

Priprema mikrobioloških kultura plijesni za trajno skladištenje i globalnu distribuciju

Balaić, Patricia

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University North / Sveučilište Sjever**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:879589>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





Sveučilište Sjever

Završni rad br. 69/PREH/2024

Priprema mikrobioloških kultura plijesni za trajno skladištenje i globalnu distribuciju

Patricia Balaić, 0336056815

Koprivnica, rujan 2024. godine



Sveučilište Sjever

Odjel za Prehrambenu tehnologiju

Završni rad br. 69/PREH/2024

Priprema mikrobioloških kultura plijesni za trajno skladištenje i globalnu distribuciju

Student

Patricia Balaić, 0336056815

Mentor

Bojan Šarkanj, izv.prof.dr.sc.

Koprivnica, rujan 2024. godine

Zahvale

Ovim putem zahvaljujem svome mentoru izv. prof. dr. sc. Bojanu Šarkanju na ukazanome povjerenju i uloženom trudu u izradi završnog rada, ali i prenesenom znanju kroz sve godine studija. Zahvaljujem se ostalim profesorima i kolegama sa Sveučilišta Sjever koji su mi obogatili i uljepšali period studiranja.

Posebno se zahvaljujem mojoj obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i potpori koji su me uspješno doveli do kraja školovanja.

Sažetak

Plijesni su višestanični mikroorganizmi iz carstva gljiva. Široko su zastupljene okolišu u vegetativnom obliku, građene od hifa koje tvore micelij, ili u obliku latentnih spora. Kao i sva živa bića imaju mogućnost razmnožavanja koje se provodi spolnim ili nespolnim sporama ovisno o vrsti plijesni. Mikotoksikogene plijesni uzrokuju veliki problem za ljude u zdravstvenom i gospodarskom aspektu stvarajući otrove štetne po zdravlje ostalih živih organizama. U svrhu različitih istraživanja nad plijesnima koriste se unaprijed pripremljene standardne suspenzije spora. U ovome radu opisan je uzgoj plijesni *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticillioides* na hranjivim podlogama u laboratoriju. Nakon uzgoja proveden je postupak ispiranja i brojanje spora plijesni pod mikroskopom te priprema standardiziranih otopina koncentracije od 10^6 spora po mililitru suspenzije te dugotrajno skladištenje istih.

Ključne riječi: plijesni, mikotoksini, spore, standardne suspenzije, dugotrajna pohrana mikroorganizama

Summary

Molds are multicellular microorganisms from the kingdom of fungi. They are widely present in the environment in their vegetative form, consisting of hyphae that form mycelium, or in the form of dormant spores. Like all living beings, they have the ability to reproduce, which occurs through sexual or asexual spores depending on the type of mold. Mycotoxigenic molds pose a significant problem for humans in both health and economic aspects, producing toxins harmful to the health of other living organisms. Pre-prepared standard spore suspensions are used for various research purposes on molds. This paper describes the cultivation of molds *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Fusarium graminearum*, and *Fusarium verticillioides* on nutrient media in the laboratory. After cultivation, the process of washing and counting mold spores under a microscope was conducted, followed by the preparation of standardized solutions with a concentration of 10^6 spores per milliliter of suspension and their long term storage.

Keywords: molds, mycotoxins, spores, standard suspensions, long term storage of microbes

Prijava završnog rada

Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL	Odjel za prehrambenu tehnologiju		
STUDIJ	Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija		
PRISTUPNIK	Patricia Balaić	MATIČNI BROJ	0336056815
DATUM	09.07.2024.	KOLEGIJ	Prehrambena mikrobiologija
NASLOV RADA	Priprema mikrobioloških kultura plijesni za trajno skladištenje i globalnu distribuciju		

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Preparation of microbiological cultures of mold for permanent storage and global distribution

MENTOR Bojan Šarkanj ZVANJE izv. prof. dr. sc.

ČLANOVI POVJERENSTVA

- izv. prof. dr. sc. Krunoslav Hajdek, predsjednik
- prof. dr. sc. Božo Smoljan, član
- izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj, mentor
- Iva Grubješić, pred. komentorica
- Ivana Dodlek Šarkanj, pred. član

Zadatak završnog rada

BROJ 69/PREH/2024

OPIS

U završnom radu portebno je opisati opstupak uzgoja i pripreme susupenzija spora mikotoksikogenih plijesni *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticillioides* standardiziranih za mikrobiološki rad. Plijesni su višestanični mikroorganizmi iz carstva gljiva. Mikotoksikogene plijesni uzrokuju veliki problem za ljude u zdravstvenom i gospodarskom aspektu stvarajući otrove štetne po zdravlje ostalih živih organizama. U svrhu različitih istraživanja nad plijesnima koriste se unaprijed pripremljene standardne suspenzije spora, te globalna distribucija istih.

ZADATAK URUČEN 21.8.2024.

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE
SJEVER





IZJAVA O AUTORSTVU

Završni/diplomski/specijalistički rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, PATRICIA BAKIĆ (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog/specijalističkog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom TRUPČINA MIKROBIOLOŠKE KULTURE PLESIA EA (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:

(upisati ime i prezime)

PATRICIA BAKIĆ

Bakić

(vlastoručni potpis)

Sukladno članku 58., 59. i 61. Zakona o visokom obrazovanju i znanstvenoj djelatnosti završne/diplomske/specijalističke radove sveučilišta su dužna objaviti u roku od 30 dana od dana obrane na nacionalnom repozitoriju odnosno repozitoriju visokog učilišta.

Sukladno članku 111. Zakona o autorskom pravu i srodnim pravima student se ne može protiviti da se njegov završni rad stvoren na bilo kojem studiju na visokom učilištu učini dostupnim javnosti na odgovarajućoj javnoj mrežnoj bazi sveučilišne knjižnice, knjižnice sastavnice sveučilišta, knjižnice veleučilišta ili visoke škole i/ili na javnoj mrežnoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice, sukladno zakonu kojim se uređuje umjetnička djelatnost i visoko obrazovanje.

Popis korištenih kratica

pH	negativni logaritam koncentracije vodikovih iona
OTC	ohratoksin C
DON	deoksinivalenol
NIV	nivalenol
PDA	Krumpirov dekstrozni agar (<i>eng. Potato dextrose agar</i>)
MBA	Agar od mungo graha (<i>eng. Mung bean agar</i>)

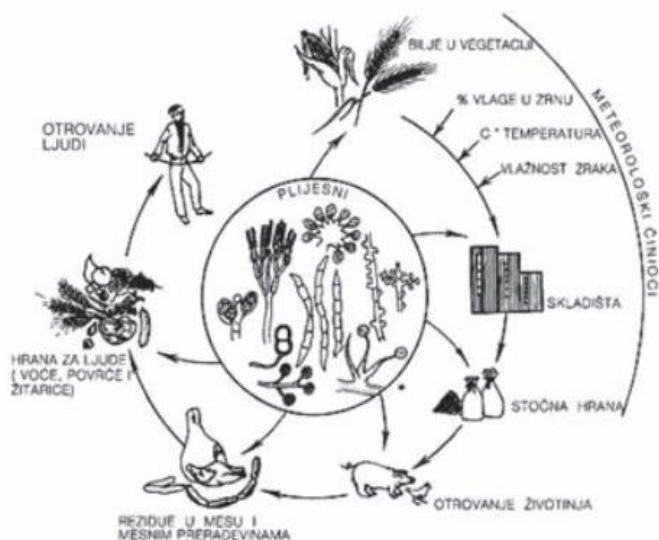
Sadržaj

Predgovor.....
Sažetak.....
Popis korištenih kratica.....
1. Uvod.....	1
2. Obrada zadatka.....	3
2.1. Plijesni.....	3
2.1.1. Građa plijesni.....	3
2.1.2. Istraživane vrste plijesni.....	5
2.2. Podloge za sporulaciju plijesni.....	10
2.2.1. PDA agar.....	11
2.2.2. MBA agar.....	11
2.3. Komore za brojanje suspenzije spora.....	11
2.4. Mediji za trajno čuvanje spora plijesni.....	12
3. Praktični dio.....	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Laboratorijski uređaji.....	13
3.1.2. Laboratorijski pribor.....	13
3.1.3. Materijali i kemikalije.....	13
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Sterilizacija pribora.....	14
3.2.2. Priprema hranjivih podloga.....	14
3.2.3. Inkubacija plijesni.....	15
3.2.4. Brojanje spora.....	16
3.2.5. Skladištenje suspenzija spora.....	17
4. Analiza rezultata.....	18
4.1. Priprema suspenzije spora plijesni <i>Aspergillus flavus</i>	18
4.2. Priprema suspenzije spora plijesni <i>Aspergillus ochraceus</i>	20
4.3. Priprema suspenzije spora plijesni <i>Penicillium expansum</i>	21
4.4. Priprema suspenzije spora plijesni <i>Fusarium graminearum</i>	22
4.5. Priprema suspenzije spora plijesni <i>Fusarium verticillioides</i>	23
5. Zaključak.....	25
6. Literatura.....	26
Popis slika.....	27

1. Uvod

Plijesni su višestanični mikroorganizmi iz carstva gljiva [1]. Preko 200 godina znanstvenici debatiraju koje sve organizme ubrajati u carstvo *Funga*.. U knjizi *The Dictionary of Fungi* autora Paula M. Kirka i suradnika u zadnjem izdanju knjige navedeno je 97.330 različitih vrsta koje ubrajamo u carstvo gljiva. Brojni znanstvenici procjenjuju da bi stvarna brojka različitih vrsta mogla dosegnuti oko 1,5 milijuna [2].

Plijesni su široko rasprostranjeni organizmi, a u prirodi se mogu naći kao aktivno živuća vegetativna tijela ili u obliku latentnih spora. Tijelo plijesni građeno je od nitastih stanica koje isprepletenu rastu tvoreći gustu mrežu [1]. Mikotoksini su spojevi male molekulske mase s toksičnim i kancerogenim djelovanjem za ljude i životinje pri niskim koncentracijama. Rodovi *Penicillium*, *Fusarium* i *Aspergillus* smatraju se jednim od najznačajnijih predstavnika mikotoksikogenih plijesni. Mikotoksini u hrani predstavljaju velik rizik u stvaranju bolesti te štetu u gospodarstvu. Bolesti nastale kao posljedica unosa prevelikih količina mikotoksina zovu se mikotoksikoze [3].



Slika 1.1.: Put mikotoksina u hrani [3]

Plijesni imaju sposobnost proizvodnje različitih kemijskih spojeva. Osim već spomenutih mikotoksina, neki od produkata plijesni su limunska kiselina, spojevi s antibiotskim djelovanjima (penicilin) i slični koji za čovjeka imaju i korisnu funkciju [3].

Mikrobiološka istraživanja često su dugotrajan i kompleksan proces. Standardne suspenzije spora plijesni koriste se kao ključni materijal kod različitih vrsta istraživanja antifungalnih djelovanja, u svrhu održavanja čistih kultura i dr.

U ovom radu teorijski je opisano pet vrsta mikotoksikogenih plijesni: *A. flavus*, *A. ochraceus*, *P. expansum*, *F. graminearum* i *F. verticillioides*, nadalje je opisana i priprema standardnih suspenzija spora istih. Tema je obrađena teorijski podacima iz znanstvenih knjiga i časopisa te praktično u laboratoriju Odjela za prehrambenu tehnologiju Sveučilišta Sjever. Postupak uključuje sam početak od naciepljivanja i uzgoja plijesni na hranjivim podlogama, preko brojanja spora, načina pripreme suspenzija za svaku pojedinu plijesan do skladištenja suspenzija.

2. Obrada zadatka

2.1. Plijesni

Plijesni su višestanični organizmi iz carstva gljiva (*fungi*) u kojem se još nalaze kvasci i više gljive [1], a poznato je više od 100.000 različitih vrsta koje se ubrajaju u isto [2]. Plijesni su široko rasprostranjene, te rastu na raznolikim staništima poput pustinja, mora, područja s ekstremno niskim/visokim temperaturama [4].

S obzirom na osnovne parametre rasta, mikroorganizme (uključujući i plijesni) plijesni dijelimo ovisno o:

1. Temperaturi rasta:
 - a. Psihrofilni (od 0 °C do 20 °C)
 - b. Mezofili (od 20 °C do 45 °C)
 - c. Termofilni (od 45 °C do više od 90 °C)
2. Potrebnom za kisikom
 - a. aerobni mikroorganizmi
 - b. anaerobni mikroorganizmi
 - c. mikroaerofilni mikroorganizmi
 - d. fakultativni anaerobni mikroorganizmi
3. pH medija
 - a. neutrofilni (preferiraju neutralno pH-područje)
 - b. acidofilni (vole kiselo)
 - c. alkalofilni (vole bazično) [5]

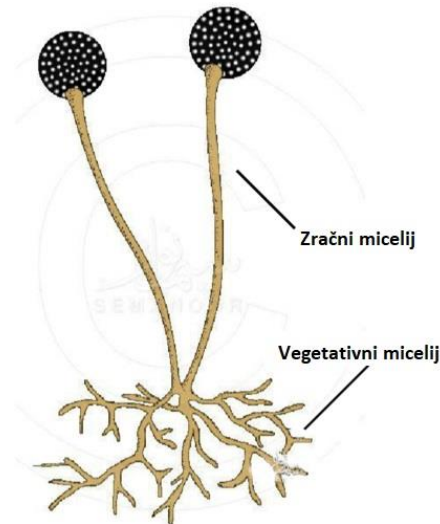
Prema načinu prehrane plijesni ubrajamo u heterotrofe koji se hrane supstratima drugih živih organizama (uglavnom biljaka i životinja) [4].

Plijesni su široko rasprostranjeni mikroorganizmi, te u usporedbi s ostalim mikroorganizmima vrlo otporni na vanjske čimbenike [5], a u prirodi se mogu naći kao aktivno živuća vegetativna tijela ili u obliku spora [1].

2.1.1. Građa plijesni

Tijelo plijesni sastavljeno je od mnoštva mikroskopski malenih razgranatih niti – hife. Hife rastu tvoreći gustu mrežu zvanu micelij [1]. Prema funkciji razlikuju se vegetativni i reproduktivni micelij (Slika 2.1.). Vegetativni micelij apsorbira hranjive tvari iz okoline te ima zadaću

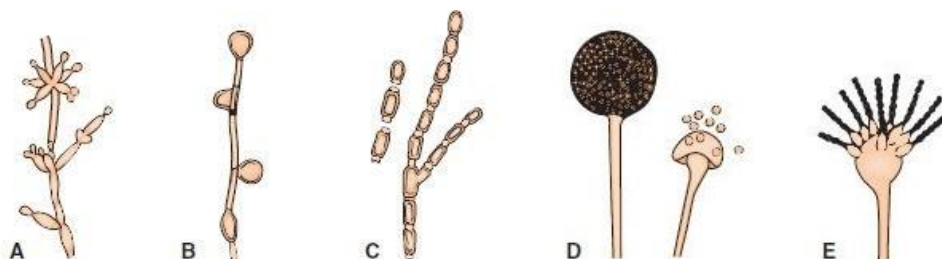
prehranjivanja plijesni i oblikuje tijelo plijesni u koloniju. Reproductivni micelij ili zračni micelij nosi strukture kojima se plijesan spolno i/ili nespolno razmnožava [6]. Zračni micelij osim toga tvori pučnasti oblik kolonije plijesni [1]. Plijesni se razlikuju po boji i širini hifa, te građi i broju poprečnih pregrada. Tako razlikujemo hijalohifomicete, plijesni neobojenih spora, od feohifomiceta, plijesni čije su hife tamnosmeđe do crno obojane [6].



Slika 2.1.: Vegetativni i zračni micelij, prilagođeno iz [7]

Na vrhovima zračnog micelija nalaze se tvorevine za razmnožavanje u/nu kojima se stvaraju posebne stanice – spore. Svaka spora plijesni u povoljnim uvjetima može stvoriti novu koloniju iste plijesni. Plijesni u pravilu proizvode velike količine spora koje su otporne na uvjete u kojima se vegetativne stanice plijesni uništavaju. Prema vrsti razmnožavanja, plijesni tvore spolne i nespolne spore [1].

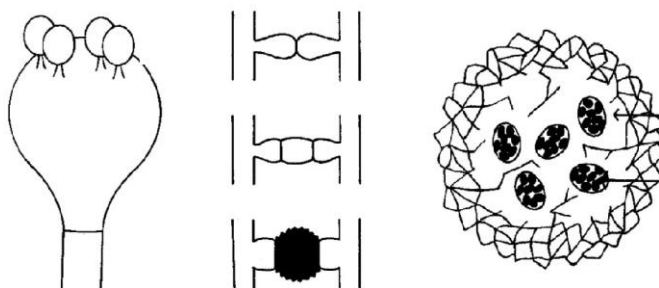
Nespolne spore nastaju procesom jednostavnog dijeljenja stanica. S obzirom na morfologiju nespolnih spora (Slika2.2.) mogu se prepoznati i različite vrste plijesni [1].



Slika 2.2.: Nespolne spore s lijeva na desno: blastospore, klamidospore, artrospore, sporangiospore, konidiospore, prilagođeno iz [8]

Blastospore su spore koje nastaju pupanjem. Klamidospore nastaju od vegetativnih hifa. Artrospore nastaju unutar hifa, od zadebljanih staničnih stijenki koje zatim fragmentiraju te svaki odjeljak predstavlja jednu sporu. Sporangiospore nastaju u takozvanim sporangijima koji nastaju na vrhu zračne hife, a koji pucaju nakon što spore sazriju. Konidiospore se stvaraju u obliku grozdanih nakupina te se vrlo lako šire [1].

Spolne spore kod plijesni rezultat su spolnog razmnožavanja. Rjeđe se pojavljuju od nespolnih spora te se proizvode uglavnom u specijalnim okolnostima (promjena temperature, količine vode ili izvora nutrijenata). Spolne spore razlikujemo prema njihovom nastanku (slika 2.3.) [1].

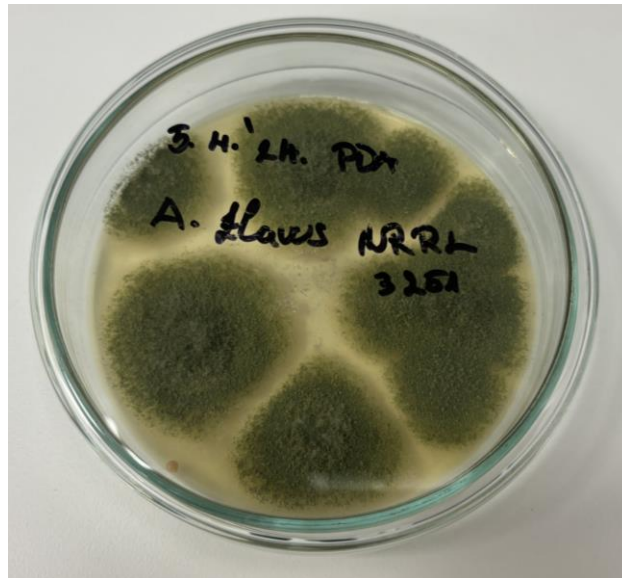


Slika 2.3.: Spolne spore s lijeva na desno: bazidiospore, zigospore, askospore, prilagođeno iz [9]

Bazidiospore stvaraju se s vanjske strane bazidija i to najčešće po četiri komada. Zigospore su velike spore okružene debelom stijenkom, a nastaju kao rezultat spajanja jezgri dviju stanica morfološki sličnih osobina. Askospore također nastaju spajanjem dviju stanica u strukturi nalik vrećici, askusu. U askusu se stvaraju dvije do osam askospora [1].

2.1.2. Istraživane vrste plijesni

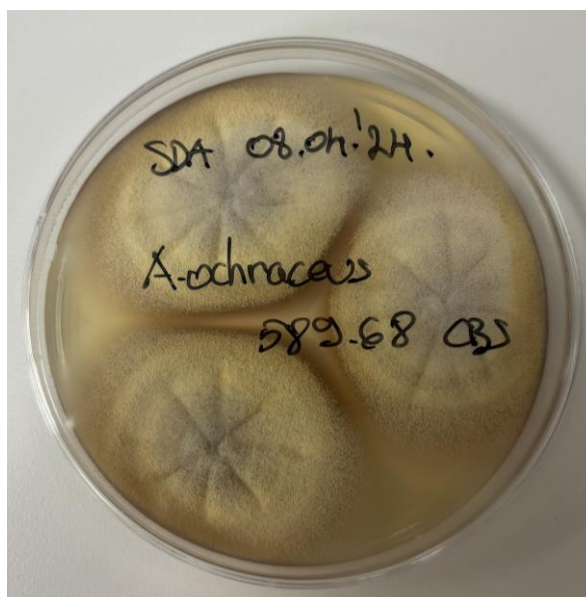
Aspergillus flavus je plijesan iz roda *Aspergillus* koji sadrži preko 250 vrsta. *A. flavus* široko je rasprostranjena plijesan koja je prisutna u tlu, skladištima žitarica, stočnoj hrani, truloj vegetaciji [10]. Najbolji rast ima pri temperaturi od 33 °C. Vegetativne hife tvore micelij u pahuljastoj formaciji s praškastom prevlakom, sklerocij zelene boje (Slika 2.4.) [11]. Zračne hife sadrže tvorevine za razmnožavanje, u ovome slučaju konidiospore [10].



Slika 2.4.: *A. flavus* uzgojena na hranjivoj podlozi [vlastiti izvor]

Plijesni iz roda *Aspergillus* imaju sposobnost proizvodnje mikotoksina – sekundarnih produkata metabolizma plijesni. Mikotoksini su spojevi male molekulske mase s toksičnim i kancerogenim djelovanjem na ljude i životinje pri niskim koncentracijama. Vrsta *A. flavus* od svih vrsta iz roda *Aspergillus* najznačajniji je producent mikotoksina [12]. Najpoznatiji predstavnik mikotoksina ove vrste plijesni jest aflatoksin. U prirodi su najznačajnije 4 glavne skupine aflatoksina: AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2. Razlikuju se prema boji koju fluoresciraju ispod UV zračenja (B – plava, G – zelena) te prema svojoj toksičnosti (AFB1 i AFG1 su toksičniji od AFB2 i AFG2) [13]. Postoji posebna skupina aflatoksina koji nisu direktni metaboliti plijesni. Aflatoksini AFM1 i AFM2 rezultat su metabolizma sisavaca koji su konzumirali hranu zaraženu aflatoksinom AFB1 i AFB2, pa ih zbog toga pronalazimo najčešće u mlijeku sisavaca i proizvodima od istog [13].

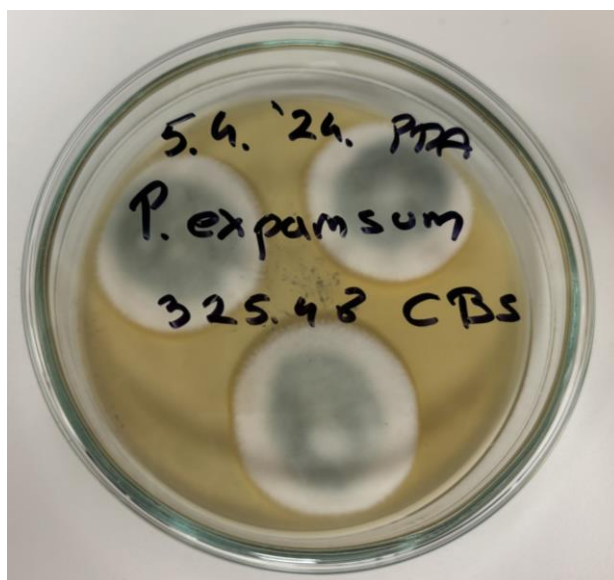
Aspergillus ochraceus najčešće se može pronaći u orašastim plodovima i žitaricama poput riže, ječma, kukuruza, kikirikija i soje, sušenoj i uskladištenoj hrani, povrću, voću i grožđu. Raste u kolonijama svijetlo do zlatno žute boje. Optimalna temperatura za rast *A. ochraceus* iznosi 37 °C. U nepovoljnim uvjetima rasprostranjuje se žuto-smeđim konidiosporama [13].



Slika 2.5.: *A. ochraceus* uzgojena na hranjivoj podlozi [vlastiti izvor]

Plijesan *A. ochraceus* proizvodi više vrsta mikotoksina, najobilniji i najtoksičniji je ohratoksin A, uz kojeg su tu još ohratoksini B i OTC. OTA je snažan mikotoksin s hepatoksičnim, nefrotoksičnim, kancerogenim i genotoksičnim djelovanjem. Nalazi se u kontaminiranim proizvodima, naročito u žitaricama (ječam, pšenica, kukuruz, zob), kruhu, pivu, sirovoj i prženoj kavi, sušenome voću, crnome vinu, čajevima i dr. [3].

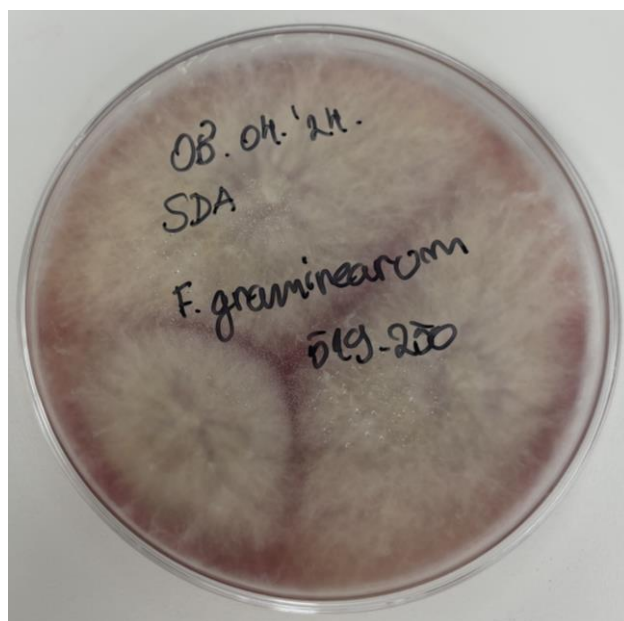
Penicillium expansum jedna je od dvjestotinjak poznatih vrsta plijesni iz roda *Penicillium*. U prirodi raste u tlu, na žitaricama, oštećenim plodovima voća i povrća, na vlažnim površinama. Prijenos plijesni do ploda najčešće se vrši vodom. Plijesan u plodove voća i povrća može ući tek nakon što su mehanički oštećeni pa se truljenje najčešće javlja u fazi skladištenja. Plijesan svrstavamo u skupinu psihrofila, tj. plijesni koje imaju sposobnost rasta i na prilično niskim temperaturama. Najniže temperature koje nisu utjecale na *P. expansum* išle su i do -6 °C, dok optimalna iznosi 25 °C. U nepovoljnim uvjetima ima sposobnost stvaranja konidiospora plavozelene boje (Slika 2.6.) po kojima je plijesan vrlo lako prepoznati [11].



Slika 2.6.: *P. expansum* uzgojena na hranjivoj podlozi [vlastiti izvor]

P. expansum važan je producent dvaju mikotoksina: patulina i citrinina [11]. Patulin je u početku smatran antibiotikom zbog toksičnog djelovanja na bakterije, sve dok se nije dokazalo kako ima citotoksično djelovanje i na druge mikroorganizme, ali i više organizme, biljke, životinje, pa tako i na ljude [3]. Citrinin, iako je jedan od prvo otkrivenih mikotoksina, nije još uvijek u potpunosti istražen. Postoje dokazi kako citrinin nepovoljno djeluje na sintezu ribonukleinske kiseline, te ima nefrotoksično, hepatotoksično, teratogeno, genotoksično i fetotoksično djelovanje kod čovjeka [14].

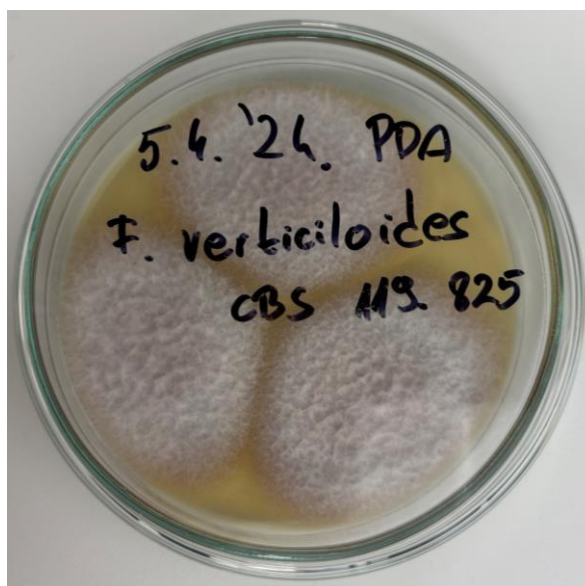
Fusarium graminearum, telemorf *Gibberella zeae*, spada u najrasprostranjenije vrste porodice *Fusarium*. *F. graminearum* najprije se može pronaći na usjevima pšenice, kukuruza i ječma, a rjeđe i na soji, šećernoj repi, bananama i krumpiru. Optimalna temperatura za rast kreće se oko 24-26 °C. Ovisno o mediju na kojem rastu mogu biti boje od bijele, žute, do roze i ljubičaste, a teksture vunaste poput pamuka. Kod nepovoljnih uvjeta stvara askospore nalik tankom polumjesecu [11].



Slika 2.7.: *F. graminearum* uzgojena na hranjivoj podlozi [vlastiti izvor]

F. graminearum producent je gotovo 50 različitih spojeva koje smatramo mikotoksinima. Najbitnije je istaknuti zearalenon i spojeve iz skupine trihotecena: T-2, HT-2, deoksinivalenol i nivalenol [11]. Zearalenon je estrogeni nesteroidni mikotoksin koji kod djece uzrokuje uranjeli pubertet, a zabrinutost se javlja zbog rezultata prisutnosti spoja u većem broju testiranih uzoraka dječje hrane. Postoje istraživanja koja zearalenonu prepisuju toksična djelovanja na životinje [3]. Trihoteceni su grupa od oko 150 različitih spojeva sekundarnog metabolizma plijesni. Podijeljeni su u četiri skupine: A, B, C, D. Najbitniji predstavnici B skupine trihotecena jesu DON i NIV, a najtoksičniji T-2 i HT-2 s teratogenim učincima spadaju u skupinu A trihotecena. Trihoteceni su snažni inhibitori sinteze proteina u eukariota što rezultira posljedicama u cijelom organizmu od dermatoloških, imunskih, hematoloških, nefroloških do gastrointestinalnih problema. Kod životinja najčešće započinje odbijanjem hrane [3].

Fusarium verticillioides smatra se jednom od najčešćih plijesni koje se mogu pronaći na kukuruzu i pšenici. Osim na žitaricama pronalazi se i na uljaricama, orašastim plodovima, mahunarkama, citrusima i tropskom voću. Trulež uzrokovana *F. verticillioides* prepoznaje se po bijeloj boji micelija. Plijesan može rasti na velikom intervalu temperatura, od najniže 2,5-5 °C do najviše temperature od 32-37 °C. Optimalna temperatura za rast *F. verticillioides* iznosi oko 25 °C. Kod nepovoljnih uvjeta stvara askospore nalik tankom polumjesecu [11].



Slika 2.8.: *F. verticillioides* uzgojena na hranjivoj podlozi [vlastiti izvor]

F. verticillioides može inficirati namirnice i bez znatno vidljivih znakova, no infekcija se može prepoznati prisutnošću mikotoksina, posebice fumonizina B. Glavni mikotoksini iz skupine fumonizina B koje *F. verticillioides* proizvodi jesu fumonizin B1 i B2 [8]. Iako nema značajnih podataka o trovanjima fumonizinom kod ljudi, u životinja su zabilježena oštećenja i karcinom bubrega, jetre, jednjaka, plućni edem i leukoencefalomacija [3].

2.2. Podloge za sporulaciju plijesni

Hranjive podloge su medij koji sadrže hranjive i druge tvari ovisno o svojoj namjeni. Prema konzistenciji dijele se na tekuće, polutekuće i krute hranjive podloge. Najčešći sastojci hranjivih podloga su destilirana voda, anorganske soli, pepton, ekstrakti kvasce, te sredstva za skrućivanje (npr. agar, želatina) za pripremu čvrstih podloga [15].

Prema upotrebi u laboratoriju hranjive podloge dijele se na:

- a) Osnovne hranjive podloge dobar su izvor ugljika, šećera, aminokiselina, soli i vitamina. Omogućuju rast različitim vrstama mikroorganizama. Koriste se i kao temelj za izradu drugih vrsta podloga [15].
- b) Diferencijalne hranjive podloge upotrebljavaju se za izolaciju čiste kulture. Na diferencijalnim podlogama različite vrste mikroorganizama pokazuju karakteristične oblike rasta kolonija na temelju kojih se razlikuju od drugih vrsta [15].
- c) Selektivne hranjive podloge služe za poticanje rasta jednih, a inhibiciju rasta drugih vrsta mikroorganizama. U podlogu se mogu dodati tvari poput kiselina, antibiotika, antimikotika, soli, i dr. [15].

- d) Hranjive podloge za transport
- e) Hranjive podloge za poticanje rasta

Za pripremu suspenzija spora, hranjive podloge pripremaju se u obliku krutih kosih agara u epruvetama.

2.2.1. PDA agar

Kada je riječ o uzgoju plijesni najčešći odabir je krumpirov dekstrozni agar (PDA). Šećer i ekstrakt krumpira potiču rast plijesni i kvasaca, a plijesni na PDA podlozi tvore svoje tipične morfološke oblike. Nakon kuhanja i hlađenja podloga je prozirna i žute boje [1].

2.2.2. MBA agar

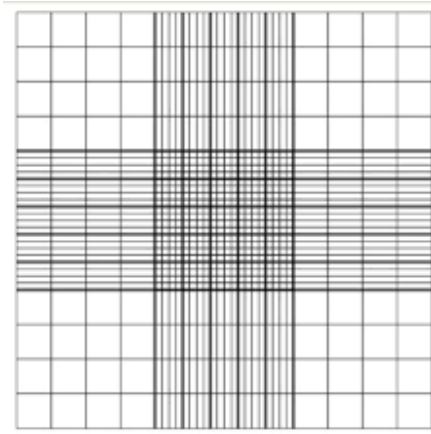
Plijesni roda *Fusarium* na PDA agaru stvaraju vrlo malu količinu spora. Mung bean agar (MBA) dokazano pospješuje sporulaciju plijesni roda *Fusarium* (Slika 2.9.)[16].

	MBA	PDA
Week 1	6.52 X 10 ⁴ f	0.38 X 10 ⁴ k
Week 2	32.66 X 10 ⁴ d	0.40 X 10 ⁴ k
Week 3	125.36 X 10 ⁴ b	0.12 X 10 ⁴ k
Week 4	255.76 X 10 ⁴ a	0.28 X 10 ⁴ k

Slika 2.9.: Usporedba količina proizvedenih spora plijesni *F. graminearum* na MBA i PDA podlozi prilagođeno iz [16]

2.3. Komore za brojanje suspenzije spora

Stanice ili spore mikroorganizama mogu se brojati pod mikroskopom uz pomoć takozvanih komora za brojanje stanica (hemocitometar). Brojanje spora hemocitometrom omogućuje određivanje ukupnog broja spora u određenom volumenu otopine. Komore su građene od debelog stakla sa metalnom pločicom u sredini, u kojoj su izrezbarene linije kvadrata koje čine mrežu (Slika 2.10) površine 0,0025 mm², te sa po dva žlijeba sa svake strane metalne pločice [17].



Slika 2.10.: Mreža kvadrata na metalnoj pločici hemocitometra [18]

Komora se priprema za rad na način da se bridovi između žlijebova navlaže nakon čega se pokrovno stakalce prstima prisloni i polako pomiče o bridove kako bi se pričvrstilo. Metalna pločica spuštена je za 0,100 mm od bridova te se u prostor između pločice i pokrovnog stakla pomoću pipete ispušta suspenzija stanica. Nakon ubrizgavanja tekućine preporuča se pričekati 3-5 minuta do mikroskopiranja kako bi se stanice staložile na pločici. Pod mikroskopom započinje brojanje stanica u 4 kutna kvadrata [16]. Broj stanica u mililitru otopine preračunava se prema formuli (1).

$$n = \left(\frac{\text{ukupan broj spora u kutnim kvadratima}}{4} \right) * 10^4 \quad (1)$$

2.4. Mediji za trajno čuvanje spora plijesni

Nakon uzgoja plijesni na kosom agaru, spore iz epruvete prikupljaju se fiziološkom otopinom (otopina NaCl 9 g/L).

3. Praktični dio

3.1. Materijali

3.1.1. Laboratorijski uređaji

- Autoklav
- Inkubator
- Mikrobiološki laminar
- Mikroskop

3.1.2. Laboratorijski pribor

- Staklene epruvete
- Laboratorijske pipete
- Hemocitometar
- Staklene boce
- Električni grijač
- Miješalica Vortex
- Ušice za nacjepljivanje

3.1.3. Materijali i kemikalije

- Fiziološka otopina
- PDA, Liofilchem
- Mung grah
- Agar, Biolab

3.2. Metode

3.2.1. Sterilizacija pribora

Za rad u mikrobiološkom laboratoriju obavezna je sterilna oprema i pribor. Sterilizacija je provedena u autoklavu (Slika 3.1.) na 121 °C kroz 15 minuta.



Slika 3.1.: Autoklav [vlastiti izvor]

3.2.2. Priprema hranjivih podloga

Za uzgoj plijesni pripremale su se dvije vrste hranjivih podloga, PDA i MBA.

PDA podloga se pripremala prema recepturi: otopiti 42 g dehidrirane podloge u 1 L destilirane vode, autoklavirati 15 minuta na 121 °C.

MBA podloga se pripremala na način da se u staklenu posudu od 2 L stavilo zagrijavati 1 L destilirane vode i 40 g mung graha (Slika 3.2.). Nakon početka vrenja mjerilo se 23 minute, nakon kojih se smjesa procijedila u drugu staklenu bocu i nadopunila destiliranom vodom do oznake od 1 L. U tekućinu se dodalo 15 g agara i stavilo autoklavirati.



Slika 3.2.: Kuhanje mung graha [vlastiti izvor]

Nakon sterilizacije u autoklavu, podloge su se u laminaru pri sterilnim uvjetima ulijevale u epruvete. Za hlađenje epruvete su se slagale u blago ukošeni vodoravni položaj za dobivanje kosih agara (Slika 3.3.)



Slika 3.3.: Ohlađeni kosi agar u epruvetama [vlastiti izvor]

3.2.3. Inkubacija plijesni

Nakon 24 sata od pripremanja podloga, na kose agare nacjepljivale su se prethodno uzgajane plijesni pomoću sterilne mikrobiološke ušice. Plijesni rodova *Aspergillus* i *Penicillium*

nacijepljene su na PDA podlogu, a plijesni roda *Fusarium* nacijepljene su na MBA podlogu. Plijesni su inkubirane 7 dana na 25 °C, nakon čega se mogao vidjeti rast plijesni na površini hranjive podloge (Slika 3.4.).



Slika 3.4.: Narasle plijesni na kosom agaru [vlastiti izvor]

3.2.4. Brojanje spora

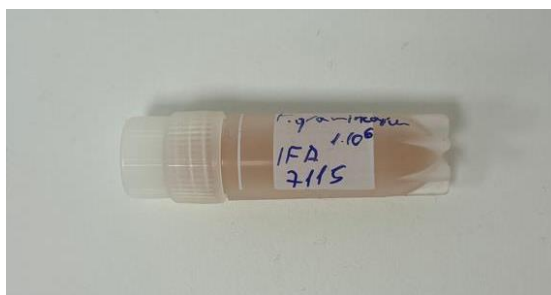
Brojanje spora započinje u laminaru ispiranjem spora sterilnom fiziološkom otopinom i laganim struganjem mikrobiološkom ušicom. Komora za brojanje spora (Slika 3.3.) prije početka mora biti očišćena i osušena. Komora za brojanje spora postavlja se tako da se na bridove stavi po kapljica fiziološke otopine na što se postavi pokrovno stakalce i lagano prstima protrlja kako bi staklo dobro prionulo uz komoru. Sadržaj epruvete se prije ubrizgavanja vorteksirao 10 sekundi kao bi se spore homogeno raspršile u fiziološkoj otopini. Pipetom se 10 μ L ubrizgalo uz rub metalne pločice i pokrovnog stakla. Mikroskopom su se na povećanju 100x brojile spore u četiri kutna kvadrata. Nakon dobivenih rezultata koncentracija spora u mililitru suspenzije podesila se na 10⁶ spora.



Slika 3.5.: Komora za brojanje spora Neubauer [vlastiti izvor]

3.2.5. Skladištenje suspenzija spora

Pripremljene suspenzije spora pakiraju se u mikroeprovete i skladište u zamrzivaču na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom godine dana ili $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do pet godina.

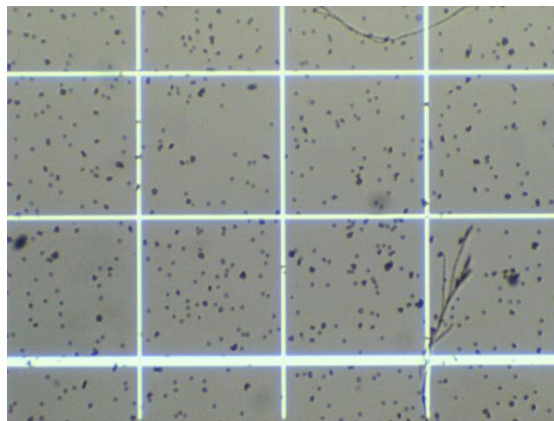


Slika 3.6.: Suspenzija spora *F. graminearum* u mikroeproveti

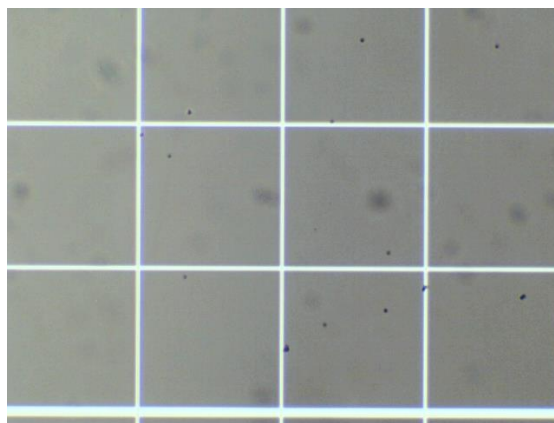
4. Analiza rezultata

4.1. Priprema suspenzije spora plijesni *Aspergillus flavus*

A. flavus je plijesan sa sposobnošću stvaranja velikog broja spora. Ispiranjem jedne epruvete, u kojoj je na kosi agar nacijepljena *A. flavus*, fiziološkom otopinom i stavljanjem komore ispod mikroskopa dobivena je Slika 4.1., nakon čega se radilo razrjeđenje 1:100 s ciljem lakšeg prebrojavanja spora. Nakon razrjeđenja suspenzije dobivena je Slika 4.2.



Slika 4.1.: Koncentracija spora plijesni *A. flavus* ispod mikroskopa



Slika 4.2.: Koncentracija spora plijesni *A. flavus* ispod mikroskopa nakon razrjeđenja

Nakon brojanja spora, putem formule (2) dobiven je slijedeći rezultat ukupnog broja spora u mililitru koncentrirane suspenzije:

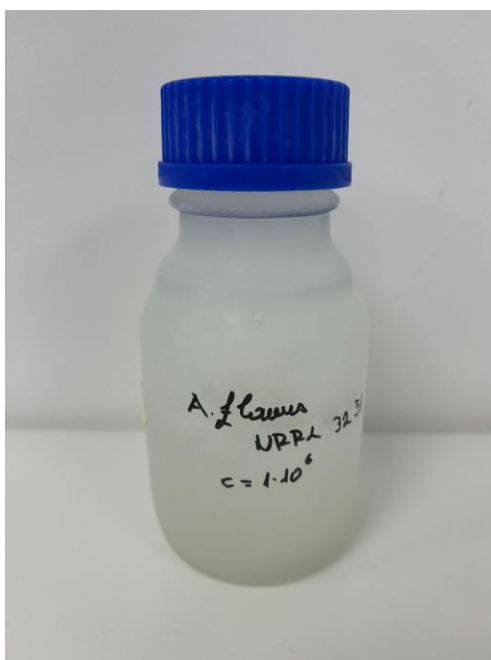
$$n = \frac{115}{4} * 10^2 * 10^4 = 28,75 * 10^6 \quad (2)$$

S obzirom da je koncentracija suspenzije veća od standardnih zahtjeva radilo se razrjeđenje prema formuli (3).

$$V_2 = \frac{n \cdot V_1}{c} = \frac{28,75 \cdot 10^6 \cdot 4,5 \text{ mL}}{10^6} = 129,4 \text{ mL} \quad (3)$$

Pri čemu je: V_2 volumen suspenzije koncentracije 10^6 spora po mililitru; n ukupan broj spora u koncentriranoj suspenziji; V_1 volumen koncentrirane suspenzije; c koncentracija standardne suspenzije spora.

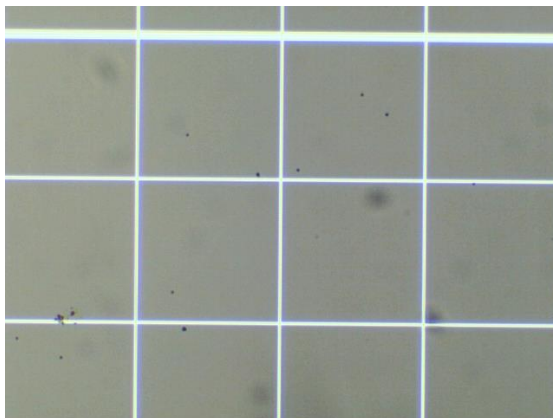
Razrjeđenjem koncentrirane suspenzije spora plijesni *A. flavus* dobiveno je ukupno 129,4 mL suspenzije spora koncentracije 10^6 spora po mL suspenzije (Slika 4.3.) miješanjem 4,5 mL koncentrirane suspenzije i 124,9 mL fiziološke otopine.



Slika 4.3.: Zamrznuta suspenzija spora plijesni *A. flavus*

4.2. Priprema suspenzije spora plijesni *Aspergillus ochraceus*

A. ochraceus također ima sposobnost stvaranja velikog broja spora. Ispiranjem jedne epruvete, u kojoj je na kosi agar nacijepljena *A. ochraceus*, fiziološkom otopinom dobila se suspenzija spora velike koncentracije nakon čega se radilo razrjeđenje 1:100 s ciljem lakšeg prebrojavanja spora. Nakon razrjeđenja suspenzije dobivena je Slika 4.4.



Slika 4.4.: Koncentracija spora plijesni *A. ochraceus* ispod mikroskopa nakon razrjeđenja

Nakon brojanja spora, putem formule (4) dobiven je slijedeći rezultat ukupnog broja spora u mililitru koncentrirane suspenzije:

$$n = \frac{26}{4} * 10^2 * 10^4 = 21,5 * 10^6 \quad (4)$$

Kako je koncentracija suspenzije veća od standardnih zahtjeva radilo se razrjeđenje prema formuli (5).

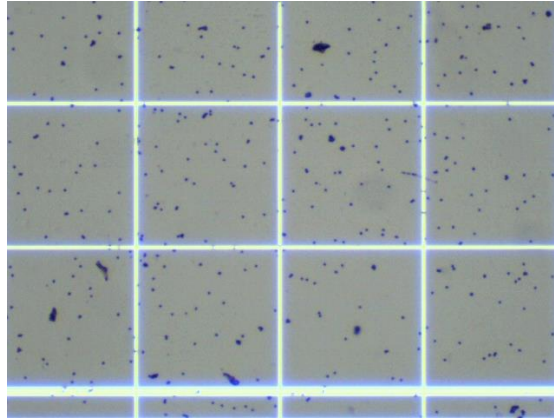
$$V_2 = \frac{n * V_1}{c} = \frac{21,5 * 10^6 * 4 \text{ mL}}{10^6} = 86 \text{ mL} \quad (5)$$

Pri čemu je: V_2 volumen suspenzije koncentracije 10^6 spora po mililitru; n ukupan broj spora u koncentriranoj suspenziji; V_1 volumen koncentrirane suspenzije; c koncentracija standardne suspenzije spora.

Razrjeđenjem koncentrirane suspenzije spora plijesni *A. ochraceus* dobiveno je ukupno 86 mL suspenzije spora koncentracije 10^6 spora po mL suspenzije miješanjem 4 mL koncentrirane suspenzije i 82 mL fiziološke otopine.

4.3. Priprema suspenzije spora plijesni *Penicillium expansum*

Ispiranjem jedne epruvete, u kojoj je na kosi agar nacijepljena *P. expansum*, fiziološkom otopinom i stavljanjem komore ispod mikroskopa dobivena je Slika 4.5.



Slika 4.5.: Koncentracija spora plijesni *P. expansum* ispod mikroskopa

Nakon brojanja spora, putem formule (6) dobiven je slijedeći rezultat ukupnog broja spora u mililitru koncentrirane suspenzije:

$$n = \frac{1.980}{4} * 10^4 = 495 * 10^4 = 4,95 * 10^6 \quad (6)$$

S obzirom da je koncentracija suspenzije veća od standardnih zahtjeva radilo se razrjeđenje prema formuli (7).

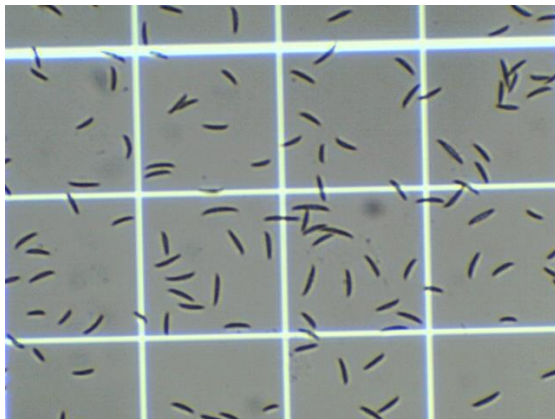
$$V_2 = \frac{n * V_1}{c} = \frac{4,95 * 10^6 * 4,5 \text{ mL}}{10^6} = 22,28 \text{ mL} \quad (7)$$

Pri čemu je: V_2 volumen suspenzije koncentracije 10^6 spora po mililitru; n ukupan broj spora u koncentriranoj suspenziji; V_1 volumen koncentrirane suspenzije; c koncentracija standardne suspenzije spora.

Razrjeđenjem koncentrirane suspenzije spora plijesni *P. expansum* dobiveno je ukupno 22,28 mL suspenzije spora koncentracije 10^6 spora po mL suspenzije miješanjem 4,5 mL koncentrirane suspenzije i 17,78 mL fiziološke otopine.

4.4. Priprema suspenzije spora plijesni *Fusarium graminearum*

Ispiranjem jedne epruvete, u kojoj je na kosi agar naciepljena *F. graminearum*, fiziološkom otopinom i stavljanjem komore ispod mikroskopa dobivena je Slika 4.6.



Slika 4.6.: Koncentracija spora plijesni *F. graminearum* ispod mikroskopa

Nakon brojanja spora, putem formule (8) dobiven je slijedeći rezultat ukupnog broja spora u mililitru koncentrirane suspenzije:

$$n = \frac{524}{4} * 10^4 = 131 * 10^4 = 1,31 * 10^6 \quad (8)$$

S obzirom da je koncentracija suspenzije veća od standardnih zahtjeva radilo se razrjeđenje prema formuli (9).

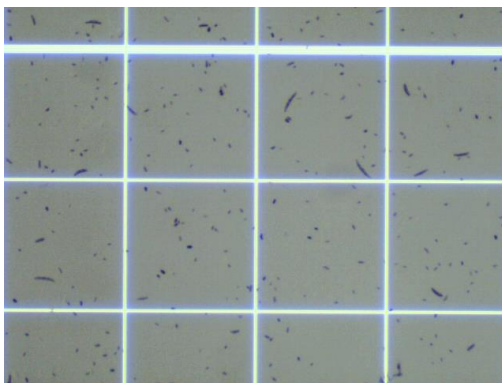
$$V_2 = \frac{n * V_1}{c} = \frac{1,31 * 10^6 * 4,2 \text{ mL}}{10^6} = 5,5 \text{ mL} \quad (9)$$

Pri čemu je: V_2 volumen suspenzije koncentracije 10^6 spora po mililitru; n ukupan broj spora u koncentriranoj suspenziji; V_1 volumen koncentrirane suspenzije; c koncentracija standardne suspenzije spora.

Razrjeđenjem koncentrirane suspenzije spora plijesni *F. graminearum* dobiveno je ukupno 5,5 mL suspenzije spora koncentracije 10^6 spora po mL suspenzije miješanjem 4,2 mL koncentrirane suspenzije i 1,3 mL fiziološke otopine.

4.5. Priprema suspenzije spora plijesni *Fusarium verticillioides*

Ispiranjem jedne epruvete, u kojoj je na kosi agar nacijepljena *F. verticillioides*, fiziološkom otopinom i stavljanjem komore ispod mikroskopa dobivena je Slika 4.7.

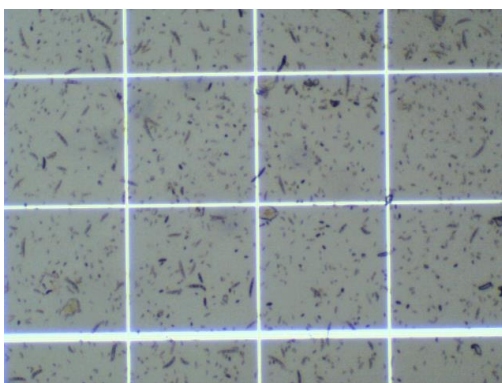


Slika 4.7.: Koncentracija spora plijesni *F. verticillioides* ispod mikroskopa

Nakon brojanja spora, putem formule (10) dobiven je slijedeći rezultat ukupnog broja spora u mililitru koncentrirane suspenzije:

$$n = \frac{198}{4} * 10^4 = 50 * 10^4 = 5 * 10^5 \quad (10)$$

S obzirom da je koncentracija suspenzije u ovome slučaju bila niža od standardnih zahtjeva radilo se koncentriranje suspenzije. Koncentriranje se radilo na način da se nakon ispiranja prve epruvete sa 5mL fiziološke otopine cijeli volumen pomoću pipete prebacio u drugu epruvetu, lagano se sastrugalo mikrobiološkom ušicom, te se ponovo cijeli volumen suspenzije pipetom prebacio u treću epruvetu te se ponovio postupak ispiranja. Nakon koncentriranja suspenzije dobivena je Slika 4.8.



Slika 4.8.: Koncentracija spora plijesni *F. verticillioides* ispod mikroskopa nakon koncentriranja

Nakon ponovnog brojanja spora, putem formule (11) dobiven je slijedeći rezultat ukupnog broja spora u mililitru koncentrirane suspenzije:

$$n = \frac{822}{4} * 10^4 = 205,5 * 10^4 = 2,06 * 10^6 \quad (11)$$

S obzirom da je nova koncentracija suspenzije veća od standardnih zahtjeva radilo se razrjeđenje prema formuli (12).

$$V_2 = \frac{n * V_1}{c} = \frac{2,06 * 10^6 * 2,6 \text{ mL}}{10^6} = 5,36 \text{ mL} \quad (12)$$

Pri čemu je: V_2 volumen suspenzije koncentracije 10^6 spora po mililitru; n ukupan broj spora u koncentriranoj suspenziji; V_1 volumen koncentrirane suspenzije; c koncentracija standardne suspenzije spora.

Razrjeđenjem koncentrirane suspenzije spora plijesni *F. verticillioides* dobiveno je ukupno 5,36 mL suspenzije spora koncentracije 10^6 spora po mL suspenzije miješanjem 2,6 mL koncentrirane suspenzije i 2,76 mL fiziološke otopine.

5. Zaključak

Plijesni su široko rasprostranjene svuda oko nas. Hrane se supstratima drugih živih bića, a na njihov rast mogu utjecati čimbenici poput temperature, kisika, pH i vlage. U prirodi obitavaju kao aktivno živa vegetativna tijela ili u obliku spora koje u povoljnim uvjetima stvaraju novu koloniju iste plijesni. Plijesni u pravilu proizvode velike količine spora koje su otporne na uvjete u kojima se vegetativne stanice plijesni uništavaju. Prema vrsti razmnožavanja, plijesni tvore spolne i nespodne spore. U radu je pokazano kako različite vrste plijesni pri jednakim uvjetima sporuliraju različite količine spora. Plijesni su iz tog razloga uzgajane na različitim podlogama. Priprema standardnih suspenzija spora odvijala se u nekoliko koraka: naciepljivanje i inkubacija plijesni, ispiranje spora fiziološkom otopinom, brojanje spora pod mikroskopom, te razrjeđenje suspenzija. Kod pripreme suspenzije spora plijesni *F. verticillioides* prije razrjeđenja bilo je potrebno napraviti koncentriranje kako bi se količina spora u suspenziji podigla iznad koncentracije od 10^6 spora po mililitru. Priprema standardnih suspenzija spora vrši se kao priprema za daljnja istraživanja vezana uz rast plijesni.

6. Literatura

- [1] S. Duraković, S. Redžepović: Uvod u opću mikrobiologiju, Kugler, Zagreb, 2002.
- [2] M. Blackwell: The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?, American Journal of Botany, 98(3):426-438, 2011.
- [3] B. Šarkanj, D. Kipčić, Đ. Vasić-Rački, F. Delaš, K. Galić, M. Katalenić, N. Dimitrov, T. Klapac: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu, Osijek, 2010.
- [4] S.A. Atanda, P.O. Pessu, S. Agoda, I.U. Isong, O.A. Adekalu, M.A. Echendu, T.C. Falade: Fungi and mycotoxins in stored foods. African Journal of Microbiology Research, 5(25):4373-4382, 2011.
- [5] S. Duraković: Opća mikrobiologija, Prehrambeno - tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
- [6] S. Uzunović – Kamberović: Medicinska mikrobiologija, Fojnica, Zenica, 2009.
- [7] <https://quizlet.com/581868816/lab-ex-27-survey-of-the-kingdom-fungi-flash-cards/> , dostupno 08.06.2024.
- [8] <https://basicmedicalkey.com/basic-mycology/> , dostupno 08.06.2024.
- [9] <https://www.slideshare.net/slideshow/fungal-spore-1/63214565> dostupno 10.06.2024.
- [10] M. A Klich: Aspergillus flavus: the major producer of aflatoxin. Molecular Plant Pathology. 8(6):713-722, 2007.
- [11] J.I. Pitt, A.D. Hocking: Fungi and food spoilage. Springer Science + Business Media, New York, 2009.
- [12] T. Kovač, B. Šarkanj, B. Crevar, M. Kovač, A. Lončarić, I. Strelec, C. N. Ezekiel, M. Sulyok, R. Krska: Aspergillus flavus NRRL 3251 Growth, Oxidative Status, and Aflatoxins Production Ability In Vitro under Different Illumination Regimes. Toxins 10, 528, 2018.
- [13] I. Varga, B. Solomun Kolanović, I. Varenina, Đ. Božić Luburić, N. Bilandžić: Kontaminacija mliječnih proizvoda aflatoksinom M1, Veterinarska stanica 51 (5), 547-556, 2020.
- [14] J. Pleadin, N. Kudumija, J. Frece, D. Petrović, K. Markov: Citrinin u hrani i hrani za životinje, Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition 11 (3-4), 2015., 84-90
- [15] O. Erkmén: Laboratory Practices in Microbiology, Academic Press, 2021.
- [16] C. I. P. de Villiers: A comparison of screening techniques for fusarium head blight of wheat in South Africa, Diplomski rad, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Bloemfontein, 2009.
- [17] D. A. Đukić, L. G. Mandić, A. B. Stanojković: Praktikum iz mikrobiologije, Budućnost, Novi Sad, 2010.
- [18] <https://neuron.mefst.hr/docs/katedre/imunologija/202021/Imunologija%20i%20cjepiva/VJEŽBA%201%20-%20Leukociti.pdf> , dostupno 14.06.2024.

Popis slika

Slika 1.1.: Put mikotoksina u hrani Izvor: B. Šarkanj, D. Kipčić, Đ. Vasić-Rački, F. Delaš, K. Galić, M. Katalenić, N. Dimitrov, T. Klapac: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu, Osijek, 2010.....	1
Slika 2.1.: Vegetativni i zračni micelij, Izvor: https://quizlet.com/581868816/lab-ex-27-survey-of-the-kingdom-fungi-flash-cards/	3
Slika 2.2.: Nespolne spore s lijeva na desno: blastospore, klamidospore, artrospore, sporangiospore, konidiospore, Izvor: https://basicmedicalkey.com/basic-mycology/	4
Slika 2.3.: Spolne spore s lijeva na desno: bazidiospore, zigospore, askospore, Izvor: https://www.slideshare.net/slideshow/fungal-spore-1/63214565	5
Slika 2.4.: <i>A. flavus</i> uzgojena na hranjivoj podlozi.....	6
Slika 2.5.: <i>A. ochraceus</i> uzgojena na hranjivoj podlozi.....	7
Slika 2.6.: <i>P. expansum</i> uzgojena na hranjivoj podlozi.....	8
Slika 2.7.: <i>F. graminearum</i> uzgojena na hranjivoj podlozi.....	9
Slika 2.8.: <i>F. verticillioides</i> uzgojena na hranjivoj podlozi.....	10
Slika 2.9.: Usporedba količina proizvedenih spora plijesni <i>F. graminearum</i> na MBA i PDA podlozi, Izvor: C. I. P. de Villiers: A comparison of screening techniques for fusarium head blight of wheat in South Africa, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Bloemfontein, 2009.	11
Slika 2.10.: Mreža kvadrata na metalnoj pločici hemocitometra Izvor: https://neuron.mefst.hr/docs/katedre/imunologija/202021/Imunologija%20i%20cjepiva/VJEŽBA%201%20-%20Leukociti.pdf	12
Slika 3.1.: Autoklav.....	14
Slika 3.2.: Kuhanje mung graha	15
Slika 3.3.: Ohlađeni kosi agar u epruvetama	15
Slika 3.4.: Narasle plijesni na kosom agaru.....	16
Slika 3.5.: Komora za brojanje spora Neubauer.....	17
Slika 3.6.: Suspenzija spora <i>F. graminearum</i> u mikroepuveti.....	17
Slika 4.1.: Koncentracija spora plijesni <i>A. flavus</i> ispod mikroskopa.....	18
Slika 4.2.: Koncentracija spora plijesni <i>A. flavus</i> ispod mikroskopa nakon razrjeđenja	18
Slika 4.3.: Zamrznuta suspenzija spora plijesni <i>A. flavus</i>	19
Slika 4.4.: Koncentracija spora plijesni <i>A. ochraceus</i> ispod mikroskopa nakon razrjeđenja	20
Slika 4.5.: Koncentracija spora plijesni <i>P. expansum</i> ispod mikroskopa.....	21
Slika 4.6.: Koncentracija spora plijesni <i>F. graminearum</i> ispod mikroskopa.....	22

Slika 4.7.: Koncentracija spora plijesni <i>F. verticillioides</i> ispod mikroskopa.....	23
Slika 4.8.: Koncentracija spora plijesni <i>F. verticillioides</i> ispod mikroskopa nakon koncentriranja.....	23

Patricia Balaić

Završni rad - Patricia Balaić.docx

📄 Provera radova za studente

🏫 Sveučilište Sjever

🌐 University North

Document Details

Submission ID

trnoid:1:2991331340

Submission Date

Aug 27, 2024, 11:41 AM GMT+2

Download Date

Aug 27, 2024, 11:46 AM GMT+2

File Name

Završni_rad_-_Patricia_Balaić.docx

File Size

42.2 MB

18 Pages

4,890 Words

32,301 Characters

6% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Filtered from the Report

► Bibliography

Top Sources

5% 🌐 Internet sources

0% 📄 Publications

2% 📄 Submitted works (Student Papers)