

Utjecaj zračenja na sterilizaciju hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici

Beti, Anamaria

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:656359>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU**

Anamaria Beti

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**UTJECAJ ZRAČENJA NA STERILIZACIJU HRANJIVE PODLOGE U
MIKROVALNOJ PEĆNICI**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Anamaria Beti

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**UTJECAJ ZRAČENJA NA STERILIZACIJU HRANJIVE PODLOGE U
MIKROVALNOJ PEĆNICI**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof.dr.sc., Tomislav Vinković, predsjednik
2. dr.sc., Monika Tkalec Kojić, mentor
3. izv.prof.dr.sc., Miro Stošić, član

Osijek, 2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	7
3. MATERIJALI I METODE.....	13
4. REZULTATI	19
4.2. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana	20
4.3. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana.....	21
4.4. Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana.....	21
4.5. Isparavanje hranjive podloge (mL) pri različitim utjecajima zračenja (180 W, 300 W, 450 W, 600 W)	22
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK.....	29
7. POPIS LITERATURE	30
8. SAŽETAK.....	32
9. SUMMARY.....	33
10. POPIS TABLICA	34
11. POPIS SLIKA.....	35
12. POPIS GRAFIKONA	36
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	37
BASIC DOCUMENTATION CARD.....	38

1. UVOD

Sterilizacija je postupak uništavanja svih mikroorganizama što uključuje i bakterijske spore. Najvažnije je da se osigura potpuna odsutnost živih organizama. Neki predmeti mogu se smatrati sterilnima ukoliko je vrijednost živih organizama koji se nalaze na tom predmetu manja od 1:1000000 (na 1 milijun sterilnih predmeta mikroorganizmi mogu biti prisutni samo na jednom predmetu). Svi predmeti koji se nalaze u blizini ili su na sterilnom predmetu također moraju biti sterilni, a instrumenti i pribor moraju biti suhi jer vlaga (koja isparava) može dovesti do rashlađivanja i samim time može doći do neuspješne sterilizacije (Buchrieser i Miorini, 2009.).

Postupci sterilizacije mogu se podijeliti na: fizikalne (vruća vodena para pod tlakom, suhi vrući zrak, ionizirajuće zračenje, žarenje i filtriranje) i fizikalno-kemijske (etilen-oksidi, formaldehid, peroksid plazma).

Sterilizacija može biti suha, vlažna i kemijska. Sterilizacija parom smatra se jednim od najpouzdanijih postupaka sterilizacije. Kod sterilizacije parom kao sterilizacijsko sredstvo koristi se vlažna toplina. Razaranjem staničnih proteina uništavaju se mikroorganizmi.

Način rada:

Na početku se u zatvorenom prostoru zagrijava voda koja vrije sve dok se prostor ne ispuni zasićenom vodenom parom (u tlačnom loncu postiže veću temperaturu te se tlačena para povećava). U drugom koraku dolazi do prijenosa topline na materijale koji se steriliziraju (ima visok toplinski učinak i kondenzira se na hladnije predmete) te dolazi do uništavanja mikroorganizama.

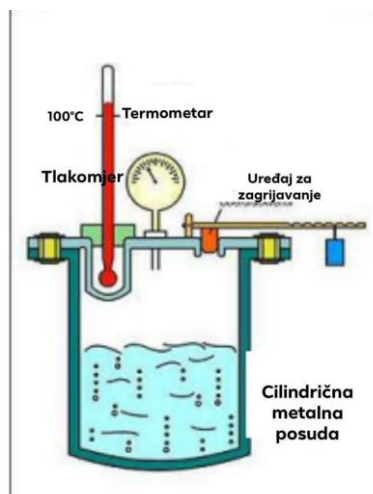
Može doći do stvaranja pregrijane pare što je manje učinkovito od zasićene pare jer se ne može, ili se samo djelomično može, kondenzirati. Za kondenzaciju se koristi voda koja se pojavljuje u tri agregatna stanja: krutom, tekućem i plinovitom.

Vodena para je plinovita voda koja se ne može vidjeti golim okom osim kada se pojavi u obliku sitnih kapljica (prilikom hlađenja). Tijekom sterilizacije vodenom parom potrebno je osigurati i provjeriti ima li zračnih džepova na ili u predmetu koji se sterilizira. Ako postoje zračni čepovi para neće moći doprijeti do mjesta koja se žele sterilizirati (Buchrieser i Miorini, 2009.).

Autoklav (lat. clavis – ključ) je uređaj za zagrijavanje tvari pod tlakom na temperaturi višoj od njihova vrelišta. Autoklav se koristi za sterilizaciju predmeta i materijala. Prvi lonac za sterilizaciju (autoklav) pod tlakom konstruirao je Denis Papin 1679. godine te se on još i naziva Papinov lonac (https://hr.wikipedia.org/wiki/Denis_Papin).

Papinov lonac (Slika 1.) sastoji se od:

1. Cilindrične metalne posude koja mora biti čvrsta i hermetički zatvorena
2. Tlakomjera
3. Termometra
4. Uređaja za zagrijavanje (Buchrieser i Miorini, 2009.).



Slika 1. Papinov lonac

Izvor: <https://wfhss.com>

Postupak rada uređaja za sterilizaciju (autoklava) odvija se u nekoliko faza:

1. Faza uklanjanja zraka – u ovoj fazi komora se prazni kako bi se uklonilo što više zraka iz sterilizatora i predmeta koji se steriliziraju. Ubacuje se vodena para (pulsni ili vakumski postupak). Ukoliko ostane zraka u sterilizatoru, sterilizacija nije pouzdana. Temperatura materijala koji se sterilizira mora biti niža od temperature u komori sterilizatora. Vrijeme uspostavljanja ravnoteže u ovoj fazi je naziv za vremenski period u kojem materijal koji se sterilizira postigne temperaturu koja vlada u komori.

2. Faza sterilizacije – u ovoj fazi sterilizacije dolazi do ugibanja mikroorganizama.
3. Faza sušenja – vrlo važan korak u postupku sterilizacije. U ovoj fazi sadržaj vlage ne smije prelaziti dozvoljene granice. Kako bi se sušenje izvelo što uspješnije komora se ponovno prazni dok se sterilizirani materijal (u isto vrijeme) hladi te dolazi do izjednačavanja tlaka komore sa vanjskim zrakom.

Postoje dva programa parne sterilizacije (autoklaviranja):

1. Kada je vrijeme sterilizacije 15 min, na temperaturi od 121 °C uz tlak od 1,2 bara
2. Kada je vrijeme sterilizacije 3 min, na temperaturi od 134 °C uz tlak od 2,5 bara

Većinom se vrijeme sterilizacije produžuje kako bi se osigurala sigurnost postupka (Buchrieser i Miorini, 2009.). Kako bi se osigurao besprijekoran rad uređaja za autoklaviranje (sterilizaciju) potrebno je održavanje i obavljanje provjera kao što su:

1. Vakumski test - obavlja se vakumskim pumpama (uklanjaju određenu količinu zraka) kako bi se provjerilo hoće li se postignuto smanjenje tlaka održati. Obavlja se jednom tjedno.
2. Bowie i Dick test - provjerava je li zrak u potpunosti otklonjen. Obavlja se na temperaturi od 134 °C kroz 3 min svaki dan.
3. Indikatori postupka (procesni indikatori) pokazuju je li neki predmet bio izložen sterilizaciji.
4. Kontrola punjenja u kojoj se koriste posebni indikatori koji daju podatke o prisutnosti pare u komori i materijalu.
5. Završetak sterilizacije predstavlja zapis koji sadrži podatke o vrijednosti sterilizacije. Obavlja se tek kada su svi gore navedeni testovi uspješno provedeni te su zadovoljeni određeni uvjeti. Tada se materijal može osloboditi iz uređaja za sterilizaciju (autoklava).

Na samom kraju postupka sterilizacije potrebno je obaviti provjeru valjanosti (validaciju) kako bi se dobio pisani dokaz o uspješnosti sterilizacijskog postupka. Tijekom sterilizacije može doći do pogrešaka te je vrlo bitno prije početka same sterilizacije imati kadar koji dobro poznaje teoriju sterilizacije i rad samog sterilizatora kako ne bi došlo do nepravilne pripreme ili prenatrpanosti sterilizatora. Također je vrlo bitno održavanje uređaja i pravilno rukovanje za vrijeme sterilizacije kao i poslije postupka same sterilizacije. Isto tako bitno

je da se poštuje vrijeme sterilizacije odnosno da ona ne traje prekratko, što bi značilo da se postupak sterilizacije odnosno autoklaviranja ne smije ubrzavati (Buchrieser i Miorini, 2009.).

Ostali postupci sterilizacije:

1. Sterilizacija suhim vrućim zrakom – potrebno je osigurati više temperature (produženo vrijeme održavanja).
2. Sterilizacija mikrobicidnim plinovima – potrebno je osigurati niže temperature (mikrobicidno djelovanje pojedinih plinova npr. etilen-oksidi, formaldehid i vodikov peroksid).
3. Sterilizacija etilen-oksidiom – postupak sterilizacije se odvija u nepropusnoj zabrtvljenoj komori. Etilen oksid smatra se vrlo djelotvornim, ali je otrovan te bi se sterilizirani predmeti trebali prozračivati dulje vremena.
4. Sterilizacija vodikovim peroksidom (“plazma sterilizacija”) – u postupku sterilizacije koristi se vodikov peroksid koji se dovodi do stanja plazme i kao takav se koristi kao sterilizacijsko sredstvo (sterilnat).
5. Sterilizacija ionizacijom.
6. Sterilizacija gama zrakama (Buchrieser i Miorini, 2009.).

Materijali koji su sterilizirani skladište se na sobnoj temperaturi na suhom mjestu u ormarima sa policama ili ormarima koji imaju dezinficirane ladice. Za vrijeme skladištenja potrebno je pridržavati se pravila “prvi unutra – prvi van”, što znači da se prvo upotrebljava materijal koji najdulje stoji (Buchrieser i Miorini, 2009.).

In vitro uzgoj

Mikrorazmnožavanje, kultura tkiva, *in vitro* uzgoj sve su to nazivi za suvremenu metodu vegetativnog razmnožavanja biljaka. Ovakav tip uzgoja predstavlja uzgoj biljaka na hranjivim podlogama koristeći dijelove biljke (stanicu, tkivo ili organ biljke) u potpuno sterilnim uvjetima. Ovaj način uzgoja temelji se na sposobnosti biljaka da se regeneriraju (Kumar i Reddy, 2011). U svim fazama *in vitro* uzgoja posuđe, materijal, instrumenti i supstrati, moraju biti sterilni kako nebi došlo do infekcije.

Prednosti *in vitro* uzgoja:

- a) biljke se mogu uzgajati tijekom cijele godine
- b) potpuna kontrola sorte
- c) dobiva se bezvirusni sadni materijal
- d) iz jedne biljke moguće je proizvesti veliki broj biljaka

Da bi se započeo proces mikropropagacije potrebno je imati matične biljke koje su bez virusa i kod kojih se može odvajati potrebn dio tkiva. Laboratorijski pribor mora biti u potpunosti sterilan što se postiže sterilizacijom pri visokim temperaturama. Biljni materijal potrebno je isprati pod mlazom vode te površinski sterilizirati. Nakon toga u laminaru vrši se odvajanje biljnih dijelova.

Laminar (cabinet) (Slika 2.) je zatvorena komora izrađena od nehrđajućeg čelika koja omogućuje rad u sterilnim uvjetima. Zrak se uvlači iz okoliša na vrhu komore te prolazi kroz HEPA filtere u radni prostor komore, a izlazi ispod prednjeg pomičnog stakla i na taj način stvara zračnu zavjesu koja sprječava ulaz kontaminiranog zraka iz okoliša.

Postoje horizontalni i vertikalni laminari. Biljke se nakon odvajanja postavljaju na hranjive podloge koje su uglavnom želatinozne mase na kojoj se biljka održava. Hranjiva podloga se kuha, a u njoj se nalaze svi potrebni mikro i marko elementi, vitamini i hormoni koji služe biljci za brži rast i razvoj. Kako bi se dobila želatinozna masa dodaje se agar te se hranjiva podloga kuha i nakon kuhanja se usklađuje pH vrijednost ovisno o kulturi koja će se uzgajati na podlozi.



Slika 2. Laminar

Izvor: <https://laftech.com.au>

Nakon 3-4 tjedna vrši se odvajanje mladih biljaka koje se stavljaju u nove posude, na nove hranjive podloge (subkultivacija) nakon čega se one dalje razvijaju. Osvjetljavaju se fito lampama od 2000 luksa u fotoperiodima od 16 sati kada je dan i 8 sati kada je noć. Nakon što biljke razviju čvrsti korijenov sustav postupno ih se prilagođava na vanjske uvjete. Smanjuje im se temperatura i povećava relativna vlažnost zraka. Svjetlost im se povećava postupno (<https://www.borovnica.com.rs>).

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih stupnjeva snage mikrovalne pećnice na sterilizaciju *in vitro* hranjive podloge. Isto tako tijekom ispitivanja sterilnosti bilježeno je ključanje hranjive podloge te na samom kraju mjerena je količina ishlapljene podloge nakon sterilizacije.

2. PREGLED LITERATURE

Mikropropagacija biljaka je integrirani proces u kojem stanice, tkiva i organe odabranih biljaka izdvajamo, steriliziramo i uzgajamo u aseptičnim uvjetima kako bi se proizvelo što više biljaka (Altman, 2000.).

Mikropropagacija je prema Kumar i Reddy (2011.) postala brzorastuća i bitna stavka za znanost te je bitna i za komercijalne svrhe. Postoje različite tehnike mikropropagacije kao što su:

- mikropropagacija putem meristema
- regeneracija i organogeneza
- somatska embriogeneza

In vitro uzgoj putem kulture tkiva je najbolji način kako eliminirati viruse i kako proizvesti veliki broj biljaka u kratkom vremenskom roku. Izraz „kultura tkiva“ označava tkivo bez lista ili tkivo sa 1-2 lista.

Prema Youssef i Amin (2001.) najveći problem u sterilizaciji hranjive podloge za *in vitro* uzgoj predstavljaju bakterije. U svom istraživanju hranjivu podlogu na kojoj su uzgajali bijelu topolu (*Populus alba L.*) sterilizirali su u mikrovalnoj pećnici na različitim stupnjevima snage i u različitom vremenskom razdoblju:

- 130 W – 5, 10, 15 min
- 260 W – 5, 10, 15 min
- 390 W – 5, 10, 15 min
- 520 W – 5, 10, 15 min

96-100% sterilizirane podloge nije sadržavalo neke od uobičajenih bakterija kao što su *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium* i *Bacillus coagulans*. Dok je medij steriliziran na 130 W na 5 min pokazao najmanji stupanj sterilizacije 36 %. Uzorci koji su bili izloženi stupnju snage od 260 W na 5 min imali su najveći broj preživjelih i razmnoženih izdanaka, dok su uzorci izloženi na 520 W tijekom 10 min imali najviše izdanke i najveći broj listova po pupoljku. Pošto su u istraživanju koristili i autoklav pokazalo se da se slični rezultati mogu dobiti i pri sterilizaciji u mikrovalnoj pećnici koja predstavlja i ekonomski isplativiju metodu sterilizacije.

Autoklaviranje je metoda sterilizacije predmeta i medija rasta za *invitro* uzgoj biljaka. Prema istraživanjima koje su obavili Tisserat i suradnici (1992.) mikrovalne pećnice, koje se inače koriste u kućanstvima, mogu se koristiti i za sterilizaciju predmeta uključujući plastično posuđe (Latimer, Matsen, 1977.), hranjive podloge (Nelson, 1990., Wood i Lundergan, 1981.) kao i za zubni alat (Rohrer i Bulard, 1985.).

Prema njihovom istraživanju na potrebno vrijeme obrade u mikrovalnoj pećnici utjecali su:

- intenzitet mikrovalne pećnice (70-700 W)
- volumen korištenog medija
- prisutnost ESWR (energy sink water reservoirs)

Stopa rasta jagode (*Fragaria vesca L.*), limuna (*Citrus limon L.*) ili mrkve (*Daucus carota L.*) bila je slična kod uzgoja u mediju steriliziranom u mikrovalnoj pećnici kao i kod autoklaviranog medija. Rezultat istraživanja pokazao je da autoklaviranje i steriliziranje u mikrovalnoj pećnici reduciraju giberlinsku kiselinu (GA3).

Mikrovalne pećnice su elektromagnetne pećnice koje imaju frekvenciju između 0,3-300 GHz. Mikroorganizmi koji žive u čovjeku, kao i sam čovjek, izloženi su zračenjima koje proizvode mikrovalne pećnice. Janković i suradnici (2014.) objavili su rad o utjecaju zračenja mikrovalne pećnice na rast i razvoj mikroorganizama. Proučavajući studije objavljene u biomedicinskim časopisima spoznali su da zračenja iz mikrovalne pećnice djeluju na mikroorganizme tako što ih ili ubijaju ili pospješuju njihov razvoj i rast. Mikrovalne pećnice koje imaju nisku energiju i frekvenciju pospješuju rast mikroorganizama dok one koje imaju visoku energiju i frekvenciju uništavaju mikroorganizme.

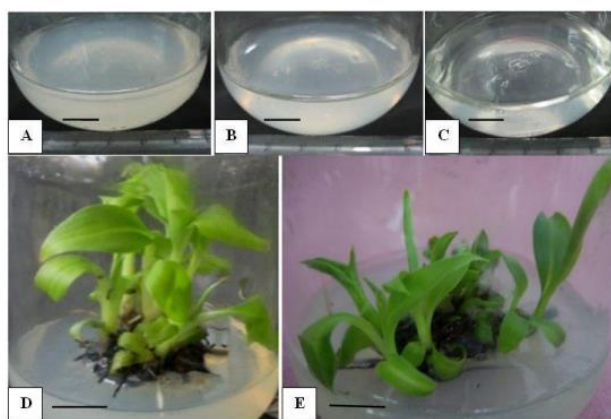
Kothari i sur. (2011.) su na Institutu znanosti u Indiji uspoređivali konvencionalnu sterilizaciju putem autoklava sa sterilizacijom u mikrovalnoj pećnici s obzirom na njihovu sposobnost da podrže rast mikroba, klijanje spora i oživljavanje liofiliziranih bakterijskih kultura. Rast mikroba, prema istraživanju, bio je bolji kod sterilizacije mikrovalnom pećnicom. Čak su i bakterije i kvasci uspjeli postići veću gustoću stanica i brži rast u mediju steriliziranom u mikrovalnoj pećnici. Također su došli do zaključka da je kod hranjivih podloga steriliziranih u mikrovalnoj pećnici bolje zadržavanje hranjivih tvari te zbog kraće izloženosti toplini bolji i rast mikroba. Sterilizacija mikrovalnom pećnicom

pokazala je bolje rezultate nego konvencionalno autoklaviranje posebno kada su mediji potrebni za neposrednu upotrebu i kada je poželjan visok prinos biomase.

Sanborn i suradnici (1982.) su utvrdili da mikrovalne pećnice, koje se inače koriste u kućanstvima, mogu biti učinkovite u sterilizaciji plastičnih posuda u kojima se uzgajaju tkiva te da se sam proces sterilizacije može obaviti brzo i jeftino. U istraživanju su koristili devet bakterijskih kultura (četiri gram negativne i pet gram pozitivne) i dvije vrste *Bacillus* bakterije (*Bacillus alvei* i *Bacillus globigii*) za kontaminaciju posuda za kulturu tkiva. U istraživanju je korištena mikrovalna pećnica Kenmore (model 99601) snage 2,45 GHz koja je uspjela dekontaminirati posude u vremenu od 3 minute. Isto toliko vremena je bilo potrebno za dekontaminaciju tri test virusa: Polio tip 1, parainfluenza tip 1 (Sendai) i bakteriofag T4.

Latimer i Matsen (1977.) ispitali su mogućnost dekontaminacije bakterija u kliničkom mikrobiološkom laboratoriju pomoću mikrovalne pećnice. Izložili su deset patogena mikrovalnom zračenju te je potpuna sterilizacija postignuta u roku od 60 sekundi. Sterilnost testnih traka *Bacillus stearothermophilus* postignuta je nakon 5 minuta izloženosti zračenju mikrovalne pećnici. Kod svih kontrolnih traka uočen je rast patogena. Prema podacima dobivenim u eksperimentima zaključuju da je upotreba mikrovalne pećnice za bakterijsku dekontaminaciju u kliničkoj mikrobiologiji u potpunosti izvediva, štedi vrijeme, praktična je, ali se ne preporučuje za pripremu novih medija i sterilizaciju suhe laboratorijske opreme.

Uzgoj banane u kulturi tkiva omogućava proizvodnju velikog broja biljaka u kratkom vremenu bez obzira na godišnje doba i vremenske prilike. Alternativni način sterilizacije hranjive podloge za razmnožavanje banane opisali su u svom istraživanju Vora i Jasrai (2012.). Usporedili su standardnu sterilizaciju autoklavom (obavljena na 121 °C u trajanju od 20 min) sa sterilizacijom u mikrovalnoj pećnici (obavljena pri različitim stupnjevima snage 180-900 W u trajanju od 10 sekundi do 5 minuta). Sterilizacija u mikrovalnoj pećnici pokazala se najuspješnija pri intenzitetu zračenja od 900 W u trajanju od 4 minute te je sterilizacija u mikrovalnoj pećnici pokazala bolju prozirnost hranjive podloge u usporedbi s onim u autoklavu (Slika 3.).



Slika 3. Sterilizacija hranjive podloge putem autoklava i mikrovalne pećnice

Izvor: <https://pdfs.semanticscholar.org>

- A. Hranjiva podloga Agar-agar sterilizirana u autoklavu
- B. Hranjiva podloga Agar-agar sterilizirana u mikrovalnoj pećnici (bolja prozirnost podloge)
- C. Hranjiva podloga sa Gelritom sterilizirana u autoklavu (za usporedbu prozirnosti podloge)
- D. Razmnožavanje *in vitro* u hranjivoj podlozi steriliziranoj u mikrovalnoj pećnici
- E. Razmnožavanje *in vitro* u hranjivoj podlozi steriliziranoj u autoklavu.

Krumpir (*Solanum tuberosum* L.) važna je povrtna kultura koja se uzgaja diljem svijeta. U nekim zemljama mikropropagacija krumpira koristi se kako bi se postigla bolja kvaliteta i kako bi se proizvele biljke bez virusa. No, proizvodnja putem kulture tkiva je skupa u odnosu na proizvodnju u tlu i isplativa je jedino ako se radi o velikom volumenu proizvodnje. Weber i suradnici (2014.) pokušali su sterilizacijom hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici smanjiti troškove proizvodnje. MS hranjivu podlogu koja je sadržavala dodatak NaOCl-a (50 ppm aktivnog klor) sterilizirali su u mikrovalnoj pećnici koristeći 100 % - tnu snagu mikrovalne pećnice u trajanju od 5 minuta. U ovom slučaju su umjesto tradicionalnog posuđa koristili prozirne spremnike koji su pokazali uspješnu sterilizaciju dodatkom NaOCl-a. Kasnije su biljke premještene u kontrolirano okruženje u kojem je rast mikroorganizama bio manji (5 %) u odnosu na biljke u nekontroliranim uvjetima (26-36 %).

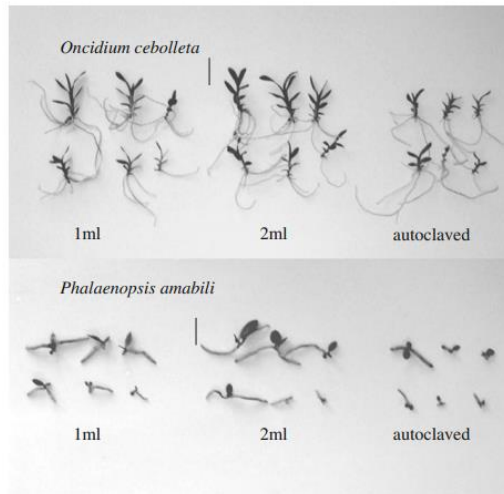
Bakterije *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* u hranjivim podlogama rastu sporo čak i u nutritivno bogatim podlogama i gube viabilnost nakon 19 sati rasta.

Jedan od razloga sporog rasta i slabe viabilnosti, objašnjavaju u svom istraživanju Bhattacharjee i suradnici (2009.) navode kako sterilizacija hranjive podloge pomoću mikrovalne pećnice ublažava inhibiciju *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* uzrokovanu produktima Maillardove reakcije. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* je uzročnik lokaliziranog agresivnog periodontitisa i endokarditisa. Bakterije rastu polako čak i u bogatom mediju te brzo gube viabilnost otprilike nakon 19 sati rasta. Jedan od razloga sporog rasta i smanjenja viabilnosti je konvencionalna metoda izrade hranjive podloge pomoću autoklava. Brži rast i veća viabilnost primijećeni su u bujon hranjivim podlogama i agar pločama steriliziranim mikrovalnim zračenjem, a ne autoklaviranjem. Jedna razlika između autoklaviranog i medija steriliziranog u mikrovalnoj pećnici je u tome što su autoklavirani mediji tamnije smeđe boje, za koje se zna da nastaju uslijed Maillardovih reakcija, poznatih i kao Amadorijevi produkti. Pokazalo se da su produkti Maillardovih reakcija nastali autoklaviranjem mješavine lizina i glukoze, inhibirali rast *A. actinomycetemcomitans*.

Venturieri i suradnici (2012.) u svom istraživanju koristili su dvije alternativne hranjive podloge (od kojih je jedna bila sterilizirana u mikrovalnoj pećnici, a druga u autoklavu) te pratili:

- trajanje vrenja
- učinak i djelovanje antiseptika primijenjenih na staklenke i podloge
- koncentraciju antiseptičkog vodikovog peroksida
- rast *Oncidium cebolleta* i *Phalaenopsis amabilis*

Utvdili su da je upotreba 30%-tnog vodikovog peroksida (Peridrol® otopina), uz vrenje u trajanju od 8 minuta i 8 g/L agara dovoljno kako bi se poboljšalo klijanje, kako bi hranjive podloge bile čvrste i kako se sjeme ne bi kontaminiralo. Biljke uzgojene na hranjivoj podlozi sterilizirane u mikrovalnoj pećnici pokazale su vrhunski rast u odnosu na biljke uzgojene na hranjivoj podlozi steriliziranoj u autoklavu (Slika 4.).



Slika 4. Rast *Oncidium cebolleta* i *Phalaenopsis amabili* u medijima pripremljenim u mikrovalnoj pećnici sa 1 ili 2 mL Peridol® i u usporedbi sa medijem steriliziranim u autoklavu

Izvor: <https://sci-hub.tw>

Keller i suradnici (1988.) istraživali su mogućnost sterilizacije fitoplanktonskih medija i pribora pomoću standardne mikrovalne pećnice. Uništavanje bakterija, mikroalgi i gljivica u 1,5 L teflonskim posudama morske vode postignuto je za manje od 10 minuta pri snazi od 700 W. Prazne epruvete i posude sterilizirane su za 5 minuta. Prema rezultatima dobivenim u istraživanju utvrđeno je da je za uništenje gljivica potrebno 10 minuta, za bakterije 8 minuta i za mikroalge 5 minuta sterilizacije.

3. MATERIJALI I METODE

U Laboratoriju za povrćarstvo, cvjećarstvo, ljekovito, začinsko i aromatično bilje na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku obavljeno je istraživanje na temu: Utjecaj intenziteta zračenja na sterilnost hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici. Istraživanje je obavljeno u potpuno sterilnim i kontroliranim uvjetima.

Od laboratorijske opreme korišteno je:

1. Oprema za pripremu hranjive podloge koja se sastoji od:

- električnog kuhala
- posuđa (rostfrei)
- plastične kuhače
- destilirane vode
- precizne vage (0,01g)
- špatule za vaganje
- pH metra
- kemikalija
- Erlenmeyerove tikvice
- staklene menzure i čaša
- vatiranih čepova
- pipeta

2. Hladnjak, mikrovalna pećnica (Samsung Electronics, model MG23F301TAK), četke za pranje koje su bile različite veličine, kolica koja su korištena za lakšu manipulaciju i deterdžente za posuđe koje se pere nakon svakog korištenja kako bi se održavala čistoća laboratorija i pribora u njemu. Sve navedeno korišteno je kao opća oprema u pripremi hranjive podloge.

3. Hranjiva podloga čuvana je u klima komori. Klima komora opremljena je svim potrebnim elementima za lakšu manipulaciju i čuvanje podloge, a može se koristiti i za čuvanje kultura koje se uzgajaju *in vitro*. Unutar klima komore nalazi se (u ovom slučaju klima komora na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Laboratorij za povrćarstvo, cvjećarstvo, ljekovito, začinsko i aromatično bilje):

- izvor struje i izvor vode

- klima uređaj
- timer
- fluorescentne cijevi
- sudoper
- stol za opažanje

Kuhanje hranjive podloge

Za kuhanje hranjive podloge, prema recepturi Murashige i Skoog (1962.), korišteno je:

1. Agar 6,4 g
2. Inositol 0,1 g
3. Šećer 30 g
4. MS makro 100 mL (Tablica 1.)

Tablica 1. Udio makroelemenata u hranjivoj podlozi (100 mL za 1 L hranjive podloge)

Izvor: Izrada autora

Makroelementi	g/L otopine
NH_4NO_3	16,5
KNO_3	19
$\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$	17
$\text{CaCO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	4,4
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	3,7

5. MS mikro 1 mL (Tablica 2.),

Tablica 2. Udio mikroelemenata u hranjivoj podlozi (100 mL za 1 L podloge)

Izvor: Izrada autora

Mikroelementi	g/L
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	2,2
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,86
H_3BO_3	0,6200
KI	0,0830

$\text{NaMeCl}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,0250
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025
$\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,0025

6. Vitamini 1 mL (Tablica 3.)

Tablica 3. Udio vitamina u hranjivoj podlozi (na 100 mL vode)

Izvor: Izrada autora

Vitamini	g/100 mL H ₂ O
B ₁ Tiamin (Slika 4.)	0,0100
B ₆ Piridoksin	0,0500
Nikotinska kiselina	0,0500
Glicin	0,2200

7. Željezo Fe 5 mL (Tablica 4.)

Tablica 4. Udio željeza Fe u hranjivoj podlozi (na 100 mL vode)

Izvor: Izrada autora

Fe	g/100mL H ₂ O
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,744
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,557

8. Hormoni

- ✓ indol-3-maslačna kiselina (IBA) iz grupe auksina, priprema se otapanjem u NaOH
- ✓ 6-benzil aminopurin (BAP) iz grupe citokinina, priprema se otapanjem u HCl



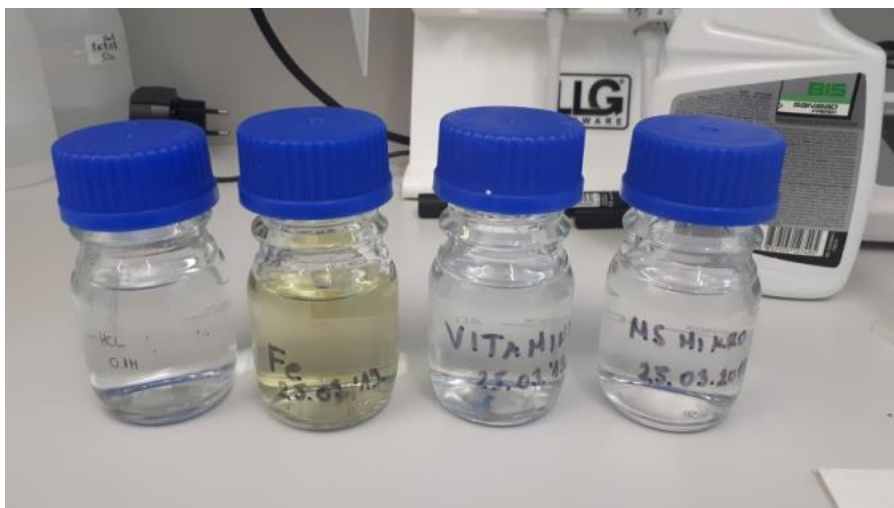
Slika 5. Odvaga Vitamina B1 Tiamin

Izvor: Fotografija autora

Postupak pripreme:

Destilirana voda sipa se u lonac te se stavlja na kuhalo. Agar se dodaje nakon što se voda zagrije te se miješa dok voda ne prokuha. Kada voda prokuha dodaje se saharoza. Prethodno pripremljeni mikro i makro elementi, vitamini i željezo (Slika 6.) dodaju se pipetom. Nakon toga se hranjiva podloga prelije u menzuru, nadopunjava do litre te vraća ponovno u lonac gdje se podešava pH vrijednost na 5,8 pomoću HCL-a ili NaOH. U pripremljenu podlogu dodaju se hormoni IBA 1 mL i BAP 0,5 mg/L.

Hranjiva podloga se zatim prelijeva u Erlenmeyerove tikvice po 50 mL koje se zatvaraju vatiranim čepovima (Slika 7.).



Slika 6. Otopine mikro elementa, vitamina, željeza i HCl-a

Izvor: Fotografija autora



Slika 7. Erlenmayerove tikvice sa hranjivom podlogom zatvorene vatiranim čepovima u klima komori

Izvor: Fotografija autora

U prvom ispitivanju odnosno sterilizaciji korišteno je 23 tikvice koje su sadržavale 50 mL hranjive podloge. U svakom tretmanu korišteno je 5 tikvica osim u posljednjem koji je sadržavao 3 Erlenmayerove tikvice. Tretmani su trajali po 5 minuta uz različite intenzitete snage mikrovalne pećnice od 600 W, 450 W, 300 W, 180 W i posljednji koji je sadržavao 3 Erlenmayerove tikvice na 100 W. Praćeno je na kojem stupnju snage je došlo do

ključanja hranjive podloge i bilježeno je koliko je to utjecalo na gubitak ukupnog volumena hranjive podloge u Erlenmayerovoj tikvici.

Pokus je postavljen 31. travnja 2019. godine u Laboratoriju za povrćarstvo, cvjećarstvo, ljekovito, začinsko i aromatično bilje na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku.

Drugo ispitivanje obavljeno je 14. svibnja 2019. godine. Korišteno je 20 Erlenmayerovih tikvica podijeljenih u 4 tretmana sa po 5 tikvica.

U drugom ispitivanju korištena je destilirana hladna voda (400 mL) koja se nalazila u staklenoj laboratorijskoj čaši volumena 500 mL. Tretmani su trajali 5 min uz različite intenzitete snage mikrovalne pećnice od 600 W, 450 W, 300 W i 180 W. U ovom ispitivanju također je bilježeno ključanje hranjive podloge i gubitak volumena unutar Erlenmayerovih tikvica.

Nakon sterilizacije u mikrovalnoj pećnici tretmani su premješteni u klima komoru (Slika 7.). Nakon 7 i 14 dana bilježene su promijene i sterilnost hranjive podloge.

4. REZULTATI

Podaci svih ispitivanih tretmana statistički su obrađeni analizom varijance (ANOVA) u programu SAS 9.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC). Za usporedbu srednjih vrijednosti izračunate su najmanje značajne razlike LSD (engl. *Least Significant Differences*) na razini $p < 0,05$ u skladu s Fisherovim testom.

4.1. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana

Dana 31. travnja 2019. godine postavljen je pokus u svrhu istraživanja utjecaja intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici. Istraživanje je obavljeno u mikrovalnoj pećnici Samsung (model MG23F301TAK, Samsung Electronics).

U prvom istraživanju korišteno je 23 Erlenmayerove tikvice te je svaka sadržavala 50 mL hranjive otopine. Istraživanje je trajalo 5 min i obavljeno je na intenzitetu zračenja od 100 W, 180 W, 300 W, 450 W i 600 W. Svaki od tretmana sadržavao je 5 tikvica osim posljednjeg koji je sadržavao 3 tikvice.

Do ključanja podloge došlo je pri intenzitetu zračenja od 600 W, 450 W i 300 W dok na intenzitetu zračenja od 180 W i 100 W nije zabilježeno ključanje hranjive podloge. Nakon obavljenih tretmana Erlenmayerove tikvice prebačene su klima komoru i nakon 7 dana provjeravana je sterilnost hranjive podloge.

Podloge su pokazale dobru sterilnost. Nakon 7 dana podloge sterilizirane na intenzitetima zračenja od 600 W i 450 W nisu pokazale zagađenost hranjive podloge (sterilnost 100 %) dok su tretmani pri intenzitetu zračenja od 300 W bili 60 % sterilni što znači da je tri od pet tretmana bilo sterilno. Tretmani sterilizirani pri nižem intenzitetu zračenja od 180 W i 100 W pokazali su najveći postotak zagađenosti odnosno postotak sterilnosti iznosio je 0 %. Statistički obrađeni podaci prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana

Izvor: Izrada autora

Tretmani		Erlenmeyer tikvica (%)	
Intenzitet zračenja(W)		Ključanje	Sterilnost
100	5 min, bez čaše	0 ^a	0 ^b
180		0 ^b	0 ^a
300		100 ^b	60 ^a
450		100 ^b	100 ^a
600		100 ^b	100 ^a

4.2. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana

Sterilnost se provjerava i 14 dana nakon obavljenog tretmana kada su (Tablica 6.) zabilježeni postotak sterilnosti i ključanja hranjive podloge. Svaki od tretmana pokazao je zagađenost hranjive podloge osim tretmana na 600 W koji je pokazao sterilnost od 100 %. Tretmani pri intenzitetu zračenja od 100 W i 180 W imali su postotak sterilnosti 0 % pošto je svaka hranjiva podloga unutar tretmana bila zagađena. Tretman na 300 W imao je postotak sterilnosti 20 % (četiri od pet tikvica bilo je zagađeno), a tretman na 450 W imao je postotak sterilnosti 80 % (jedna od pet tikvica bila je zagađena).

Tablica 6. Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana

Izvor: Izrada autora

Tretmani		Erlenmeyer tikvica (%)	
Intenzitet zračenja(W)		Ključanje	Sterilnost
100	5 min , bez čaše	0 ^a	0 ^b
180		0 ^b	0 ^a
300		100 ^b	20 ^a
450		100 ^b	80 ^a
600		100 ^b	100 ^a

4.3. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana

U drugom istraživanju obavljenom 14. svibnja 2019. godine korišteno je 20 Erlenmayerovih tikvica raspoređenih u 4 tretmana. Svaki od tretmana trajao je 5 min sa različitim intenzitetom zračenja od 180 W, 300 W, 450 W i 600 W. Osim tikvica korištena je i staklena laboratorijska čaša sa 400mL destilirane hladne vode. Bilježeni sui statistički obrađeni podaci ključanja hranjive podloge. Ključanje se jedino nije dogodilo pri temperaturi od 180 W.

Nakon 7 dana bilježena je sterilnost hranjive podloge (Tablica 7.). Sterilnost od 100 % utvrđena je na tretmanu intenziteta zračenja od 600 W. Tretmani pri 180W i 450 W pokazali su postotak sterilnosti 40 % što znači da su dvije od pet tikvice unutar tretmana ostale sterilne. Pri intenzitetu zračenja od 300 W četiri od pet tikvica pokazale su sterilnost što daje postotak sterilnosti od 80 %.

Tablica 7. Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana

Izvor: Izrada autora

Tretmani		Erlenmeyer tikvica (%)	
Intenzitet zračenja (W)		Ključanje	Sterilnost
180	5 min, s čašom	0 ^b	40 ^a
300		100 ^b	80 ^a
450		100 ^b	40 ^a
600		100 ^b	100 ^a

4.4. Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana

Sterilnost hranjive podloge provjeravana je i nakon 14 dana, podaci prikazani u Tablici 8. Hranjiva podloga u tikvicama iz tretmana od 600 W pokazuje postotak sterilnosti od 100 %. Tretman na 450 W imao je rezultat isti kao i tretman nakon sedam dana (40 % sterilno). Tretman na 300 W imao je sterilnost od 60 % što znači da je tri od pet tikvica bilo zagađeno. Najmanju sterilnost imao je tretman pri 180 W u kojem je svaka tikvica unutar tretmana bila zagađena (sterilnost 0 %).

Tablica 8. Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana

Izvor: Izrada autora

Tretmani		Erlenmeyer tikvica (%)	
Intenzitet zračenja (W)		Ključanje	Sterilnost
180	5 min, s čašom	0 ^b	0 ^b
300		100 ^b	60 ^b
450		100 ^b	40 ^a
600		100 ^b	100 ^a

4.5. Isparavanje hranjive podloge (mL) pri različitim utjecajima zračenja (180 W, 300 W, 450 W, 600 W)

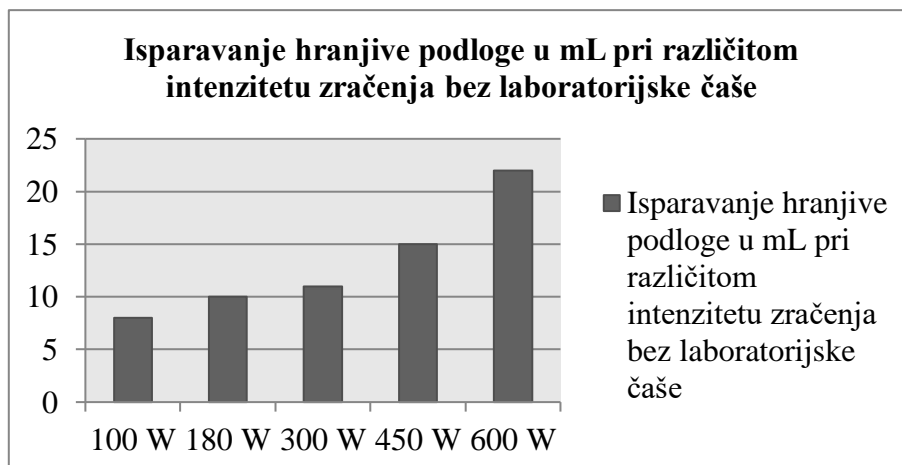
Nakon provedbe postupka sterilizacije u mikrovalnoj pećnici uz laboratorijsku čašu s hladnom destiliranom vodom zabilježen je manji gubitak hranjive podloge u odnosu na sterilizaciju bez čaše s vodom (Slika 8.).



Slika 8. Isparavanje hranjive podloge nakon sterilizacije (s laboratorijskom čašom)

Izvor: Fotografija autora

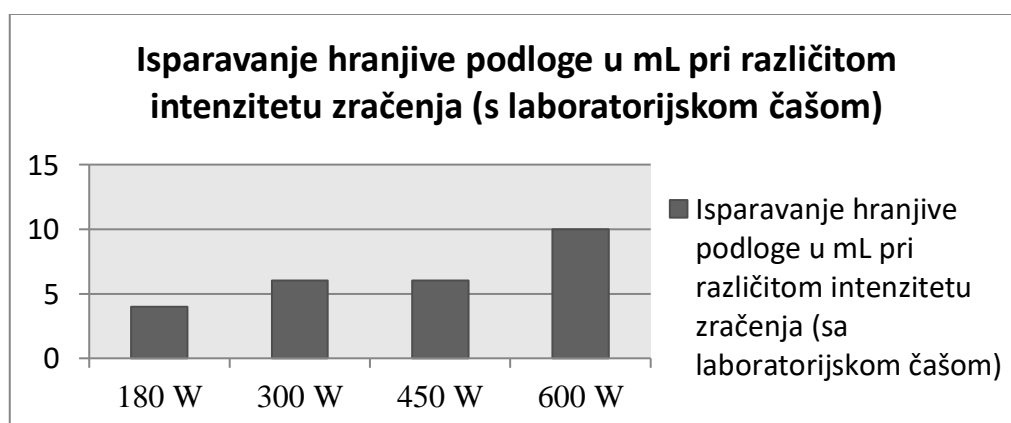
Gubitci su prikazani grafovima 1. i 2. i objašnjeni u daljnjem tekstu.



Grafikon 1. Isparavanje hranjive podloge u mL pri različitom intenzitetu zračenja bez prisustva laboratorijske čaše, Izvor: Izrada autora

U Grafikonu 1. vidljivo je da je najveće isparavanje hranjive podloge bilo pri intenzitetu zračenja od 600 W, dok je najmanji gubitak hranjive podloge bio na najnižem intenzitetu zračenja od 100 W.

U tretmanu u kojem je bila prisutna laboratorijska staklena čaša s 400 mL hladne destilirane vode vidljivo je manje isparavanje hranjive podloge u odnosu na istraživanje koje je obavljeno bez laboratorijske čaše. Najveći stupanj isparavanja je bio opet pri najvećoj temperaturi od 600 W, dok je najmanje zabilježeno kod 180 W.



Grafikon 2. Isparavanje hranjive podloge u mL pri različitom intenzitetu zračenja (s laboratorijskom čašom), Izvor: Izrada autora

Razlike u isparavanju hranjive podloge s čašom i bez čaše prikazane su u Tablici 9. Najveća razlika zabilježena je kod najvećeg intenziteta zračenja odnosno kod 600 W, čak

12 mL, a najmanju razliku od 6 mL, u gubitku hranjive podloge isparavanjem, imala je podloga s intenzitetom zračenja od 180 W.

Tablica 9. Razlike u isparavanju sa i bez upotrebe laboratorijske čaše

Izvor: Izrada autora

Intenzitet zračenja	180 W	300 W	450 W	600 W
S laboratorijskom čašom	4 mL	6 mL	6 mL	10 mL
Bez laboratorijske čaše	10 mL	11 mL	15 mL	22 mL
Razlika	6 mL	5 mL	9 mL	12 mL

5. RASPRAVA

U *in vitro* uzgoju tijekom pripremanja hranjive podloge koristi se sterilno posuđe i samim time hranjiva podloga podvrgnuta je postupku sterilizacije prije nego što se spremi u klima komoru. Sterilizacija se najčešće obavlja pomoću autoklava no sam postupak autoklaviranja je skup i traje dosta dugo. U novije vrijeme za sterilizaciju koriste se mikrovalne pećnice koje su jeftinije, lakše se nabavljaju i imaju brži postupak sterilizacije od autoklava. Usporedbom sterilizacije autoklavom i sterilizacije pomoću mikrovalne pećnice, u istraživanju Kothari i suradnici (2001.), saznajemo da je bolji mikrobni rast u mediju steriliziranom u mikrovalnoj pećnici povezan sa kraćim utjecajem veće temperature i boljem zadržavanju hranjivih elemenata.

Prema Tisserat i suradnicima (1992.) hranjivu podlogu moguće je sterilizirati koristeći mikrovalnu pećnicu koja se koristi u kućanstvu. Hranjiva podloga će postići sterilnost na temperaturi od 700 W u vremenu od 10 minuta sa ili bez, u ovom slučaju, laboratorijske čaše s destiliranom vodom.

U ovom istraživanju korištena je mikrovalna pećnica Samsung (model MG23F301TAK, Samsung Electronics) i ispitivani su utjecaj zračenja na sterilnost i ključanje hranjive podloge.

Ispitivanje se vršilo na dva načina, ključanje i sterilnost hranjive podloge sa i bez laboratorijske čaše napunjene vodom koja je služila za apsorpciju viška energije.

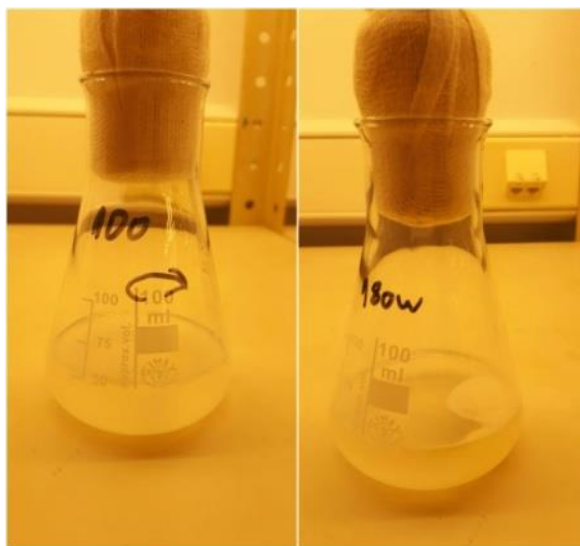
Kod prvog istraživanja u 23 Erlenmayerove tikvice dodano je 50 mL hranjive podloge te se ispitivalo ključanje i sterilizacija u trajanju od 5 min kod različitih intenziteta zračenja od 600 W, 450 W, 300 W, 180 W i 100 W. Nakon 7 i 14 dana zabilježene su promjene u sterilnosti i isparavanju hranjive podloge.

Nakon 7 dana postotak sterilnosti hranjive podloge bitno se razlikovao. Najmanju sterilnost odnosno sterilnost od 0 % imali su tretmani na 100 W i 180 W što ukazuje na to da je svaka od tikvica unutar tretmana imala zagađenu hranjivu podlogu (Slika 9.). Isto tako nije došlo do ključanja podloge. U istraživanju Tisserat i suradnika (1992.) sterilni uvjeti mogu se postići kad je intenzitet zračenja u mikrovalnoj pećnici 700 W i ako tretman traje 10 minuta sa ili bez upotrebe laboratorijske čaše s destiliranom vodom. Što dokazuje da je u ovom slučaju intenzitet zračenja bio prenizak i nije došlo do ključanja hranjive podloge što je dovelo do njezine brže zagađenosti u odnosu na tikvice koje su bile podvrgnute većem

intenzitetu zračenja. Nadalje, kod ostalih intenziteta zračenja sterilnost je bila dobra 60 % pri 300 W i odlična 100 % pri 450 i 600 W. U ova tri slučaja došlo je do ključanja hranjive podloge i samim time bila je veća mogućnost da će im sterilnost biti bolja.

Nakon 14 dana sterilnost hranjive podloge znatno se smanjila kod intenziteta zračenja od 300 W i iznosila je 20 %. Kod intenziteta zračenja od 450W sterilnost se smanjila za 20 % i iznosila je 80 % što znači da je jedna od tikvica unutar tretmana pokazala zagađenost. Sve tikvice ostale su sterilne pri intenzitetu zračenja od 600 W što dokazuje da je potreban veći intenzitet zračenja i bolje ključanje same podloge kako bi podloga ostala sterilna.

Isparavanje hranjive podloge, u slučaju u kojem nije korištena staklena laboratorijska čaša, pokazalo se veće u odnosu na ono istraživanje u kojem je čaša s vodom bila prisutna. Najveći gubitak hranjive podloge imale su tikvice koje su imale intenzitet zračenja od 600 W čak 22 mL, dok je najmanji bio pri intenzitetu od 100 W i iznosio je 10 mL. Pošto pri intenzitetu zračenja od 100 W nije došlo do ključanja hranjive podloge nije postignuta ni potpuna sterilnost. Taj tretman nije ponovljen kod drugog istraživanja, odnosno sterilizacije hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici s dodatkom staklene laboratorijske čaše za apsorciju viška energije.



Slika 9. Zagađenost hranjive podloge na temperaturama 100 W i 180 W

Izvor: Fotografija autora

U drugom istraživanju korišteno je 20 Erlenmayerovih tikvica raspoređenih u četiri tretmana sa po pet tikvica. Svaka tikvica bila je napunjena sa 50 mL hranjive podloge.

Tretmani su podvrgnuti intenzitetu zračenja od 180 W, 300 W, 400 W i 600 W u trajanju od po 5 minuta. Osim tikvica, u ovom tretmanu, korištena je staklena laboratorijska čaša sa 400 mL destilirane vode koja je postavljena po sredini a oko nje raspoređeno po 5 tikvica. Ovo istraživanje pokazalo je manje isparavanje hranjive podloge u odnosu na tretmane u kojima nije bila prisutna staklena laboratorijska čaša s vodom.

Nakon 7 dana najveću sterilnost je pokazao tretman kod intenziteta zračenja od 600 W (100 %). Pri intenzitetima zračenja od 180 W i 450 W sterilnost je iznosila 40 %. Kod intenziteta zračenja od 300 W sterilnost je iznosila 80 %. Iz rezultata je vidljivo da je svaki od tretmana imao barem jednu ili više zagađenih hranjivih podloga što kao mogući uzrok može biti upotreba laboratorijske čaše s vodom koja je smanjila ključanje same podloge, a koje je potrebno kako bi sterilnost bila veća. Pošto je ključanje bilo manje, više hranjive podloge je ostalo u samoj tikvici te to može biti jedan od razloga lošijeg rezultata sterilnosti u odnosu na tretmane u kojima nije bila prisutna čaša s vodom. Prema Tisserat i suradnicima (1992.) ukoliko se sterilizira veći volumen hranjive podloge, potrebno je povećati vrijeme trajanja same sterilizacije. Kao primjer navode da je za 100 mL hranjive otopine bilo potrebno 5min dok je za 3000 mL potrebno 50 min.

Nakon 14 dana sve tikvice unutar tretmana, pri najnižem intenzitetu od 180 W, bile su zagađene i pokazale sterilnost od 0 % (Slika 10.). Kod tretmana na 300 W sterilnost se smanjila za 20 % te iznosila 60 %. Kod tretmana sa 450 W i 600 W sterilnost je ostala ista.



Slika 10. Zagađenost hranjive podloge kod tretmana na temperaturi od 180 W

Izvor: Fotografija autora

6. ZAKLJUČAK

Od davnina ljudi kao jedini izvor i primarni izvor rasta biljaka koriste tlo. U novije vrijeme, napretkom tehnologije i biotehničkih znanosti, koriste se nove metode uzgoja biljaka. Jedna od tih metoda je *in vitro* uzgoj biljaka poznat po raznim nazivima kao što su mikropropagacija, kultura tkiva itd. Najveća prednost ovakvog načina uzgoja je uzgoj biljaka iz njezinih najmanjih dijelova od kojih možemo stvoriti 10000-30000 identičnih biljaka u malom prostoru. To je jedna od najvećih prednosti u odnosu na uzgoj u tlu. Osim toga *in vitro* uzgoj ima visoku stopu razmnožavanja neovisno o vremenu sadnje i sadni materijal proizveden ovim načinom uzgoja nema virusa i patogenih klica.

Biljke se u *in vitro* tehnologiji uzgajaju na hranjivim podlogama. Hranjive podloge sadrže sve mikro i makro elemente potrebne biljci za rast i razvoj. Isto tako dodaju se i hormoni te se regulira pH hranjive podloge (u ovom istraživanju pH je iznosio 5,8). Kako bi hranjiva podloga osigurala biljci dobre uvjete za razvoj, bez patogena i virusa, podvrgnuta je sterilizaciji. Sterilizaciju možemo obavljati na više načina. Najčešći način sterilizacije je u autoklavu, uređaju za sterilizaciju. No, sterilizacija autoklavom je skupa i zahtjeva puno vremena. Napretkom tehnologije i istraživanjima sterilizacija se može vršiti i pomoću mikrovalne pećnice koja se inače koristi u kućanstvu. Takav način sterilizacije jeftiniji je i potrebno je manje vremena za obavljanje postupka sterilizacije.

Ovim istraživanjem došlo se do zaključka kako je sterilizacija pomoću mikrovalne pećnice pokazala odlične rezultate pri intenzitetu zračenja od 600 W u trajanju od 5 minuta. Statističkom obradom podataka i zapažanjima tijekom postupka sterilizacije utvrđeno je da je hranjiva podloga sterilna pri tretmanima koji imaju veći intenzitet zračenja te oni pokazuju bolje ključanje hranjive podloge u odnosu na one tretmane sa nižim intenzitetom zračenja.

7. POPIS LITERATURE

Rad u Časopisu:

1. Bhattacharjee, M.K., Sugawara, K., Ayandjeji, O.T. (2009.): Microwave sterilization of growth medium alleviates inhibition of *Aggregati bacter actinomycetemcomitans* by Maillard reaction products. *Journal of Microbiological Methods*, 78(2): 227-230.
2. Keller, M.D., Bellows, W.K., Guillard, R.R.L. (1988.): Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 117(3): 279-283.
3. Kothari, V., Patadia, M., Trivedi, N. (2011.): Microwave sterilized media supports better microbial growth than auto-claved media. *Research in Biotechnology*, 2(5): 63-72.
4. Kumar, N., Reddy, M.P. (2011.): In vitro plant propagation. *Journal of Forest Science*, 27(2): 61-72.
5. Latimer, J.M., Matsen, H.M. (1977.): Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 6(4): 340-342.
6. Nelson, S. (1990.): Seed germination medium made easy. *American Orchid Society Bulletin*, 59: 39-40.
7. Rohrer, M.D., Bulard, R.A. (1985): Microwave sterilization. *Journal of American Dental Association*, 110: 194-198.
8. Sanborn, M.R., Wan, S. K., Bulard, R. (1982.): Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4): 960-964.
9. Tisserat, B., Jones, D., Galletta, P.D. (1992.): Microwave sterilization of plant tissue culture media. *American Society for Horticultural Science (HORTSCIENCE)*, 27(4): 358-361.
10. Vora, N.C., Jasrai, Y.T. (2012.): Microwave oven based sterilization of media for micropropagation of banana. *Cibtech Journal of Biotechnology*, 1(2-3): 18-21.
11. Venturieri, G.A., Venturieri, A.R., Leopoldo, G. (2013.): Sterilization of culture media for orchids using a microwave oven. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 49(2): 137-144.

12. Weber, B.N., Witherell, R.A., Charkowski, A.O. (2014.): Low-Cost Potato Tissue Culture with Microwave and Bleach Media Preparation and Sterilization. *American Journal of Potato Research*, 92(1): 128-137.
13. Wood, N.J., Lundergan, C.A. (1981.): Microwave sterilization of tissue culture media. *American Society for Horticultural Science (HORTSCIENCE)*: 27(4): 361-364.

Poglavlje u knjizi:

1. Altman, A., Loberant, B. (2010.): Micropropagation of plants, principles and practice. U: Spier, R.E. (ur.) *Encyclopedia of Cell Technology*.: John Wiley & Sons, New York, 916-929.

Rad u zborniku:

1. Youssef, E.M.A., Amin, G.A. (2001.): Microwave sterilization of tissue culture media. *Proceedings of the IV. International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*. Tampere (Finska), 513-516.

Internetske stranice:

1. Anonymous. Crops, Food and Agriculture Organisation. (2010). (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>) (Datum pristupa: 18. srpnja 2019.).
2. Bulatović, R. Mikropropagacija u uzgajanju biljaka. (2019.). (<https://www.borovnica.co.rs/mikropropagacija-u-uzgajanju-biljaka/>) (Datum pristupa: 17. srpnja 2019.).
3. Buchrieser, V., Miorini, T.; Osnove sterilizacije. (2009.) Nastavni materijal iz kolegija: Reprocesiranje med. instrumenata i pribora (https://wfhss.com/wp-content/uploads/wfhss-training-1-09_hr.pdf) (Datum pristupa: 14. srpnja 2019.).
4. Janković, S.M., Milošev, M.Z., Novaković, M.LJ. The Effects of Microwave Radiation on Microbial Cultures. (2014.) (<https://pdfs.semanticscholar.org/5501/3a886a0f0d60f65c8379ee5dc3a1577ac00e.pdf>) (Datum pristupa: 17. srpnja 2019.).
5. Wikipedia. Denis Papin. (2016.) ([://hr.wikipedia.org/wiki/Denis_Papin](http://hr.wikipedia.org/wiki/Denis_Papin)) (Datum pristupa: 15. srpnja 2019.).

8. SAŽETAK

Pri *in vitro* uzgoju biljaka koristimo hranjive podloge. Hranjive podloge sadrže sve potrebne hranjive elemente potrebne biljci za rast i razvoj. Kako bi biljkama bio omogućen rast i razvoj u sterilnim uvjetima, hranjive podloge moraju se sterilizirati. Najčešći način sterilizacije je u autoklavima, no u novije vrijeme moguća je i sterilizacija u mikrovalnoj pećnici koja je jeftinija i dostupnija od autoklava. U istraživanju je korištena mikrovalna pećnica. Istraživanje je provedeno u dva dijela.

Prvi dio istraživanja obuhvaćao je sterilizaciju u mikrovalnoj pri intenzitetu zračenja od 100 W, 180 W, 300 W, 450 W i 600 W. Vrijeme trajanja sterilizacije iznosilo je 5 minuta po tretmanu. Pokus se sastojao od 23 Erlenmayerove tikvice sa 50 mL hranjive podloge. Drugi dio istraživanja obuhvaćao je sterilizaciju u mikrovalnoj pri intenzitetu zračenja od 180 W, 300 W, 450 W i 600 W. Vrijeme trajanja sterilizacije iznosilo je 5 minuta po tretmanu. Pokus se sastojao od 20 Erlenmayerovih tikvica sa 50 mL hranjive podloge i staklena laboratorijska čaša sa 400 mL hladne destilirane vode.

Tijekom istraživanja bilježeno je ključanje hranjive podloge. Najbolji rezultat za sterilnost hranjive podloge ostvaren je pri najvećem intenzitetu zračenja od 600 W. Kod isparavanja najveći postotak isparavanja imali su tretmani na 600 W, a najmanji na 100 W i 180 W. Prema rezultatima dobivenim u istraživanju može se zaključiti da je potreban veći intenzitet zračenja kako bi došlo do sterilnosti i ključanja hranjive podloge.

Ključne riječi: mikrovalna pećnica, autoklav, *in vitro*, sterilizacija, hranjiva podloga

9. SUMMARY

When growing plants in *in vitro* conditions, we use nutrient media. Nutrient media contain all the nutrients needed by the plant for growth and development. To allow plants to grow and develop under sterile conditions, the nutrient medium must be sterilized. They are mostly sterilized in autoclaves, but more recently, sterilization in a microwaves is also possible, which is cheaper and more affordable than autoclaves. In this study microwave was used. The search was done in two ways: 1. The first study was performed for 5 minutes per treatment at a radiation intensity of 100 W, 180 W, 300 W, 450W and 600 W. 23 Erlenmayer flasks were used with 50 mL of nutrient medium. 2. A second study was performed for 5 minutes per treatment at radiation intensity of 180 W, 300 W, 450 W and 600 W. 20 Erlenmayer flasks were used with 50mL of nutrient medium and a laboratory glass with 400 mL of cold distilled water.

During the study, boiling of the nutrient medium was reported, which gave the best results for sterility at the highest radiation intensity of 600 W. During evaporation, treatments at 600 W had the highest percente of evaporation and the treatments at 100 W and 180 W had the lowest percentages. Based on the results of this study it was concluded that a higher intensity of radiation is required for sterility and boiling of the nutrient medium to occur.

Keywords: microwave oven, autoclav, *in vitro*, sterilization, nutrient medium

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Udio makroelemenata u hranjivoj podlozi (100 mL za 1 L hranjive podloge)...	14
Tablica 2. Udio mikroelemenata u hranjivoj podlozi (100 mL za 1 L podloge).....	14
Tablica 3. Udio vitamina u hranjivoj podlozi (na 100 mL vode)	15
Tablica 4. Udio željeza Fe u hranjivoj podlozi (na 100 mL vode)	15
Tablica 5. Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana	20
Tablica 6. Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana	20
Tablica 7. Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana	21
Tablica 8. Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana	22
Tablica 9. Razlike u isparavanju sa i bez upotrebe laboratorijske čaše	24

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Papinov lonac.....	2
Slika 2. Laminar.....	6
Slika 3. Sterilizacija hranjive podloge putem autoklava i mikrovalne pećnice.....	10
Slika 4. Rast <i>Oncidium cebilleta</i> i <i>Phalaenopsis amabili</i> u medijima pripremljenim u mikrovalnoj pećnici sa 1 ili 2 mL Peridol® i u usporedbi sa medijem steriliziranim u autoklavu	12
Slika 5. Odvaga Vitamina B1 Tiamin.....	16
Slika 6. Otopine mikro elementa, vitamina, željeza i HCl-a.....	17
Slika 7. Erlenmayerove tikvice sa hranjivom podlogom zatvorene vatiranim čepovima u klima komori	17
Slika 8. Isparavanje hranjive podloge nakon sterilizacije (s laboratorijskom čašom).....	22
Slika 9. Zagađenost hranjive podloge na temperaturama 100 W i 180 W.....	26
Slika 10. Zagađenost hranjive podloge kod tretmana na temperaturi od 180 W.....	28

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Isparavanje hranjive podloge u mL pri različitom intenzitetu zračenja bez prisustva laboratorijske čaše.....	23
Grafikon 2.. Isparavanje hranjive podloge u mL pri različitom intenzitetu zračenja (sa laboratorijskom čašom).....	23

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

Sveučilišni diplomski studij, smjer Povrćarstvo i cvjećarstvo

Utjecaj intenziteta zračenja na sterilizaciju hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici

Anamaria Beti

Sažetak:

Pri *in vitro* uzgoju biljaka koristimo hranjive podloge. Hranjive podloge sadrže sve potrebne hranjive elemente potrebne biljci za rast i razvoj. Kako bi biljkama omogućile rast i razvoj u sterilnim uvjetima hranjive podloge moraju se sterilizirati. Najčešće se steriliziraju u autoklavima, no u novije vrijeme moguća je i sterilizacija u mikrovalnoj pećnici koja je jeftinija i dostupnija od autoklava. U istraživanju je korištena mikrovalna pećnica. Istraživanje je obavljeno na dva načina: 1. Prvo istraživanje obavljeno je u trajanju od 5 minuta po tretmanu pri intenzitetu zračenja od 100 W, 180 W, 300 W, 450 W i 600 W. Korišteno je 23 Erlenmayerove tikvice sa 50 mL hranjive podloge. 2. Drugo istraživanje obavljeno je u trajanju od 5 minuta po tretmanu pri intenzitetu zračenja od 180 W, 300 W, 450 W i 600 W. Korišteno je 20 Erlenmayerovih tikvica sa 50 mL hranjive podloge i staklena laboratorijska čaša sa 400 mL hladne destilirane vode. Tijekom istraživanja bilježeno je ključanje hranjive podloge koje je dalo najbolje rezultate za sterilnost pri najvećem intenzitetu zračenja od 600 W. Isto tako kod isparavanja najveći postotak isparavanja imali su tretmani na 600 W, a najmanji na 100 W i 180 W. Prema rezultatima dobivenim u istraživanju može se zaključiti da je potreban veći intenzitet zračenja kako bi došlo do sterilnosti i ključanja hranjive podloge.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

Mentor: dr.sc. Monika Tkalec Kojić

Broj stranica: 38

Broj grafikona: 2

Broj slika: 10

Broj tablica: 9

Broj literaturnih navoda: 31

Broj priloga: /

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: mikrovalna pećnica, autoklav, *in vitro*, sterilizacija, hranjiva podloga

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv. prof.dr.sc. Tomislav Vinković, predsjednik
2. dr.sc. Monika Tkalec Kojić, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Miro Stošić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1. Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences

University Graduate Studies, Vegetable and flowergrowing

Influence of microwave oven's wattage on medium sterilization

Anamaria Beti

Abstract:

When growing plants in *in vitro* conditions, we use nutrient media. Nutrient media contain all the nutrients needed by the plant for growth and development. To allow plants to grow and develop under sterile conditions, the nutrient medium must be sterilized. They are mostly sterilized in autoclaves, but more recently, sterilization in a microwaves is also possible, which is cheaper and more affordable than autoclaves. In this study microwave was used. The search was done in two ways: 1. The first study was performed for 5 minutes per treatment at a radiation intensity of 100 W, 180 W, 300 W, 450 W and 600 W. 23 Erlenmayer flasks were used with 50 mL of nutrient medium. 2. A second study was performed for 5 minutes per treatment at radiation intensity of 180 W, 300 W, 450 W and 600 W. 20 Erlenmayer flasks were used with 50 mL of nutrient medium and a laboratory glass with 400 mL of cold distilled water.

During the study, boiling of the nutrient medium was reported, which gave the best results for sterility at the highest radiation intensity of 600 W. During evaporation, treatments at 600 W had the highest percent of evaporation and the treatments at 100 W and 180 W had the lowest percentages. Based on the results of this study it was concluded that a higher intensity of radiation is required for sterility and boiling of the nutrient medium to occur.

Thesis performed at: Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek

Mentor: PhD Monika Tkalec Kojić

Number of pages: 38

Number of graficons: 2

Number of figures: 10

Number of tables: 9

Number of references: 31

Number of appendices: /

Original in: Croatian

Keywords: microwave oven, autoclav, *in vitro*, sterilization, nutrient medium

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. izv.prof.dr.sc. Tomislav Vinković, chair

2. dr.sc. Monika Tkalec Kojić, mentor

3. izv.prof.dr.sc.; Miro Stošić, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.

