein i Brasel, 2001). Deoksinivalenol, još nazvan i vomitoksin, jedan je od najraširenijih i najproblematičnijih trihotecena po pitanju kontaminacije prehrambenih proizvoda. Studije na životinjama pokazale su da najviše pogađa gastrointestinalni sustav, tj. dovodi do povraćanja, smanjenog unosa ili potpunog odbijanja hrane te smanjenja na težini. Također, ima teratogeni i imunosupresivni učinak (Lee i Ryu, 2017).

Fumonizini su mikotoksini koje najviše proizvode vrste plijesni *F. proliferatum* i *F. verticillioides*. Ovi toksini imaju dugi ugljikovodični lanac za koji se smatra da igra ulogu u njihovoj toksičnosti. Dijelimo ih na šest različitih tipova u koje spadaju A1, A2, B1, B2, B3 i B4, a razlikuju se strukturno po tome što su tip A amidi, a tip B amini. Najznačajniji po pitanju toksičnosti i rasprostranjenosti je fumonizin B1. Intoksikacije ovim mikotoksinima dovele su

do slučajeva leukoencefalomalacije u konja, plućnih edema u svinja te disfunkcija jetre i bubrega u različitim životinjskih vrsta (Nešić i sur., 2014). Fumonizini se smatraju citotoksičnima i karcinogenima, no mehanizmi njihovog djelovanja nisu u potpunosti razjašnjeni. Pretpostavlja se da fumonizin B1 inhibira metabolizam sfingolipida preko inhibicije enzima N-acetiltransferaze te da inhibira druge unutarstanične enzime kao što su protein fosfataze i arginosukcinat sintetaza. Na taj način pokazuje svoju citotoksičnost inhibicijom metabolizma sfingolipida i proteina te inhibicijom ciklusa ureje. Karcinogenost uzrokuje akumulacijom sfingolipida i promjenama u signalnim putevima preko cAMP-a i protein kinaze C (Hussein i Brasel, 2001).

Zearalenon je fitoestrogeni mikotoksin kojeg primarno proizvodi vrsta *F. graminearum*, ali i *F. culmorum*. Uvjeti koji pogoduju proizvodnji ovog mikotoksina su visok udio vlage i niske temperature (CAST, 2003). Nalazimo ga najviše u žitaricama kao što su kukuruz, pšenica, raž i zob, a smatra se karcinogenim, genotoksičnim, hepatotoksičnim i imunosupresivnim mikotoksinom (Lee i Ryu, 2017). Studije na svinjama pokazale su da se nakon ingestije i apsorpcije zearalenon metabolizira u derivate koji se zatim glukuroniraju, a svoj toksični učinak postiže vezanjem na estrogene receptore potičući o estrogenu ovisnu transkripciju u jezgri. Toksične estrogene učinke ima na reproduktivni sustav jer može dovesti do smanjenja plodnosti, poremećaja u koncentracijama progesterona i estradiola, poremećaja hipofize, adrenalne i tiroidne žlijezde, no na životinjama nisu uočeni teratogeni učinci. Neka istraživanja pokazala su moguć potencijal zearalenona da stimulira rast stanica raka dojke u čovjeka (Nešić i sur., 2014).

### **1.1.3. Rod *Penicillium***

Vrste roda *Penicillium* proizvode okratoksin A, patulin i citrinin, U ovih vrsta tvorba mikotoksina moguća je u širokom temperaturnom rasponu i na različitim staništima (Perrone i sur., 2020). Za ovaj rod je više karakteristična kontaminacija tijekom skladištenja usjeva nego kontaminacija prije žetve. Produkcija mikotoksina može se odvijati pri različitim temperaturama dok su prikladni uvjeti vlage drugačiji za različite vrsta ovog roda. Tako neke vrste mogu kolonizirati domaćina samo pri uvjetima vlage višim od 90% dok neke to mogu i pri sušnim uvjetima. *Penicillium* vrste također su iznimno kompetitivne s drugim plijesnima (CAST, 2003). One rastu brzo, a lako se šire zrakom putem spora koje stvaraju. Radi se o oportunističkim patogenima, striktno aerobnima, od kojih su neki specijalizirani kao patogeni voća. Većina vrsta ovog roda sposobna je stvarati mikotoksine (Perrone i Susca, 2017).



Okratoksin A najznačajniji je produkt roda *Penicillium* po pitanju kontaminacije žitarica, a najviše ga proizvodi vrsta *P. verrucosum* (Raduly i sur., 2020).

Patulin je mikotoksin najviše prisutan u jabukama i proizvodima koje ih sadrže, a izoliran je gotovo isključivo iz uzoraka kontaminiranih vrstom *P. expansum* (CAST, 2003). Rast i proizvodnja patulina kod ove vrste ovise o različitim endogenim i egzogenim faktorima, a najvažniji su temperatura, aktivitet vode, pH i plinoviti sastav zraka. Za njegovu sintezu je pogodan temperaturni raspon od 0°C do 24°C (Baert i sur., 2007). Patulin je toksin za koji nema dokaza o karcinogenom učinku u čovjeka, no genotoksičan je i ima antibiotska svojstva. Pokazalo se da djeluje immunosupresivno te dovodi do ulceracija i hemoragija (Paterson i sur., 2004). To je posljedica njegove sposobnosti da dovede do razvoja reaktivnih kisikovih spojeva, poremećaja staničnog ciklusa i oštećenja DNA molekule u organizmu (Perrone i Susca, 2017).

## 1.2. Mikotoksini u žitaricama

Kontaminacija žitarica plijesnima jedan je od najznačajnijih problema koji se moraju uzeti u obzir tijekom njihovog uzgoja, ali i prerade te skladištenja. Putem žitarica mikotoksini koje plijesni proizvode dopijevaju u hranu ljudi i životinja pri čemu mogu dovesti do ozbiljnih posljedica po njihovo zdravlje. Plijesni mogu proizvesti mikotoksine u povoljnim uvjetima temperature i vlage, bilo prije žetve ili tijekom skladištenja. Pojava mikotoksina na nekom prostoru ovisi o njegovom geografskom smještaju i meteorološkim uvjetima, a dobra poljoprivredna praksa i dobra proizvođačka praksa u rukovanju, skladištenju, preradi, transportu i distribuciji žitarica također u tome igraju značajnu ulogu (Perrone i sur., 2020). Plijesni mikotoksine proizvode ovisno o klimi, potencijalnim bolestima biljke i uvjetima skladištenja te faktorima kao što su dostupnost mikronutrijenata i šteta nastala od kukaca i drugih štetoina. Za samo skladištenje ključni su odgovarajući uvjeti temperature, količine vlage i plinovitog sastava zraka. Problemi skladištenih žitarica započinju s velikom količinom kiše neposredno prije žetve i nedostatnim sušenjem usjeva, a nastavljaju se tijekom skladištenja i kasnije u konzumaciji od strane potrošača (Paterson i Lima, 2011). Ipak, u prerađenim proizvodima nalaze se manje količine mikotoksina nego u sirovinama pa je rizik za potrošače tu manji.

Prema radu Patersona i Lime (2011) svaka grupa mikotoksina ima optimalne temperature za svoju sintezu. Tako su za aflatoksine to 33°C, za fumonizine raspon od 15°C do 30°C, za deoksinivalenol 26°C kod vrste *F. culmorum*., a 30°C kod vrste *F. graminearum*, a za okratoksin A radi se o rasponu od 25°C do 30°C. Patogene plijesni koje kontaminiraju usjeve prije žetve obično zahtijevaju više razine vlage (200-250 g/kg) kako bi ih uspješno inficirale

od drugih plijesni koje sirovine inficiraju tijekom skladištenja (130-180 g/kg). To znači da su sve sirovine s udjelom vlage iznad 130 g/kg podložne kontaminaciji plijesnima koje proizvode mikotoksine (Nešić i sur., 2014).

Koje plijesni se razvijaju na žitaricama ovisi o sljedećim čimbenicima: različite vrste plijesni preferiraju pojedine vrste žitarica, žitarice također imaju različitu podložnost ili rezistenciju prema različitim vrstama plijesni, istu žitaricu može napasti više plijesni što rezultira multi-mikotoksinskom kontaminacijom, a dodatno na sve još utječu i klimatski faktori, posebice temperatura, aktivitet vode i razina ugljikovog dioksida (Perrone i sur., 2020).

### 1.2.1. Kukuruz

Kukuruz je jedna od žitarica koje su najpodložnije mikotoksikozama bez obzira na stanište na kojemu raste. Eksperimentalni podaci različitih studija pokazali su da su mikotoksini koje najčešće možemo pronaći u uzorcima kukuruza aflatoksini, okratoksin A, deoksinivalenol i drugi trihoteceni, zearalenon i fumonizini. Ovu žitaricu najviše kontaminiraju plijesni roda *Fusarium* kao što su *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* i *F. subglutinans* te plijesni roda *Aspergillus*, posebice sekcija *Flavi*. Oni dovode do fuzarioza i aspergiloza, a najčešće se radi o pljesnivosti kukuruznog klipa (Battilani i Logrieco, 2014).

Dva su tipa fuzarioza kukuruza, a to su ružičasta i crvena pljesnivost klipa kukuruza. Ružičastu fuzariozu uzrokuju uglavnom predstavnici sekcije *Liseola* kao što su *F. verticillioides*, *F. proliferatum* i *F. subglutinans* i ona se javlja u sušnijim i toplijim klimama južne Europe. Do crvene fuzarioze najčešće dovode predstavnici sekcije *Discolor* kao što su *F. Graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* i *F. avenaceum*, a dominantna je na područjima za koje su karakteristične velike količine padalina i niska temperatura tijekom ljeta i rane jeseni (Battilani i sur., 2009). Tri su puta infekcije kojima može doći do razvoja ružičaste pljesnivosti kukuruza, a to su prijenos konidija plijesni zrakom ili tekućinom na kukuruz, sistemski rast patogena preko stabljike i infekcija putem oštećenja koje je uzrokovao insekt koji je prenosio sporu. Simptomi infekcije uočljivi su kao plijesan bijele do ružičaste boje na klipu kukuruza koja se može širiti, a moguće je i da zahvati samo nasumično zrno ili grupu zrnja koja onda poprime smeđu boju. Ova fuzarioza praćena je proizvodnjom visokih koncentracija fumonizina B1. Spore plijesni koje uzrokuju crvenu fuzariozu prenose se uglavnom kišom, a zahvaćaju kukuruznu svilu i klip kukuruza što je uočljivo kao plijesan crvenkaste boje. Za nju je karakteristična proizvodnja visokih koncentracija deoksinivalenola.

Aspergiloza koja se često javlja na kukuruzu također se odnosi na pljesnivost klipa kukuruza, a uzrokovana je najčešće vrstama *A. flavus* i *A. parasiticus*. Kontaminaciji pogoduju visoke

temperature i sušni uvjeti, a najviše se sintetiziraju aflatoksini. Zahvaćeni su klip i svila kukuruza uz uočljivu plijesan žutozelene boje (Battilani i Logrieco, 2014). Konidije ovih plijesni mogu vjetrom ili insektima biti prenesene na kukuruz te pri odgovarajućim uvjetima doći do klasa i zrna kukuruza gdje mogu uzrokovati infekciju. Proizvodnja aflatoksina u zrnju kukuruza može se odvijati dok razina vlage ne dosegne vrijednost od 15% (CAST, 2003).

### **1.2.2. Pšenica**

Pšenica je jedna od plijesnima najviše kontaminiranih žitarica koja ima prehrambenu važnost za čovjeka. Njeni uzorci najčešće su pokazali prisutnost mikotoksina kao što su okratoksin A, deoksinivalenol i drugi trihoteceni te zearalenon (Perrone i sur., 2020). Bolest kojom je ova žitarica najčešće zahvaćena naziva se palež klasa pšenice. Radi se o fuzariozi uzrokovanoj vrstama plijesni kao što su *F. graminearum* i *F. culmorum*. Mikotoksin koji proizvode u najvišim koncentracijama je deoksinivalenol, no javljaju se i HT-2 i T-2 toksini, zearalenon i fumonizini. Ova bolest uzrokuje slabiju kvalitetu i značajne manjke u količini dobivene sirovine nakon žetve (van der Fels-Klerx i sur., 2021). Kontaminaciji odgovaraju topli i vlažni uvjeti s čestim padalinama, a *Fusarium* spp. može zaraziti cijeli klas ili samo njegov dio. Pri infekciji na klasu pšenice uočljiva je prevlaka ružičaste do narančaste boje (Battilani i Logrieco, 2014).

### **1.2.3. Ječam**

Ječam je žitarica koja se uzgaja diljem svijeta i sastavnica je brojnih namirnica, ali i proizvoda kao što je pivo. Na taj način velik broj ljudi izložen je potencijalnim mikotoksikozama konzumacijom ovih proizvoda. Plijesan koja ga najčešće kontaminira je *Fusarium* spp., a istraživanja su pokazala i kontaminaciju drugim rodovima kao što su *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. Najčešća fuzarioza koja pogađa ječam je palež klasa žitarice koja je u Europi uzrokovana vrstama *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* i *F. poae*. Najvažniji mikotoksini povezani s ovom fuzariozom su trihoteceni T-2, HT-2 i deoksinivalenol (Beccari i sur., 2016). Javljaju se još i aspergiloze najznačajnije po proizvodnji aflatoksina i okratoksina A.

Dopušteni sadržaj ovih mikotoksina u žitaricama za konzumaciju određen je regulativom Europske unije 1881/2006 i njezinom dopunom tj. regulativom 1126/2007. Limiti su 4000 g fumonizina B1 i fumonizina B2, 1750 g deoksinivalenola i 5 g aflatoksina B1 po kilogramu neprerađenog kukuruza za ljudsku konzumaciju; 1250 g deoksinivalenola po kilogramu

neprerađene meke pšenice i 1750 g deoksinivalenola po kilogramu neprerađene durum pšenice; i 5 g okratoksina A po kilogramu neprerađenih žitarica (Battilani i Logrieco, 2014).

### **1.3. Klimatske promjene**

Klimatske promjene prihvaćene su od strane većine znanstvenika i možemo ih smatrati neizbježnima. Budući da su klimatski uvjeti jedan od glavnih faktora koji određuje rast plijesni i proizvodnju mikotoksina, možemo očekivati da će one dovesti do bitnih promjena i tako utjecati na opskrbni sustav i sigurnost hrane u cijelom svijetu. Međutim, teško je predvidjeti kako će se točno klimatske promjene odvijati i stoga još teže kvantificirati njihove posljedice. Najznačajniji bit će njihov utjecaj na temperaturu, padaline i razinu plinova u atmosferi. Atmosferska koncentracija ugljikovog dioksida ubrzano se povisuje i predviđa se da će u drugoj polovici ovoga stoljeća dostići dvostruko više vrijednosti od preindustrijskih. Također, povećavaju se razine metana, dušikovog oksida i klorofluorouglijaka. Staklenički plinovi i njihove koncentracije mogu se točno izmjeriti, no puno je teže odrediti temperaturne promjene. Za njihovo mjerenje mogu se koristiti različiti biološki i fizički faktori, ali samo oni za koje se sa sigurnošću može reći da koreliraju s temperaturom (Russell i sur., 2010). Pretpostavlja se da će se temperatura podići za otprilike 4°C u sljedećih sto godina. To će imati utjecaj na prinos usjeva i sezonske varijacije, promjene u kvaliteti tla tj. manjak minerala i varijacije u njihovoj bioraspoloživosti te promjene u mikroorganizmima i njihovim ekosistemima (Paterson i Lima, 2011). Puno se ulaže u razvoj različitih prognostičkih programa koji će pomoći u predviđanju učinaka klimatskih promjena, a cilj je razviti sustav koji će moći detektirati i prepoznati razvoj novih mikroorganizama i mikotoksina na određenim područjima uslijed klimatskih promjena (Russell i sur., 2010).

#### **1.3.1. Utjecaj na različite regije**

Toplije vrijeme, toplinski valovi, više padalina ili suša moguće su posljedice klimatskih promjena i različito će utjecati na plijesni u različitim dijelovima svijeta. Zato je ključno pokušati predvidjeti učinke klimatskih promjena.

Identificirana su dva glavna izgledna događaja: više uzgoja žitarica u trenutno hladnim klimama i manje uzgoja u trenutno toplim područjima. Na temelju toga mogu se predvidjeti dva scenarija utjecaja na plijesni i mikotoksine. (1) Prvi scenarij odnosi se na regije u kojima će se povećati uzgoj žitarica. U prvom slučaju (a1) može se razviti: proporcionalno više mikotoksina prema količini usjeva, više od proporcionalno ili manje od proporcionalno, ali svejedno više od trenutne količine mikotoksina. U drugom slučaju (b1) ovog scenarija razvija se jednaka količina

mikotoksina na veću količinu usjeva, a u trećem slučaju (c1) smanjuje se količina mikotoksina na veću količinu usjeva, no to bi morala biti vrlo specifična situacija s npr. genetskim modificiranim žitaricama. (2) Drugi scenarij odnosi se na regije u kojima će doći do smanjenog uzgoja žitarica. Analogno prvom scenariju moguća su tri slučaja: (a2) s manjom količinom mikotoksina, (b2) s jednakom količinom i (c2) s većom količinom mikotoksina po količini usjeva, no posljednje je manje izgledno. U slučaju povećanog prinosa usjeva i povećane količine mikotoksina važno je naglasiti da je moguće da ukupna kvaliteta usjeva bude manja zbog više mikotoksina po jedinici težine usjeva. Također, u tim klimama pogoršat će se uvjeti skladištenja. S druge strane u trenutno toplim klimama smanjenje uzgoja žitarica uz smanjenu količinu mikotoksina može ponovno uzrokovati njihovu slabiju kvalitetu zbog stresa uzrokovanog klimatskim promjenama i time veće količine mikotoksina po jedinici težine usjeva. U ovakvim klimama vrući i suhi uvjeti mogli bi biti povoljni za skladištenje (Paterson i Lima, 2011).

U Europi nailazimo na različite klime te će svaka na klimatske promjene reagirati na drugačiji način. Visoka temperatura smanjit će dostupnost vode i prinose žetve na jugu. Doći će do promjena u kvaliteti zemlje, erozije i ispiranja minerala iz tla. Povišenje temperature dovest će do polarne disperzije biljnih vrsta, a u submediteranskim zemljama moguće je povećanje količine aflatoksina i okratoksina A. Južna Europa vjerojatno će doživjeti manjak proljetnih žitarica i značajno smanjenje količine kukuruza, no očekuje se da će se proizvodnja kukuruza povećati od 30% do 50% u sjevernijim područjima. U južnoj i jugoistočnoj Europi očekuje se povećanje temperature od 4°C do 5°C stupnjeva i smanjenje dostupnosti vode što može dovesti do manjih prinosa žitarica, suše, toplinskih valova, degradacije tla i ekosistema te dezertifikacije. Suša i vrućina općenito mogu povisiti razine aflatoksina što je iznimno opasno budući da ih većina smatra najopasnijim mikotoksinima. Zapadne Europske zemlje doživjet će povišenje od 2,5°C do 3,5°C s dužim i sušim ljetima, a zime će imati više nevremena i poplava. Povišenje temperature u srednjoj Europi bit će od 3°C do 4°C uz više padalina zimi, a manje ljeti, uz veći rizik od poplava. Ipak, u nekim zemljama će dulje sezone povoljno utjecati na usjeve. Sjeverna Europa doživjet će povišenje temperature od 3°C do 4,5°C i 40% više padalina uz povećan rizik od poplava. U tim krajevima moguć je uzgoj više žitarica i time veći prinosi (Paterson and Lima, 2011).

### **1.3.2. Utjecaj na plijesni i mikotoksine žitarica**

Kratkoročne sezonske fluktuacije koncentracija mikotoksina mogle bi maskirati dugoročne učinke klimatskih promjena. S druge strane učinak klimatskih promjena mogao bi smanjiti

ozbiljnost njihovih posljedica u slučaju da temperature budu previsoke za rast nekih plijesni i time njihovu produkciju. Osim temperature, vlaga i sunčeva svjetlost utječu na mogućnost preživljavanja mikroorganizama. Promjene u načinu uzgoja žitarica i poljodjelstvu mogle bi dovesti do opasnosti od drugih patogenih vrsta koje inače nisu bile poznate po proizvodnji mikotoksina. Mora se uzeti u obzir i moguća povećana podložnost biljaka bolestima u uvjetima povišene razine ugljikovog dioksida, no zasad nema dovoljno podataka kako bi se to sa sigurnošću moglo tvrditi. Plijesni se također mogu širiti putem kukaca kao vektora pa treba uzeti u obzir i kako će promjena temperature utjecati na obrazac hranjenja kukaca (Russell i sur., 2010). Pri višim temperaturama izgledna je pojava većeg broja insekata koji sudjeluju u prijenosu plijesni, a više insekata može značiti više ptica koje se njima hrane, a koje nanose štetu usjevima. Također, moguća je i pojava tzv. fenomena izgubljenih parazita koji se događa prijenosom žitarica u nova područja uzgoja što će se zasigurno dogoditi u narednim godinama. Gubitak prijašnjih štetočina prednost je za plijesni jer omogućuje njihovo masovno širenje. Sve više razine mikotoksina omogućavaju pojavu „mutiranih“ mikotoksina. To može dovesti do mutiranih plijesni koje ponovno mogu utjecati na količinu i karakteristike novonastalih mikotoksina, a oni iznova mogu mutirati i tako dovesti do neprekidnih cikličkih promjena (Paterson i Lima, 2011).

Kontaminacija žitarica mikotoksinima može se dogoditi za vrijeme ili nakon sazrijevanja biljke što odgovara razdobljima prije i poslije žetve. Sazrele žitarice mogu biti izložene toplim i vlažnim uvjetima u polju, tijekom transporta i u skladištima. Takvi uvjeti posebno pogoduju plijesnim koje proizvode aflatoksine, primjerice *A. flavus* zastupljeniji je na temperaturama iznad 25°C nego iznad 20°C što znači da na višim temperaturama proizvodi i više aflatoksina. Ključni okolišni faktori za razvoj mikotoksina osim temperature još su i dostupnost vode i sastav zraka. Do kvarenja tijekom skladištenja ne bi trebalo doći ako je razina vlage tj. vrijednost aktiviteta vode ispod 0,70. Klimatske promjene u određenim regijama pomažu u održavanju ovakvih uvjeta i trebale bi osigurati prikladno skladištenje, no u drugim područjima mogući su veći energetske troškovi kako bi se to osiguralo (Russell i sur., 2010).

Najveći rizik u pogledu mikotoksina nakon značajnih klimatskih promjena imat će razvijene zemlje umjerene klime. Ta područja će dosegnuti temperature od 33°C što je slično optimalnoj temperaturi za razvoj aflatoksina. Činjenica da su to najopasniji mikotoksini dodatno pridonosi riziku. Zemlje s trenutno hladnom klimom neće imati takve probleme jer neće doseći iste temperature. U zemljama koje već imaju vruće, tropske klime dodatno će se povisiti temperature, a visoke vrijednosti iznad 40°C mogu dovesti do smanjenja razvoja mikotoksina. Uobičajeni toksini rodova *Penicillium* i *Aspergillus* kao što su patulin i okratoksin A se u

trenutno umjerenim klimama možda više neće razvijati u tolikoj količini jer će im nove temperature postati previsoke, ali bi mogli postati problematični u trenutno hladnim klimama (Russell i sur., 2010). Povišene razine deoksinivalenola karakteristične su za tople klime, no temperature iznad 32°C više su od za njih optimalnih i time će takva područja biti sigurnija po pitanju tog mikotoksina. Umjerene temperature i kiša pogoduju razvoju vrste *F. graminearum* i deoksinivalenola u centralnoj Europi. *F. graminearum* također ima više optimalne temperature za razvoj od vrste *F. culmorum* pa se u odnosu na njegove koncentracije pretpostavlja povećanje razine vrste *F. graminearum* (Paterson i Lima, 2011). Predviđa se da će u Europi u sljedećih 50 do 100 godina *A. flavus* nadvladati *A. carbonarius* te da će aflatoksini nadvladati okratoksin A. Također, uvjeti će možda postati pretopli za *P. expansum* što bi moglo smanjiti opasnost od patulina u voćkama. Toplija klima više će odgovarati termotolerantnim vrstama pa će tako *Aspergillus* spp. dominirati nad *Penicillium* spp., a to bi moglo promijeniti i produkciju mikotoksina nekih vrsta, npr. *A.s flavus* bi mogao proizvoditi više ciklopiazoničnu kiselinu nego aflatoksine. Za bolje razumijevanje ovih promjena potrebne su dugoročne eksperimentalne studije kojih trenutno nedostaje. Također, teško je uspoređivati različite studije jer metode nisu harmonizirane, točan plan uzorkovanja bi bio potreban kako bi se prikupili reprezentativni uzorci za analizu. Dostupnost kvalitetnih prikupljenih podataka za evaluaciju ključna je za studije rizika i učinka klimatskih promjena (Perrone i sur., 2020).

Dostupnost moderne tehnologije i novih tehnika doprinosi povećanju dostupnih informacija o biologiji plijesni koje proizvode mikotoksine. Istraživanja na vrstama roda *Fusarium* i učinku okolišnih čimbenika na njihovu proizvodnju fumonizina pokazala su da temperatura i aktivitet vode utječu na ekspresiju ključnih gena u tim vrstama, rast i produkciju toksičnih sekundarnih metabolita. *F. langsethiae* na skladištenim žitaricama izložen uvjetima klimatskih promjena pokazuje ekspresiju gena Tri5, Tri6 i Tri16 te značajno povećanje proizvodnje toksina što ukazuje na postojanje korelacije. Ipak, *F. langsethiae* nešto je manje otporan na klimatske promjene od drugih vrsta kao što su *F. graminearum* i *F. verticillioides*. Prijašnje studije na ovim vrstama pokazale su da pod različitim okolišnim uvjetima relativna ekspresija trihotecenskih TRI gena i rast i produkcija deoksinivalenola striktno koreliraju. Studije na vrsti *A. flavus* pokazale su da pod utjecajem očekivanih uvjeta klimatskih promjena, misleći pritom na temperaturu, aktivitet vode i razinu ugljikovog dioksida, na rast nije bilo utjecaja, ali ekspresija strukturnih i regulatornih gena odgovornih za proizvodnju mikotoksina kao što su aflD i aflR te fenotipska proizvodnja aflatoksina B1 bili su stimulirani. Ova spoznaja omogućava relativno točna predviđanja produkcije aflatoksina pri povišenim temperaturama i uvjetima stresa očekivanim za vrijeme klimatskih promjena. Neke studije koristile su pristup

RNA sekvenciranja kako bi pri različitim uvjetima usporedile koji geni su pokazali veću, a koji manju ekspresiju. Studije su bile kratkoročne, no pokazale su da je na temperaturi od 30°C ekspresija 30 gena za sintezu aflatoksina 3300 puta veća od one na 37°C što ide u prilog hipotezi da će viša temperatura smanjiti produkciju aflatoksina na nekim područjima zbog smanjene transkripcije dva glavna regulatora, *aflaR* i *aflaS*. Potrebno je više studija o utjecaju epigenetskih modifikacija na sekundarne metabolite jer se pokazalo da one utječu na koncentraciju tih metabolita, ali i aktiviraju genske klastere. Npr. kod vrste *A. flavus* metilacijski regulatori kao što su *RmtA* i *DmtA* su epigenetski faktori koji utječu na razvoj plijesni i produkciju mikotoksina. Također, kod vrste *F. verticillioides* kromatinsko remodeliranje utječe na ekspresiju gena *fum1*, *fum21* i *fum8* povezanih s proizvodnjom fumonizina (Perrone et al., 2020).

U eri klimatskih promjena razvijat će se više mikotoksina. Regije će proći kroz tzv. „up-shift“ proces pa će tako npr. subtropske regije postati tropske (Paterson and Lima, 2011). Kako bi čovjek mogao kontrolirati i razumjeti posljedice takvih događaja oslanjat će se na prognostičke modele. Većina njih oslanja se primarno na podatke o vremenskim prilikama i primijeniti se može isključivo na jednom geografskom području. Prognostički modeli mogu biti empirijski ili mehanički i dok je prednost mehaničkih da se mogu primijeniti na bilo koje geografsko područje, njihova kombinirana primjena ipak je najpreciznija (Perrone i sur., 2020).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Klimatske promjene imaju direktan utjecaj na čimbenike koji određuju rast plijesni i njihovu proizvodnju mikotoksina u prirodi. Značajan porast temperatura i količine padalina ili pak sušna razdoblja u različitim regijama svijeta neke su od glavnih očekivanih promjena koje će utjecati na uzgoj žitarica i njihovu kontaminaciju. Osim toga, uvjeti transporta i skladištenja usjeva, od kojih je najvažniji udio vlage u zraku, bit će također izloženi promjenama što dodatno diktira razvoj plijesni nakon žetve. Projekt Europske unije „Istraživanje utjecaja klimatskih promjena na razvoj plijesni, mikotoksina i kvalitetu žitarica s prijedlogom mjera“ (KK.05.1.1.02.0023) rezultat je prepoznatih promjena u prirodi koje imaju utjecaj na žitarice koje konzumiramo. On se temelji na praćenju kontaminacije žitarica s područja istočne, središnje i sjeverne Hrvatske u fazama vegetacije, žetve i skladištenja tijekom dvije godine.

Ciljevi ovog diplomskog rada su:

- odrediti razinu mikološke kontaminacije uzoraka pšenice, kukuruza i ječma s navedenih područja tijekom jednog razdoblja skladištenja s posebnom pozornošću obraćenom na rodove plijesni *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium*
- primjenom statističke analize pokazati postoje li značajne razlike u razini mikološke kontaminacije s obzirom na područje uzorkovanja

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

Korišteni materijali su: hranjive podloge MEA i DRBC, peptonska voda, sterilne tikvice, menzura, Petrijeve zdjelice, pipete do 10 mL i do 200  $\mu$ L, nastavci za pipete, plastične epruvete, L-štapići, autoklav.

##### 3.1.1. Priprema peptonske voda i hranjivih podloga

- Peptonska voda (Biolife, Italija) pripravljena je otapanjem 1 g kazeina i 8,5 g natrijevog klorida (NaCl) u 1 L destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Tako pripravljena otopina sterilizirana je autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C nakon čega je dodan polisorbit 80 (Tween 80; Sigma-Aldrich, Njemačka).
- Dikloran rose bengal kloramfenikol agar (DRBC; Oxoid, UK) je hranjiva podloga pripravljena otapanjem 10 g glukoze, 5 g peptona, 1 g monokalijevog fosfata (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,5 g magnezijevog sulfata heptahidrata (MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O), 15 g agara, 2 mg diklorana (0,2% w/v u EtOH, 1 mL) i 100 mg kloramfenikola u 1 L destilirane vode. Otopina je zagrijavana do vrenja i zatim sterilizirana autoklaviranjem 15 minuta na 121°C. Nakon sterilizacije dodano je 25 mg rose bengala (5% w/v u H<sub>2</sub>O, 0,5 mL). Hranjiva podloga mora se čuvati zaštićena od svjetlosti.
- Malt ekstrakt agar (MEA; Biolife, Italija) je hranjiva podloga koja je pripravljena otapanjem 30 g ekstrakta agara u 1 L destilirane vode. Otopina je zagrijavana do vrenja i zatim sterilizirana autoklaviranjem 15 minuta na 121°C.

Hranjiva podloga DRBC koristi se za prebrojavanje plijesni koje rastu pri aktivitetu vode većem od 0,95. Kako bi se ograničio rast nekih kolonija podlozi se dodaje antifungalni agens dikloran te rose bengal, a dodaje se još i kloramfenikol koji antibiotskim djelovanjem sprječava rast bakterija. Plijesnima kao izvor ugljikohidrata služi u podlogu dodana glukoza.

Hranjiva podloga MEA omogućuje rast širem spektru plijesni, a u svom sastavu malt ekstrakt sadrži maltozu, dekstrin, glicerol, peptokompleks i agar. Dekstrin i maltoza služe kao izvor ugljika i energije, a peptokompleks osigurava izvor aminokiselina i drugih spojeva bogatih dušikom koji omogućuju rast plijesni. Približna vrijednost pH ove podloge je 5,5 kako bi se pojačao rast plijesni, a istovremeno inhibirao rast bakterija.

### 3.1.2. Uređaj

- Autoklav (φ 300 x 500, Sutjeska, Beograd, Srbija)

## 3.2. Metoda

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

### 3.2.1. Uzorkovanje

Na Zavod za Mikrobiologiju zaprimljeno je 90 uzoraka samljevenih žitarica iz tri hrvatske regije koje je prikupio Nastavni zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u ožujku 2021. Radi se o sjevernoj, središnjoj i istočnoj Hrvatskoj, a iz svake regije analizirano je po deset uzoraka pšenice, deset uzoraka kukuruza i deset uzoraka ječma. Uzorci su bili prikupljeni u plastične posudice, adekvatno transportirani i čuvani u hladnjaku do analize.

### 3.2.2. Mikološka analiza

Iz posudice se izvaže 10 g uzorka koji se zatim prelije s 90 mL peptonske vode. Za odmjeravanje točnog volumena peptonske vode iz tikvice korištena je staklena menzura. Preliveni uzorak protrese se kako bi se smjesa homogenizirala i zatim ostavi da se slegne čime je dobivena početna suspenzija koncentracije  $10^{-1}$ . U međuvremenu, pripremljene su plastične epruvete punjene s 9 ml peptonske vode kako bi se od početne suspenzije napravila razrjeđenja koja će se koristiti u analizi. Iz početne suspenzije pipetom se 100  $\mu$ L uzorka prenese u prvu epruvetu s peptonskom vodom te se smjesa promiješa uzastopnim uvlačenjem i ispuštanjem suspenzije iz pipete. Na taj način dobivena je suspenzija koncentracije  $10^{-2}$ . Opisani postupak ponavlja se kako bi se dobila ostala razrjeđenja sve dok se ne pripreme suspenzije razrjeđenja do  $10^{-4}$  za uzorke pšenice i ječma te razrjeđenja do  $10^{-5}$  za uzorke kukuruza.

Za svaki ovako pripremljeni i razrijeđeni uzorak po 100  $\mu$ L iz početne suspenzije i iz svakog razrjeđenja iz dobivenog niza preneseno je na hranjive podloge MEA i DRBC. Uzorci su po površinama podloga raspoređeni L-štapićem steriliziranim alkoholom i zagrijavanjem na plameniku prije svake uporabe. Ovako pripremljene ploče s podlogama stavljene su na inkubaciju pri 25°C na 5 do 7 dana nakon čega su izbrojane narasle kolonije na podlogama.

Za postupak brojanja kolonija koriste se samo ploče koje sadrže manje od 150 kolonija dok se ostale odbacuju. Za izračun se koriste prva dva najmanja razrjeđenja na kojima se može izbrojati manje od 150 kolonija, a račun se provodi na dva različita načina ovisno o tome jesu

li za pojedini uzorak dostupne jedna ili dvije ploče s odgovarajućim brojem kolonija. Rezultati koncentracije plijesni u uzorcima iskazuju se kao broj jedinica koje formiraju kolonije po gramu (CFU/g) pri čemu CFU predstavlja engleski izraz „colony-forming unit“.

Za izražavanje koncentracije plijesni i kvasaca po gramu prilikom brojanja dvaju uzastopnih razrjeđenja koristi se izraz:

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

gdje je:

$\Sigma C$  – 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

Za izražavanje koncentracije plijesni i kvasaca po gramu prilikom brojanja jednog razrjeđenja koristi se izraz:

$$N = \frac{\sum C}{V * n * d}$$

gdje je:

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

V – volumen inokuluma u mililitrima stavljenog na hranjivu podlogu

n – broj ploča zadržanih za brojanje kod prvog razrjeđenja

d – razrjeđenje iz kojega su dobiveni prvi brojevi

Rezultat računa zaokružuje se na dvije značajne znamenke i izražava kao broj između 1,0 i 9,9 pomnožen s  $10^x$  pri čemu je x odgovarajuća potencija broja deset.

Nakon brojanja kolonija narasle plijesni identificiraju se na temelju makromorfoloških i mikromorfoloških obilježja.

### 3.2.3. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je software *Prism 8.4.3.* (GraphPad Software, Inc.). Podaci izračunati prethodno opisanim postupkom analizirani su jednosmjernom analizom varijance, tzv. One-way ANOVA analizom, uz višestruko uspoređivanje različitih skupina

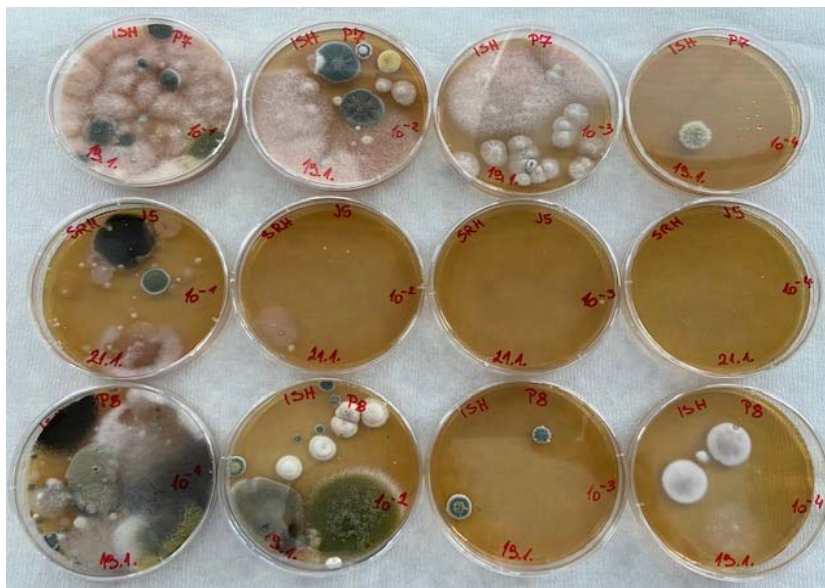
podataka. Na taj način dobiven je podatak o postojanju značajne razlike između uspoređivanih grupa preko P vrijednosti. Ako je ona manja od 0,05 smatra se da značajna razlika postoji. Također je korištena deskriptivna statistika kako bi se prikazale vrijednosti minimuma, maksimuma, aritmetičke sredine, standardne devijacije, standardne pogreške, koeficijenta varijacije i „confidence“ intervala aritmetičke sredine. Grafički prikazi izraženi su histogramom uz aritmetičku sredinu i standardnu pogrešku, a tablično su prikazani udjeli pojedinih rodova i vrsta plijesni u određenim regijama.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

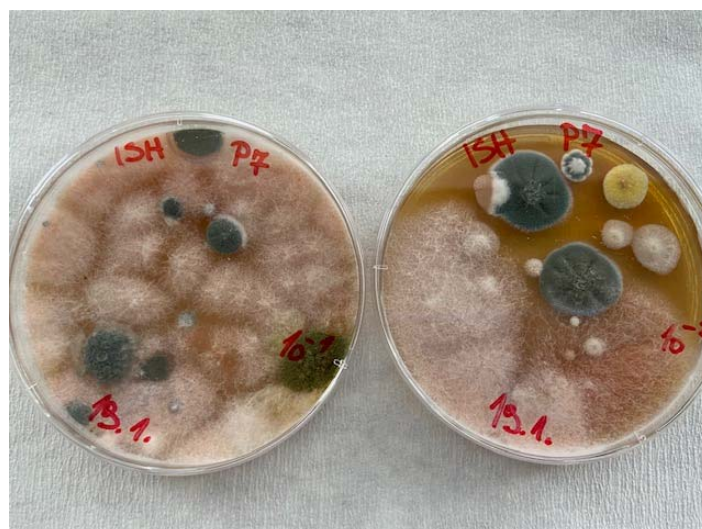
### 4.1. Rezultati

Obrađeno je po deset uzoraka pšenice, po deset uzoraka kukuruza i po deset uzoraka ječma iz svake od triju regija Hrvatske. Svi su podvrgnuti metodi mikološke analize nakon čega su na hranjivim podlogama prebrojane kolonije i identificirane vrste rastućih plijesni te kvasci. Svi uzorci označeni su kraticama koje se sastoje od oznake regije, početnog slova vrste žitarice i rednog broja uzorka radi lakšeg snalaženja.

Na sljedećim slikama prikazani su uzorci na podlogama s vidljivim rastom plijesni nakon inkubacije.



**Slika 1.** Prikaz niza razrjeđenja za tri različita uzorka nakon perioda inkubacije na hranjivoj podlozi MEA



**Slika 2.** Prikaz dvaju uzastopnih razrjeđenja istog uzorka pšenice s područja istočne Hrvatske nakon perioda inkubacije na hranjivoj podlozi MEA



**Slika 3.** Prikaz istog razrjeđenja istog uzorka kukuruza s područja istočne Hrvatske nakon perioda inkubacije na različitim hranjivim podlogama (DRBC i MEA)

U sljedećim tablicama prikazana je učestalost pojave određenih plijesni i kvasaca koji su narasli na dvije različite hranjive podloge za uzroke pšenice, kukuruza i ječma prikupljene na području istočne, središnje i sjeverne Hrvatske.

Tablica 1 pokazuje učestalost pojave plijesni i kvasaca na hranjivoj podlozi MEA gdje je identificirano 11 različitih rodova plijesni te kvasci, a unutar roda *Aspergillus* 5 različitih sekcija. Rodovi *Fusarium* i *Penicillium* detektirani su u gotovo svim skupinama uzoraka, a različite sekcije roda *Aspergillus* zabilježene su više na uzorcima prikupljenima u istočnoj Hrvatskoj.

Uzorci pšenice prikupljeni u istočnoj Hrvatskoj pokazali su najveću zastupljenost roda *Penicillium* (70%) nakon čega slijede *Acremonium spp.* i kvasci (50%), *Aspergillus* sekc. *Aspergillus* i sekc. *Flavi* te *Fusarium spp.* (40%), *Aspergillus* sekc. *Nigri* i *Cladosporium spp.* (20%) i na kraju *Alternaria spp.*, *Paecilomyces lilacinum* i *Rhizopus spp.* (10%).

Zatupljenost roda *Penicillium* također je bila najveća na uzorcima pšenice prikupljenima u središnjoj Hrvatskoj (90%) uz nešto manje zastupljene kvasce (70%). Značajno manje, u samo 10% uzoraka, bili su zastupljeni *Acremonium spp.*, *Aspergillus* sekc. *Flavi*, *Cladosprium spp.*, *Fusarium spp.* i *Rhizopus spp.*

U uzorcima pšenice prikupljenima u sjevernoj Hrvatskoj najučestaliji je *Penicillium spp.* (80%). U 50% uzoraka pojavljuju se kvasci, a njih u njih 40% rod *Acremonium*. U samo 10% uzoraka zabilježena je pojava roda *Fusarium* te vrste *Paecilomyces lilacinum*.

Kukuruz istočne Hrvatske pokazao je najveću zastupljenost roda *Penicillium* (90%) te nešto manje roda *Fusarium* (70%) i *Rhizopus* (60%). U 30 % uzoraka javio se rod *Acremonium*, a u 20% uzoraka *Aspergillus* sekc. *Flavi* dok su u samo 10% uzoraka bili prisutni *Aspergillus* sekc. *Aspergillus* i sekc. *Nigri*.

U uzorcima kukuruza središnje Hrvatske ponovno je najzastupljeniji *Penicillium spp.* koji se javlja u 70% analiziranih uzoraka. *Rhizopus spp.* pojavio se u 60% uzoraka, a *Acremonium spp.* i *Fusarium spp.* u 50% uzoraka.

U uzorcima kukuruza sjeverne Hrvatske bilo je moguće analizirati samo 8 od 10 pristiglih uzoraka zbog prevelike kontaminacije dvaju uzoraka. U 8 analiziranih uzoraka najzastupljeniji su bili rodovi *Fusarium* i *Penicillium* (87,5%) dok je nešto manje zastupljen bio *Acremonium spp.* (75%). Također je zabilježena pojava *Aspergillus* sekc. *Circumdati* i sekc. *Flavi* te rodova *Mucor* i *Phomopsis* u jednom od uzoraka (12,5%).

Uzorci ječma pristigli iz istočne Hrvatske pokazali su prisutnost kvasaca u 100% uzoraka te nešto manju zastupljenost rodova *Penicillium* (60%), *Fusarium* (50%) i *Acremonium* (40%). U 20% uzoraka pojavljuje se vrsta *Paecilomyces lilacinum*, a u samo 10% *Auerobasidium spp.*, *Cladosporium spp.* i *Rhizopus spp.*

Ječam iz središnje Hrvatske također je pokazao prisutnost kvasaca u 100% uzoraka dok se *Penicillium spp.* javlja u 70% uzoraka. U 20% uzoraka javlja se rod *Alternaria*, a u samo 10 % *Cladosporium spp.* te vrsta *Paecilomyces lilacinum*.

U uzorcima ječma iz sjeverne Hrvatske u najzastupljeniji su kvasci i *Penicillium spp.* (90%). Znatno rjeđe javlja se *Auerobasidium spp.* (30%) te *Aspergillus* sekc. *Clavati*, *Cladosporium spp.* i vrsta *Paecilomyces lilacinum* (10%).



**Tablica 1.** Učestalost pojave pojedinih plijesni i kvasaca (%) u uzorcima pšenice, kukuruza i ječma s područja istočne, središnje i sjeverne Hrvatske naraslih na hranjivoj podlozi MEA

Rodovi i vrste na podlozi MEA	Pšenica			Kukuruz			Ječam		
	ISH	SRH	SJH	ISH	SRH	SJH	ISH	SRH	SJH
<i>Acremonium spp.</i>	50	10	40	30	50	75	40		
<i>Alternaria spp.</i>	10							20	
<i>Aspergillus</i> sekc. <i>Aspergillus</i>	40			10					
<i>Aspergillus</i> sekc. <i>Circumdati</i>						12,5			
<i>Aspergillus</i> sekc. <i>Clavati</i>									10
<i>Aspergillus</i> sekc. <i>Flavi</i>	40	10		20		12,5			
<i>Aspergillus</i> sekc. <i>Nigri</i>	20			10					
<i>Auerobasidium spp.</i>							10		30
<i>Cladosporium spp.</i>	20	10					10	10	10
<i>Fusarium spp.</i>	40	10	10	70	50	87,5	50		
kvasci	50	70	50				100	100	90
<i>Mucor spp.</i>						12,5			
<i>Paecilomyces lilacinum</i>	10		10				20	10	10
<i>Penicillium spp.</i>	70	90	80	90	70	87,5	60	70	90
<i>Phomopsis spp.</i>						12,5			
<i>Rhizopus spp.</i>	10	10		60	60		10		

Tablica 2 pokazuje učestalost pojave plijesni i kvasaca na hranjivoj podlozi DRBC gdje je identificirano 9 različitih rodova plijesni te kvasci, a unutar roda *Aspergillus* 2 različite sekcije. Rod *Penicillium* te kvasci identificirani su u svim analiziranim uzorcima, a u većini ih je identificiran i rod *Fusarium*. Rod *Aspergillus* pojavljuje se samo uzorcima pšenice i kukuruza.

U uzorcima pšenice pristiglima iz istočne Hrvatske u 100% uzoraka identificiran je rod *Penicillium*. Osim njega, u nekoliko uzoraka prepoznati su i kvasci (40%), *Acremonium spp.* (30%), *Aspergillus* sekc. *Flavi* (30%), *Cladosporium spp.* (20%) i *Fusarium spp.* (20%).

Pšenica iz središnje Hrvatske pokazala je najveću zastupljenost kvasaca (100%) te nešto manje roda *Penicillium* (60%) dok se *Aspergillus* sekc. *Flavi* javlja u samo jednom uzorku (10%).

U uzorcima pšenice sjeverne Hrvatske najčešće se pojavljuju *Penicillium spp.* (100%) i kvasci (60%). Znatno rjeđe zabilježena je pojava roda *Acremonium* (30%) dok se u samo jednom uzorku pojavljuju *Alternaria spp.*, *Aspergillus* sekc. *Flavi*, *Fusarium spp.* i *Mucor spp.* (10%).

Uzorci kukuruza iz istočne Hrvatske pokazuju najčešću pojavu rodova *Fusarium* (80%) i *Penicillium* (70%). U 40% uzoraka pojavljuje se *Aspergillus* sekc. *Flavi*, u 30% uzoraka kvasci i *Acremonium spp.*, u 20% uzoraka *Aspergillus* sekc. *Nigri*, a u 10% *Rhizopus spp.*

U središnjoj Hrvatskoj u uzorcima kukuruza najučestalija je pojava roda *Penicillium* (80%), a zatim kvasaca (60%). Nakon njih slijede rodovi *Fusarium* (50%) i *Acremonium* (40%).

U uzorcima kukuruza sjeverne Hrvatske bilo je moguće analizirati samo 8 od 10 pristiglih uzoraka zbog prevelike kontaminacije dvaju uzoraka. U svim analiziranim uzorcima zabilježena je pojava roda *Fusarium* (100%) uz nešto manje rodova *Penicillium* i *Acremonium* (87,5%). U samo jednom uzorku pojavljuju se kvasci (12,5%).

Uzorci ječma iz istočne Hrvatske pokazali su najčešću pojavu kvasaca (100%) i nešto manje roda *Penicillium* (90%). Znatno rjeđe zabilježena je pojava rodova *Alternaria* i *Fusarium* (20%) te rodova *Acremonium*, *Cladosporium* i *Rhizopus* (10%).

Na ječmu središnje Hrvatske zabilježena je samo pojava kvasaca (70%) i roda *Penicillium* (40%).

Najučestaliji na uzorcima ječma sjeverne Hrvatske su kvasci (100%) uz nešto rjeđu pojavu roda *Penicillium* (60%). U dva uzorka pojavljuje se *Auerobasidium spp.* (20%), a u jednom uzorku *Fusarium spp.* (10%).

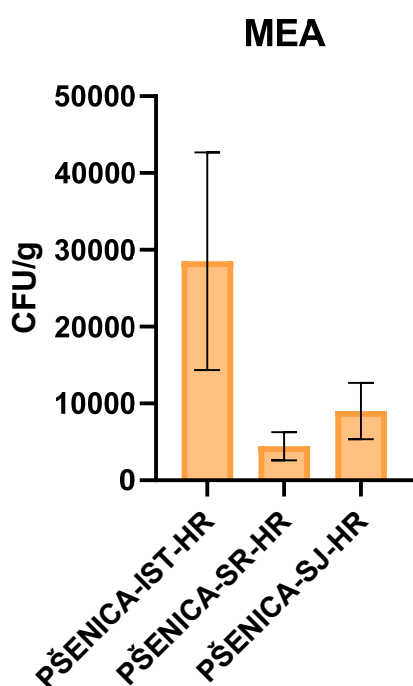
**Tablica 2.** Učestalost pojave pojedinih plijesni i kvasaca (%) u uzorcima pšenice, kukuruza i ječma s područja istočne, središnje i sjeverne Hrvatske naraslih na hranjivoj podlozi DRBC

Rodovi i vrste na podlozi DRBC	Pšenica			Kukuruz			Ječam		
	ISH	SRH	SJH	ISH	SRH	SJH	ISH	SRH	SJH
<i>Acremonium spp.</i>	30		30	30	40	87,5	10		
<i>Alternaria spp.</i>			10				20		
<i>Aspergillus</i> sekc. <i>Flavi</i>	30	10		40					
<i>Aspergillus</i> sekc. <i>Nigri</i>			10	20					
<i>Auerobasidium spp.</i>									20
<i>Cladosporium spp.</i>	20						10		
<i>Fusarium spp.</i>	20		10	80	50	100	20		10
kvasci	40	100	60	30	60	12,5	100	70	100
<i>Mucor spp.</i>			10						
<i>Penicillium spp.</i>	100	60	100	70	80	87,5	90	40	60
<i>Rhizopus spp.</i>				10			10		

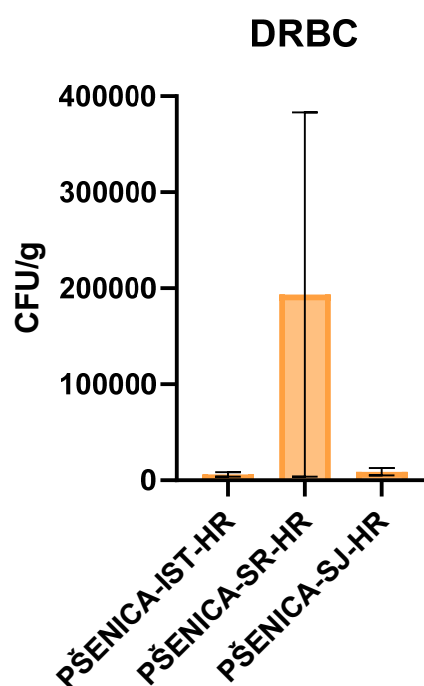
#### 4.1.1. Usporedba istih vrsta žitarica iz različitih regija

Statističkom obradom podataka nakon mikološke analize omogućena je grafička usporedba podataka za iste vrste žitarica, ali u različitim regijama. Rezultati su prikazani za obje hranjive podloge. Za grafički prikaz korišteni su histogrami aritmetičke sredine koncentracije plijesni u uzorcima uz prikaz standardne pogreške.

U prvom slučaju uspoređeni su uzorci pšenice na hranjivoj podlozi MEA (Slika 4) i DRBC (Slika 5). Na podlozi MEA najvišu srednju koncentraciju plijesni pokazuju uzorci iz istočne Hrvatske s 28505 CFU/g, nakon čega slijedi sjeverna Hrvatska s vrijednosti 9039 CFU/g te središnja Hrvatska s vrijednosti 4437 CFU/g. Na podlozi DRBC uvjerljivo najvišu srednju vrijednost koncentracija plijesni postižu uzorci iz središnje Hrvatske s 193571 CFU/g, a slijede ju sjeverna Hrvatska s 8990 CFU/g i istočna Hrvatska s 6110 CFU/g. Jednosmjerna analiza varijance u oba slučaja pokazala je da ne postoji značajna razlika između uspoređivanih skupina uzoraka jer vrijednost varijable P nije bila manja od 0,05.

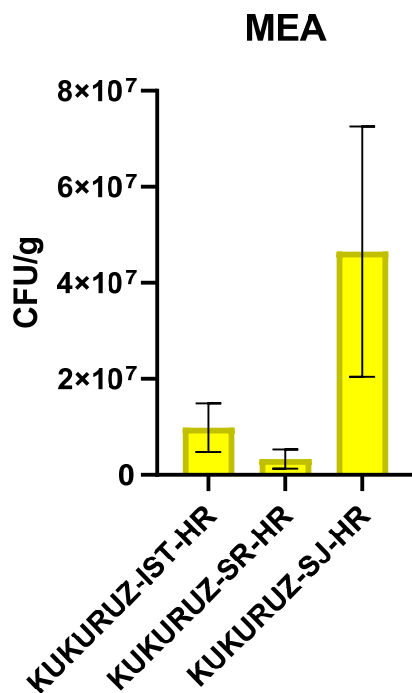


Slika 4. Grafički prikaz aritmetičke sredine koncentracija plijesni sa standardnom pogreškom u uzorcima pšenice pojedinih regija na hranjivoj podlozi MEA

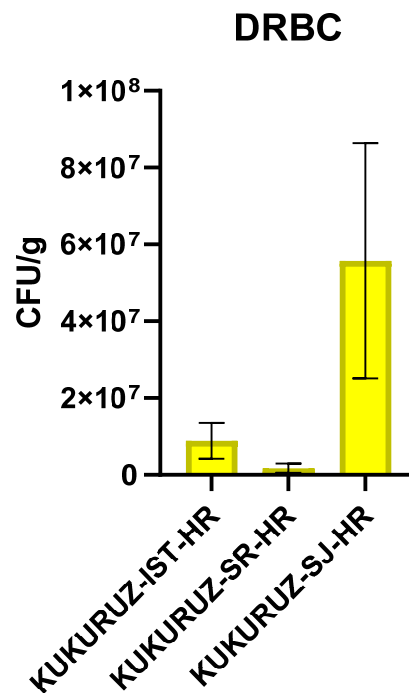


Slika 5. Grafički prikaz aritmetičke sredine koncentracija plijesni sa standardnom pogreškom u uzorcima pšenice pojedinih regija na hranjivoj podlozi DRBC

U drugom slučaju uspoređeni su uzorci kukuruza na hranjivoj podlozi MEA (Slika 6) i DRBC (Slika 7) koji su pokazali najveće vrijednosti od svih žitarica. Na podlozi MEA najvišu srednju vrijednost pokazao je kukuruz sjeverne Hrvatske s  $4,65038 \cdot 10^7$  CFU/g, slijede ga uzorci iz istočne Hrvatske s  $9,8409 \cdot 10^6$  CFU/g te središnje Hrvatske sa vrijednosti od  $3,3098 \cdot 10^6$  CFU/g. Uzorci kukuruza sjeverne Hrvatske također pokazuju najvišu srednju vrijednost koncentracije plijesni na podlozi DRBC sa  $5,57373 \cdot 10^7$  CFU/g, ponovno ih slijede uzorci istočne Hrvatske s  $8,888 \cdot 10^6$  CFU/g te uzorci središnje Hrvatske s  $1,74627 \cdot 10^6$  CFU/g. Jednosmjerna analiza varijance pokazala je da je vrijednost varijable P na podlozi MEA 0,0760, a na podlozi DRBC 0,0499 što pokazuje značajnu razliku između skupina uzoraka na podlozi DRBC.

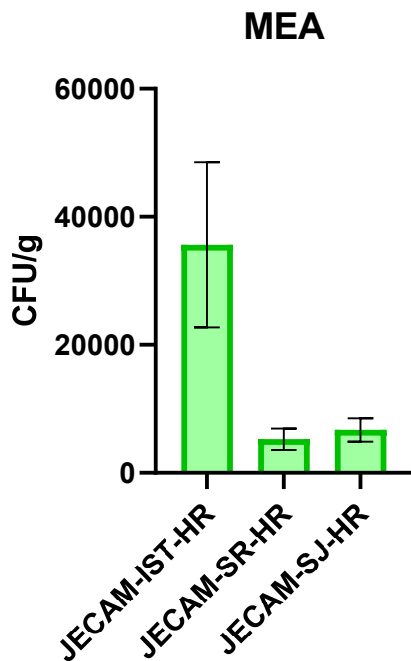


**Slika 6.** Grafički prikaz aritmetičke sredine koncentracija plijesni sa standardnom pogreškom u uzorcima kukuruza pojedinih regija na hranjivoj podlozi MEA

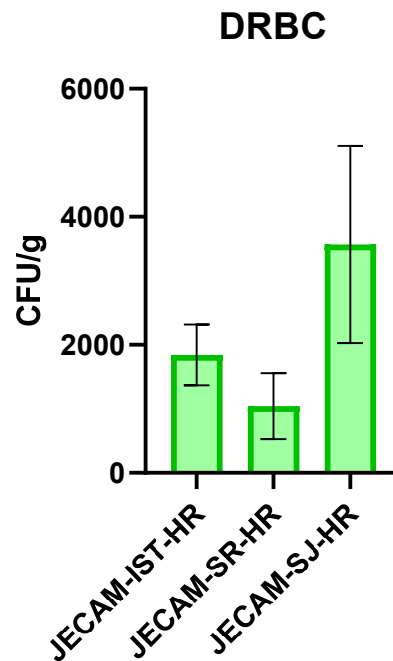


**Slika 7.** Grafički prikaz aritmetičke sredine koncentracija plijesni sa standardnom pogreškom u uzorcima kukuruza pojedinih regija na hranjivoj podlozi DRBC

U trećem slučaju uspoređeni su uzorci ječma na hranjivoj podlozi MEA (Slika 8) i DRBC (Slika 9). U uzorcima ječma na podlozi MEA najvišu srednju vrijednost koncentracija plijesni ima ječam istočne Hrvatske s vrijednosti 35610 CFU/g, slijede ga uzorci sjeverne Hrvatske sa 6712 CFU/g te središnje Hrvatske s 5250 CFU/g. Na podlozi DRBC najviše vrijednosti pokazuju uzorci sjeverne Hrvatske sa srednjom vrijednosti 3566 CFU/g, nešto manju vrijednost imaju uzorci istočne Hrvatske s 1842 CFU/g te uzorci središnje Hrvatske s koncentracijom 1042 CFU/g. Jednosmjerna analiza varijance pokazala je da je vrijednost varijable P na podlozi MEA 0,0132 i da postoji značajna razlika između tih skupina uzoraka dok je vrijednost na podlozi DRBC 0,1936 i ne postoji značajna razlika.



**Slika 8.** Grafički prikaz aritmetičke sredine koncentracija plijesni sa standardnom pogreškom u uzorcima ječma pojedinih regija na hranjivoj podlozi MEA

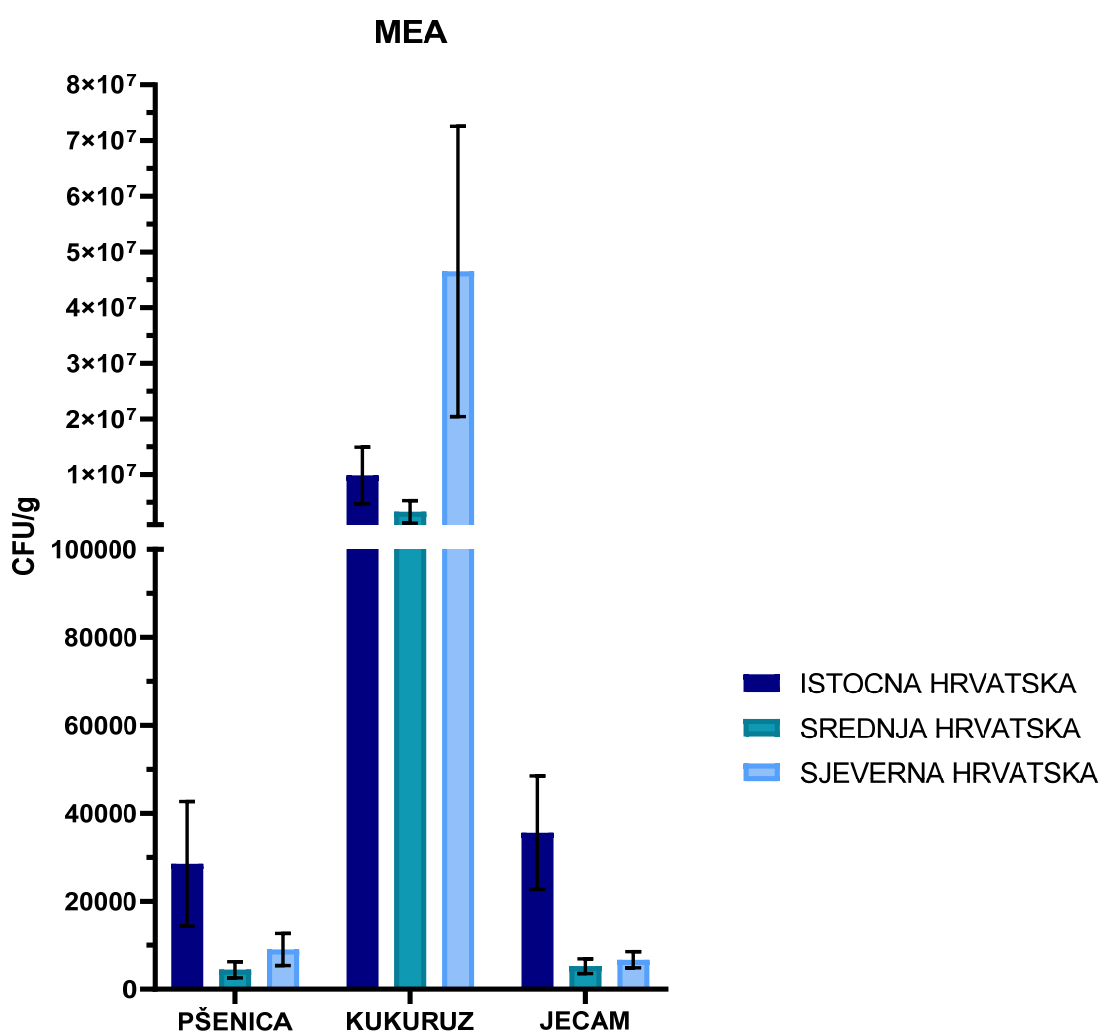


**Slika 9.** Grafički prikaz aritmetičke sredine koncentracija plijesni sa standardnom pogreškom u uzorcima ječma pojedinih regija na hranjivoj podlozi DRBC

#### 4.1.2. Usporedba svih vrsta žitarica po regijama

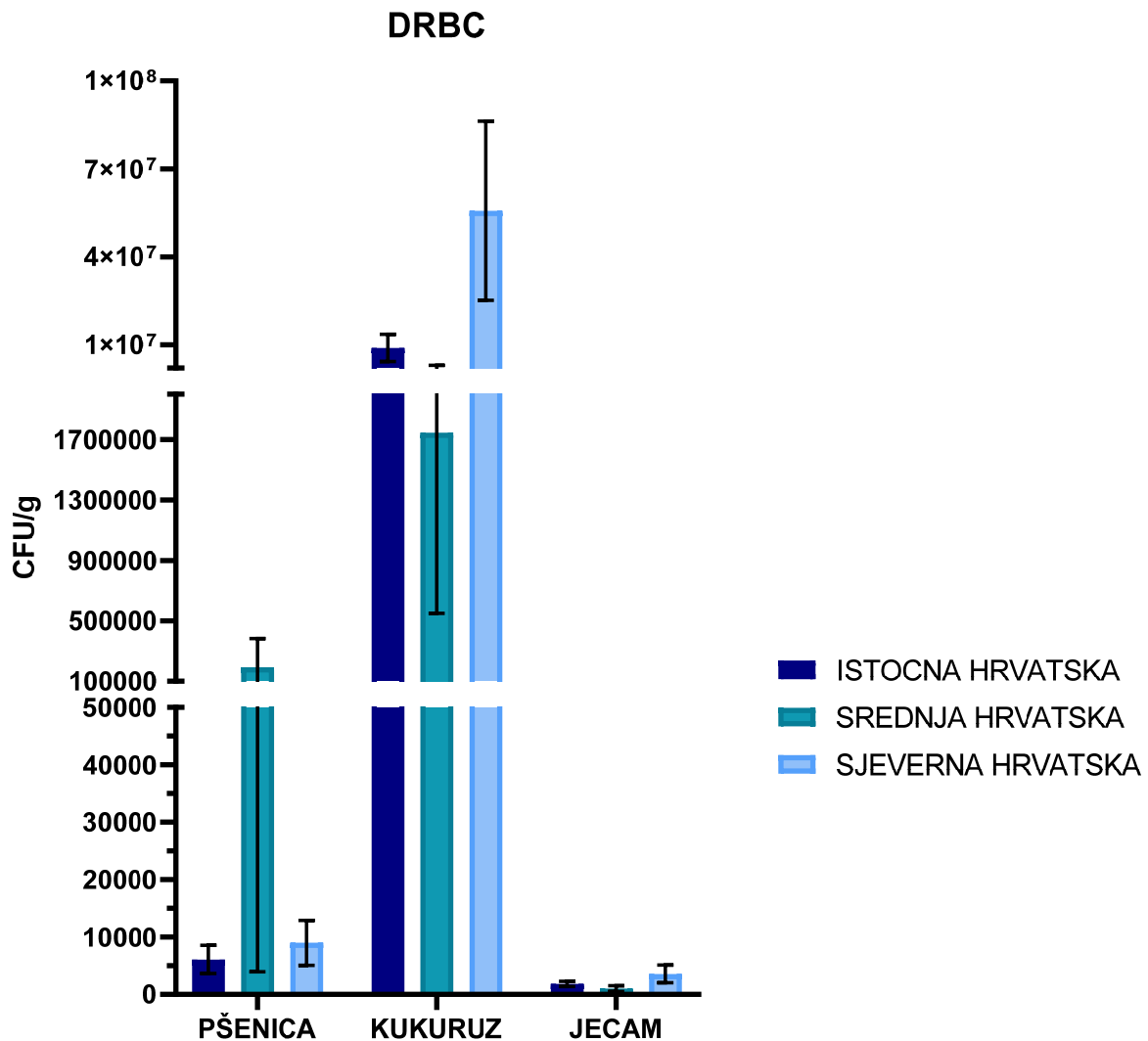
Statističkom obradom podataka dobiveni su grafički prikazi usporedbe srednjih koncentracija plijesni sa standardnom pogreškom za sve tri vrste žitarica u sve tri proučavane regije na istom prikazu.

Na hranjivoj podlozi MEA (Slika 10) vidljivo je da uvjerljivo najviše prosječne koncentracije plijesni pokazuju uzorci kukuruza, od kojih najviše oni iz sjeverne Hrvatske. Uzorci pšenice i ječma pokazuju značajno manje vrijednosti koncentracija plijesni, no u slučaju obje žitarice najviše vrijednosti ostvaruju uzorci iz istočne Hrvatske koju slijede sjeverna pa središnja Hrvatska.



**Slika 10.** Usporedni prikaz srednjih koncentracija plijesni sa standardnom pogreškom u uzorcima svih analiziranih žitarica kroz sve tri proučavane regije na hranjivoj podlozi MEA

Na hranjivoj podlozi DRBC (Slika 11) najviše srednje vrijednosti koncentracija naraslih plijesni također pokazuju uzroci kukuruza i to posebno iz sjeverne Hrvatske. Sljedeći su uzorci pšenice od kojih značajno više vrijednosti pokazuju uzorci središnje Hrvatske. Najniže vrijednosti koncentracija pokazuju uzorci ječma od kojih najviše vrijednosti imaju uzorci iz sjeverne Hrvatske.



**Slika 11.** Usporedni prikaz srednjih koncentracija plijesni sa standardnom pogreškom u uzorcima svih analiziranih žitarica kroz sve tri proučavane regije na hranjivoj podlozi DRBC



## 4.2. Rasprava

Rezultati ovog eksperimentalnog rada pokazali su identificirane vrste plijesni i njihove udjele u uzorcima pšenice, kukuruza i ječma u istočnoj, središnjoj i sjevernoj Hrvatskoj. Radi se o uzorcima iz faze skladištenja ovih žitarica iz ožujka 2021. godine.

Analizom rezultata vidljivo je da su značajno više vrijednosti u koncentracijama plijesni postigli uzorci kukuruza (redovi veličine  $10^6$  i  $10^7$ ), i to u sve tri hrvatske regije, dok su pšenica i ječam pokazali znatno manje koncentracije (redovi veličine  $10^3$  i  $10^4$ ). Na svim uzorcima žitarica prevladava rod *Penicillium*, a kukuruz dodatno pokazuje i velike udjele roda *Fusarium*. Pšenica uz rodove *Penicillium* i *Fusarium* pokazuje i zamjetnu prisutnost roda *Aspergillus* uz kojeg se ističe i *Acremonium spp.* Rezultati su pokazali da je zabrinutost o kontaminaciji žitarica koje svakodnevno konzumiramo opravdana te da posebno treba obratiti pozornost na uvjete njihovog skladištenja u svjetlu klimatskih promjena.

Analiza je provedena na dvije hranjive podloge koje zbog svog sastava sprječavaju rast nepoželjnih bakterija. Podloga DRBC karakterizirana je visokim aktivitetom vode ( $a_w > 0,95$ ) te su na njoj zabilježene malo niže koncentracije plijesni i manja različitost među vrstama dok je na podlozi MEA zabilježeno više različitih vrsta plijesni. Na hranjivoj podlozi MEA pokazano je kako posebno visoke koncentracije plijesni postižu uzorci iz istočne Hrvatske, uz sjevernu Hrvatsku u slučaju kukuruza. U slučaju podloge DRBC središnja Hrvatska ističe se po koncentracijama plijesni u uzorcima pšenice dok su kukuruz i ječam najviše vrijednosti ostvarili na području sjeverne Hrvatske.

Analizirajući rodove plijesni koji su se pojavili na uzorcima žitarica na podlozi MEA vidljivo je da se rod *Penicillium* pojavljuje na svim analiziranim skupinama uzoraka u visokim udjelima. Rod *Fusarium* pojavljuje se na svim skupinama uzoraka pšenice i kukuruza te skupini uzoraka ječma iz istočne Hrvatske. Pri tome najveću učestalost pokazuje u uzorcima kukuruza (70%, 50% i 87,5%). Rod *Aspergillus* pojavljuje se na 4 skupine uzoraka pšenice, 5 skupina uzoraka kukuruza i skupini uzoraka ječma iz sjeverne Hrvatske.

U slučaju podloge DRBC analiza je pokazala pojavnost roda *Penicillium* ponovno u svim analiziranim skupinama uzoraka pri čemu je učestalost u uzorcima pšenice istočne i sjeverne Hrvatske čak 100%. Rod *Fusarium* pojavio se u svim skupinama uzoraka kukuruza u visokim udjelima (80%, 50% i 100%) te u po dvije skupine uzoraka pšenice i ječma, no sa zamjetno manjim udjelima. *Aspergillus spp.* pojavljuje se u 3 skupine uzoraka pšenice i 2 skupine uzoraka kukuruza.

Kifer i sur. (2021) proučavali su kontaminaciju žitarica u Hrvatskoj na području Gornjeg Stupnika i Gunje nakon poplave. Uzorci su prikupljeni u 2016. i 2017. godini, razdoblju koje je meteorološki karakterizirano kao vruće i suho. 40 analiziranih uzoraka pokazalo je najveću zastupljenost roda *Fusarium* (>80%) kojeg slijede rodovi *Penicillium* i *Cladosporium* (40-50%) te *Aspergillus* koji je bio nešto manje zastupljen, iz čega je vidljivo da su plijesni istih rodova bile najznačajnije i u ovom radu. Koncentracija plijesni u uzorcima iz Gunje dosegla je vrijednosti od  $1 \cdot 10^4$  CFU/g, a u Gornjem Stupniku  $4 \cdot 10^4$  CFU/g što odgovara redovima veličine koncentracija plijesni u uzorcima pšenice i ječma analiziranim u ovom radu. Također, identificirano je 117 sekundarnih metabolita plijesni od kojih su fumonizini B1 i B2 te aflatoxin B1 postigli razine više od dozvoljenih. Od ostalih mikotoksina višu zastupljenost pokazali su još deoksinivalenol i zearalenon.

García-Díaz i sur. (2020) proveli su istraživanje na uzrocima kukuruza iz skladišta u Španjolskoj tijekom 2016., 2017. i 2018. godine pri čemu su PCR analizom odredili prisutnost pojedinih vrsta plijesni. Za potrebe usporedbe s ovim radom treba naglasiti da je u uzorcima kukuruza Hrvatske učestalost vrste *Aspergillus* sekc. *Flavi* 20% (MEA) i 40% (DRBC) u istočnoj Hrvatskoj te 12,5% (MEA) u sjevernoj Hrvatskoj dok je u okolici Madrida ova vrsta bila najzastupljenija s čak 89%. *Aspergillus* sekc. *Nigri* pojavljuje se na kukuruzu isključivo istočne Hrvatske s učestalošću 10% (MEA) i 20% (DRBC) dok se u svim uzorcima analiziranim u španjolskoj studiji radio o učestalosti od 52%. Rod *Fusarium* uvjerljivo je zastupljeniji na kukuruzu u odnosu na ostale analizirane žitarice i njegova učestalost u Hrvatskoj ulazi u raspone od 50% do 100%. U španjolskoj studiji ovaj rod javlja se u gotovo svim analiziranim uzorcima i to najviše u 2018. godini, a najučestalije su vrste *F. verticillioides* i *F. proliferatum*. U usporedbi s drugim analiziranim godinama najveće količine plijesni pokazali su uzorci kukuruza iz perioda skladištenja 2018. godine (García-Díaz i sur., 2020).

Za razdoblje od 2006. do 2009. godine Stuper-Szablewska i Perkowski (2014) proveli su istraživanje kontaminacije plijesnima na uzorcima pšenice u Poljskoj. Uzorci iz skladišta prikupljeni tijekom tri godine analizirani su istom metodom mikološke analize kao u ovom radu te su dobivene srednje vrijednosti učestalosti pojave određenih rodova plijesni. Učestalost *Penicillium* spp. bila je 92%, *Aspergillus* spp. 90%, a *Fusarium* spp. 57%. U uzrocima pšenice iz Hrvatske također je najučestaliji rod *Penicillium* s vrijednostima od 60% do 100% na obje hranjive podloge, slijedi ga rod *Fusarium* s vrijednostima učestalosti od 10% do 40% na pojedinim uzorcima. Rod *Aspergillus* puno je manje zastupljen u uzorcima pšenice iz Hrvatske (od 10% do 40%) u odnosu na Poljsku.

Felšöciová i sur. (2021) proveli su istraživanje na uzorcima ječma u Slovačkoj, među kojima i onih u skladištu, kako bi odredili njihovu kontaminaciju različitim rodovima plijesni. Prosječna učestalost u uzorcima nakon 3-9 mjeseci skladištenja za *Penicillium spp.* bila je 89%, za *Fusarium spp.* 44%, a za *Aspergillus spp.* 22%. Slične rezultate pokazao je ječam Hrvatske za rodove *Penicillium* (60%-90%) i *Fusarium* (10%-50%) do je samo jedan uzorak sjeverne Hrvatske pokazao prisutnost roda *Aspergillus*.

Prema Odjeljku III. Priloga III. Pravilnika o sigurnosti hrane za životinje (NN 102/2016) orijentacijske vrijednosti plijesni i kvasaca u uzorcima su za kukuruz  $30 \cdot 10^3$  CFU/g skladišnih plijesni te  $60 \cdot 10^3$  CFU/g kvasaca, za pšenicu  $20 \cdot 10^3$  CFU/g skladišnih plijesni i  $30 \cdot 10^3$  CFU/g kvasaca, a za ječam  $30 \cdot 10^3$  CFU/g skladišnih plijesni i  $100 \cdot 10^3$  CFU/g kvasaca. To znači da od analiziranih uzoraka s područja Hrvatske većina uzoraka pšenice i ječma odgovara ovim zahtjevima, no vrijednosti za uzorke kukuruza znatno su iznad preporučenih.

Prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda oborinske prilike u ožujku 2021. godine bile su normalne do sušne dok su temperature za cijelu 2021. godinu bile više od prosjeka. U sljedećim desetljećima kao posljedica klimatskih promjena uvjeti će se mijenjati što znači da će podložne promjenama biti i plijesni. U već spomenutim istraživanjima u Poljskoj i Španjolskoj vidljivo je da se kroz godine količina plijesni na žitaricama povećavala. Isto se može očekivati i na području Hrvatske. U južnoj Europi očekuje se porast temperature zraka za 4-5°C s dužim sušnim razdobljima i smanjenim prinosom žitarica. Mediteransko područje smatra se izrazito podložnim velikim temperaturnim promjenama, promjenama u koncentraciji ugljikovog dioksida te količini padalina. Uz ovakve klimatske promjene, loše regulirano skladištenje usjeva dodatno pridonosi njegovoj smanjenoj kvaliteti i pojačanoj proizvodnji mikotoksina (Magan i sur., 2011). Posebnu pažnju treba obratiti na razvoj vrste *Aspergillus flavus* i proizvodnju aflatoksina, posebice aflatoksina B1. U posljednjih 15 godina vrući i sušni uvjeti doveli su do velike kontaminacije kukuruza vrstom *A. flavus* u nekoliko europskih zemalja kao što su Italija, Rumunjska, Srbija i Španjolska (Moretti i sur., 2019). Uz ovu spoznaju te činjenicu da temperature iznad 30°C pogoduju rodu *Aspergillus* treba ozbiljno shvatiti prijetnju aflatoksina u budućnosti, inače smatranih najopasnijim mikotoksinima, i to posebice na kukuruzu. Treba napomenuti da su u ovom istraživanju u Hrvatskoj plijesni roda *Aspergillus* bile često zastupljene i na uzorcima pšenice.

Za sigurno skladištenje žitarica potrebno je osigurati odgovarajuće uvjete u skladištima kako bi se spriječila kontaminacija i gubitci na usjevima. Najveći rizik za žitarice predstavljaju rodovi *Aspergillus* i *Penicillium* smatrani primarno skladišnim plijesnima te rod *Fusarium* kao poljska

plijesan. Uvjeti koje treba kontrolirati u skladištu su aktivitet vode, razina ugljikovog dioksida i temperatura. Budući da je prisutna vlaga u usjevima jedan od glavnih faktora koji uzrokuju razvoj plijesni, žitarice je nakon žetve potrebno osušiti ispod razine vlage pogodne za razvoj plijesni. Prikladnim se smatra razina aktiviteta vode manja od 0,65, tj. relativna vlažnost ispod razine od 15%. Ovo je posebno važno u slučaju da su žetvi prethodila kišna razdoblja. Osušene žitarice trebaju biti transportirane u suhim, čistim i nekontaminiranim spremnicima. Tijekom skladištenja temperatura treba biti mjerena u reguliranim intervalima, a svaki neočekivani porast temperature može biti posljedica rasta nepoželjnih mikroorganizama (Pleadin i sur., 2019). Budući da plijesni imaju jako širok temperaturni raspon unutar kojeg mogu proizvoditi mikotoksine (otprilike 10-40°C ovisno o vrsti) teško je u potpunosti izbjeći za to pogodne uvjete, no istraživanja su pokazala da je uz kontrolu relativne vlažnosti i plinovitog sastava zraka optimalno da temperatura u skladištu bude manja od 21°C. Kontrolom plinovitog sastava zraka, tzv. modificiranom atmosferom, nastoje se postići uvjeti povišene razine ugljikovog dioksida, a snižene razine kisika u skladištu. Pokazalo se da takvi uvjeti mogu doprinijeti inhibiciji razvoja plijesni, no u obzir treba uzeti i visoku cijenu ovakve strategije (Liu i sur., 2020).

Budući da će klimatske promjene otežati raspolaganje žitaricama i planiranje njihovog uzgoja i skladištenja, svjetska populacija trebala bi pokušati doprinijeti smanjenju njihovih razmjera. Trenutno se kontaminacija žitarica nastoji spriječiti primjenom sintetskih fungicida koju su se pokazali učinkovitima ukoliko se primijene u polju prije žetve. Ipak, ove kemikalije mogu imati štetne učinke za okoliš i ljudsko zdravlje pa bi se trebalo više uložiti u pronalazak manje štetnih načina suzbijanja kontaminacije (Solanki i sur., 2021). Razvoj prognostičkih modela kojima bi se mogao predvidjeti utjecaj klimatskih promjena na različita geografska područja dodatno pridonosi visokom trošku koji će klimatske promjene uzrokovati u poljoprivredi. Iznimno učinkovito bilo bi podizanje ljudske svijesti o našem vlastitom doprinosu ovim promjenama i educiranje o svim štetnim posljedicama koje one donose, uključujući potpunu izmjenu uzgoja i opskrbe žitaricama u bliskoj budućnosti.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja na uzrocima pšenice, kukuruza i ječma triju regija Hrvatske te proučene literature mogu se izvući sljedeći najbitniji zaključci:

- Uzorci kukuruza pokazali su najviše vrijednosti srednjih koncentracija plijesni i kvasaca pri čemu su najviše vrijednosti postigli uzorci iz sjeverne Hrvatske sa  $4,65 \times 10^7$  CFU/g na podlozi MEA i  $5,6 \times 10^7$  CFU/g na podlozi DRBC. Najniže vrijednost ostvarili su uzorci ječma.
- Kontaminacija je bila prisutna u sve tri hrvatske regije bez značajnih razlika za iste vrste žitarica među njima, a rodovi plijesni koji su najviše kontaminirali proučene žitarice bili su *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.* i *Aspergillus spp.*
- Najveću učestalost u uzorcima pokazao je rod *Penicillium* koji je pronađen u svim analiziranim skupinama uzoraka na obje podloge u velikom udjelu, a u uzorcima pšenice istočne i sjeverne Hrvatske na podlozi DRBC učestalost ovog roda bila je čak 100%.
- Rod *Fusarium* zamijećen je na svim vrstama žitarica, no najveću učestalost pokazao je na uzrocima kukuruza. Na podlozi MEA radi se o učestalosti od 50% do 87,5%, a na podlozi DRBC od 50% do 100%.
- U uzorcima se pojavilo 5 različitih sekcija roda *Aspergillus* koji je kontaminirao uglavnom uzorke pšenice i kukuruza. Najveća učestalost od 40% identificirana je u uzorcima istočne Hrvatske za *Aspergillus* sekc. *Aspergillus* na pšenici (MEA) i *Aspergillus* sekc. *Flavi* na kukuruzu (DRBC) i pšenici (MEA).
- Posljedice klimatskih promjena na žitaricama bit će vidljive prije žetve, u polju te nakon žetve, tijekom skladištenja. Zato je važno osigurati adekvatne uvjete za čuvanje žitarica u skladištima kako bi se spriječila prekomjerna kontaminacija plijesnima sa štetnim posljedicama na zdravlje ljudi i životinja. Poželjni uvjeti skladištenja su  $a_w < 0,65$ , temperatura  $< 21^\circ\text{C}$  i modificirana atmosfera.

## 6. LITERATURA

- Baert K, Devlieghere F, Flyps H, Oosterlinck M, Ahmed M, Rajković A, Verlinden B, Nicolaï B, Debevere J, De Meuleaner B. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *Int J Food Microbiol*, 2007, 119, 170–181.
- Battilani P, Costa L, Dossena A, Gullino M, Marchelli R, Galaverna G, Pietri A, Dall'Asta C, Giorni P, Spadro D, Gualla A. Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants. *EFSA Supporting Publication*, 2009, 6(9).
- Beccari G, Caproni L, Tini F, Uhlig S, Covarelli L. Presence of *Fusarium* Species and Other Toxicogenic Fungi in Malting Barley and Multi-Mycotoxin Analysis by Liquid Chromatography– High-Resolution Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2016, 64, 4390-9.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST). Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Task force report, Ames, Iowa, USA, 2013, str. 1-7.
- Državni hidrometeorološki zavod, 2021., <https://www.meteo.hr>, pristupljeno 28.5.2022.
- van der Fels-Klerx HJ, Focker M, De Rijk T, Liu C. Mycotoxins in wheat cultivated in the Netherlands: results from eight years of field surveys. *Mycotoxin Res*, 2021, 37, 183-192.
- Felšöciová S, Kowalczewski PL, Krajčović T, Dráb Š, Kočániová M. Effect of Long-Term Storage on Mycobiota of Barley Grain and Malt. *Plants (Basel)*, 2021, 10, 1655.
- García-Díaz M, Gil-Serna J, Vázquez C, Botia M, Patiño B. A comprehensive study on the occurrence of mycotoxins and their producing fungi during the Maize production cycle in Spain. *Microorganisms*, 2020, 8, 141.
- Hussein H, Brasel J. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 2001, 167, 101-134.

- Kifer D, Sulyok M, Jakšić D, Krska R, Šegvić Klarić M. Fungi and their metabolites in grain from individual households in Croatia. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 2021, 14, 98-109.
- Lee H, Ryu D. Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. *J. Agric. Food Chem*, 2017, 65, 7034–7051.
- Leslie J, Logrieco A. Mycotoxin Reduction in Grain, New York, John Wiley & Sons, Inc, 2014, str. 309-326.
- Liu Y, Galani Yamdeu J, Gong Y, Orfila C. A review of postharvest approaches to reduce fungal and mycotoxin contamination of foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020, 19, 1521–1560.
- 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.
- Moretti A, Pascale M, Logrieco A. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends Food Sci. Technol*, 2019, 84, 38-40.
- Navale V, Vamkudoth K, Ajmera S, Dhuri V. Aspergillus derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. *Toxicol Rep*, 2021, 8, 1008–1030.
- Nešić K, Ivanović S, Nešić V. Fusarial Toxins: Secondary Metabolites of Fusarium Fungi. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2014, 228, 101–120.
- Park H, Jun S, Han K, Hong S, Yu J. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important Aspergillus Fungi. *Adv Appl Microbiol*, 2017, 100, 161–202.
- Paterson R, Venâncio A, Lima N. Solutions to Penicillium taxonomy crucial to mycotoxin research and health. *Res Microbiol*, 2004, 155, 507–513.

- Paterson R, Lima N. Further mycotoxin effects from climate change. *Food Res Int*, 2011, 44, 2555–2566.
- Perrone G, Ferrara M, Medina A, Pascale M, Magan N. Toxigenic fungi and mycotoxins in a climate change scenario: Ecology, genomics, distribution, prediction and prevention of the risk. *Microorganisms*, 2020, 8, 1-20.
- Perrone G, Susca A. Penicillium species and their associated mycotoxins. *Methods Mol Biol*, 2017, 1542, 107–119.
- Pleadin J, Frece J, Markov K. Mycotoxins in food and feed. *Adv Food Nutr Res*, 2019, 89, 297-345.
- Pravilnik o sigurnosti hrane za životinje, 2016, Zagreb, Narodne novine, broj 102 (NN 102/2016).
- Ráduly Z, Szabó L, Madar A, Pócsi I, Csernoch L. Toxicological and Medical Aspects of Aspergillus-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain. *Front Microbiol*, 2020, 10, 2908.
- Russell M, Paterson R, Lima N. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res Int*, 2010, 43, 1902–1914.
- Solanki MK, Abdelfattah A, Sadhasivam S, Zakin V, Wisniewski M, Droby S, Sionov E. Analysis of Stored Wheat Grain-Associated Microbiota Reveals Biocontrol Activity among Microorganisms against Mycotoxigenic Fungi. *J Fungi (Basel)*, 2021, 7, 781.
- Stuper-Szablewska K, Perkowski J. Contamination of wheat grain with microscopic fungi and their metabolites in Poland in 2006-2009. *Ann Agric Environ Med*, 2014, 21, 504–509.



## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### SAŽETAK

Žitarice su široko zastupljene u prehrambenoj industriji te iz tog razloga metode njihovog uzgoja i skladištenja moraju biti strogo kontrolirane. Podložne su razvoju plijesni od kojih neke proizvode po zdravlje opasne mikotoksine, a klimatske promjene i njihov direktan utjecaj na okolišne faktore poput temperature, padalina i razine ugljikovog dioksida dovest će do promjena u zastupljenosti plijesni i mikotoksina na žitaricama.

Za potrebe ovog eksperimentalnog rada prikupljeni su uzorci pšenice, kukuruza i ječma iz istočne, središnje i sjeverne Hrvatske. Radi se o ukupno 90 uzoraka iz skladišta prikupljenih u ožujku 2021. godine kako bi se identificirale plijesni porasle na ovim žitaricama i odredila njihova koncentracija. Nakon analize i statističke obrade podataka veća pažnja posvećena je rodovima *Penicillium*, *Fusarium* i *Aspergillus* koji su najčešći kontaminanti ovih žitarica.

Rezultati su pokazali da najznačajniju koncentraciju plijesni na žitaricama pokazuju uzorci kukuruza u sve tri hrvatske regije na podlogama MEA i DRBC (reda veličine  $10^6$  i  $10^7$ ). Rod *Penicillium* zastupljen je na svim uzorcima žitarica dok se rod *Fusarium* posebno ističe na uzorcima kukuruza. Rod *Aspergillus*, proizvođač aflatoksina, pokazuje najveću učestalost na uzorcima pšenice i kukuruza istočne Hrvatske.

Za adekvatno skladištenje žitarica važno je osigurati odgovarajuće uvjete temperature, vlage i razine ugljikovog dioksida u korištenim skladištima kako ne bi došlo do prekomjerne kontaminacije i gubitaka. Uz kontrolirane uvjete u proizvodnji važno je podignuti svijest populacije o klimatskim promjenama, troškovima koje one donose u poljoprivredi i tome kako će one posredno utjecati na žitarice široko zastupljene u našoj prehrani.

## SUMMARY

Cereal crops are widely spread in food industry and for that reason methods of their cultivation and storage have to be strictly controlled. They are susceptible to mold growth and some of developed mold types have the ability to produce mycotoxins dangerous for our health. Climate change directly influences environmental factors such as temperature, precipitation and carbon dioxide levels which will affect representation of molds and mycotoxins in crops.

For the purpose of this experimental work, samples of wheat, maize and barley were collected from eastern, middle and northern parts of Croatia. That includes 90 samples in total collected from storage units in March 2021 with the purpose of identifying grown molds on these crops and determining their concentration. After the analysis and statistical data processing more attention was given to *Penicillium*, *Fusarium* and *Aspergillus* species, most common contaminants of these crops.

Results have shown that the most significant mold concentration was observed in maize samples in all three Croatian regions on MEA and DRBC medium (orders of magnitude  $10^6$  and  $10^7$ ). *Penicillium* species was observed in all analysed samples while *Fusarium* species was particularly noted in maize samples. *Aspergillus* species, producer of aflatoxins, was identified most frequently in wheat and maize samples from eastern Croatian region.

For adequate storage of crops it is important to ensure proper temperature, moisture and carbon dioxide level conditions in used facilities to escape high contamination levels and unwanted effects on stored crop. Along with controlled conditions in manufacturing, it is important to raise awareness about climate change, expenses it will cause in agriculture and how it will affect crops which are widely spread in our diet.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## RAZVOJ PLIJESNI NA ŽITARICAMA ZA VRIJEME SKLADIŠTENJA

Lucija Tudorović

### SAŽETAK

Žitarice su široko zastupljene u prehrambenoj industriji te iz tog razloga metode njihovog uzgoja i skladištenja moraju biti strogo kontrolirane. Podložne su razvoju plijesni od kojih neke proizvode po zdravlje opasne mikotoksine, a klimatske promjene i njihov direktan utjecaj na okolišne faktore poput temperature, padalina i razine ugljikovog dioksida dovest će do promjena u zastupljenosti plijesni i mikotoksina na žitaricama.

Za potrebe ovog eksperimentalnog rada prikupljeni su uzorci pšenice, kukuruza i ječma iz istočne, središnje i sjeverne Hrvatske. Radi se o ukupno 90 uzoraka iz skladišta prikupljenih u ožujku 2021. godine kako bi se identificirale plijesni porasle na ovim žitaricama i odredila njihova koncentracija. Nakon analize i statističke obrade podataka veća pažnja posvećena je rodovima *Penicillium*, *Fusarium* i *Aspergillus* koji su najčešći kontaminanti ovih žitarica.

Rezultati su pokazali da najznačajniju koncentraciju plijesni na žitaricama pokazuju uzorci kukuruza u sve tri hrvatske regije na podlogama MEA i DRBC (reda veličine 106 i 107). Rod *Penicillium* zastupljen je na svim uzorcima žitarica dok se rod *Fusarium* posebno ističe na uzorcima kukuruza. Rod *Aspergillus*, proizvođač aflatoksina, pokazuje najveću učestalost na uzorcima pšenice i kukuruza istočne Hrvatske.

Za adekvatno skladištenje žitarica važno je osigurati odgovarajuće uvjete temperature, vlage i razine ugljikovog dioksida u korištenim skladištima kako ne bi došlo do prekomjerne kontaminacije i gubitaka na usjevima. Uz kontrolirane uvjete u proizvodnji važno je podignuti svijest populacije o klimatskim promjenama, troškovima koje one donose u poljoprivredi i tome kako će one posredno utjecati na žitarice široko zastupljene u našoj prehrani.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 8 grafičkih prikaza, 2 tablice i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

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

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

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

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

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

Rad prihvaćen: lipanj 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### MOLD CONTAMINATION OF CEREAL CROPS DURING STORAGE

**Lucija Tudorović**

#### SUMMARY

Cereal crops are widely spread in food industry and for that reason methods of their cultivation and storage have to be strictly controlled. They are susceptible to mold growth and some of developed mold types have the ability to produce mycotoxins dangerous for our health. Climate change directly influences environmental factors such as temperature, precipitation and carbon dioxide levels which will affect representation of molds and mycotoxins in crops.

For the purpose of this experimental work, samples of wheat, maize and barley were collected from eastern, middle and northern parts of Croatia. That includes 90 samples in total collected from storage units in March 2021 with the purpose of identifying grown molds on these crops and determining their concentration. After the analysis and statistical data processing more attention was given to *Penicillium*, *Fusarium* and *Aspergillus* species, most common contaminants of these crops.

Results have shown that the most significant mold concentration was observed in maize samples in all three Croatian regions on MEA and DRBC medium (orders of magnitude  $10^6$  and  $10^7$ ). *Penicillium* species was observed in all analysed samples while *Fusarium* species was particularly noted in maize samples. *Aspergillus* species, producer of aflatoxins, was identified most frequently in wheat and maize samples from eastern Croatian region.

For adequate storage of crops it is important to ensure proper temperature, moisture and carbon dioxide level conditions in used facilities to escape high contamination levels and unwanted effects on crop yield. Along with controlled conditions in manufacturing, it is important to raise awareness about climate change, expenses it will cause in agriculture and how it will affect crops which are widely spread in our diet.

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

Thesis includes: 38 pages, 8 figures, 2 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: molds, cereal crops, climate change, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, mycotoxins

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

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

The thesis was accepted: June, 2022