

# Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici

---

Matić, Ružica

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*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:151:283017>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**



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 U OSIJEKU**  
**FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK**

Ružica Matić

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**UTJECAJ VREMENSKOG INTERVALA NA STERILIZACIJU HRANJIVE**  
**PODLOGE U MIKROVALNOJ PEĆNICI**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

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

Ružica Matić

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**UTJECAJ VREMENSKOG INTERVALA 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, 2019.

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 2. PREGLED LITERATURE .....  | 3  |
| 3. MATERIJAL I METODE .....  | 8  |
| 3.1. Laboratorijska oprema .....   | 8  |
| 3.2. Priprema hranjive podloge.....  | 9  |
| 3.3. Sterilizacija hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici .....  | 11 |
| 3.4. Prikupljanje podataka .....   | 12 |
| 4. REZULTATI .....   | 13 |
| 4.1. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge .....  | 13 |
| 4.1.1. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana .....    | 13 |
| 4.1.2. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana .....   | 14 |
| 4.1.3. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana .....  | 15 |
| 4.1.4. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana ..... | 15 |
| 4.2. Isparavanje hranjive podloge u mL pri različitim vremenskim intervalima.....  | 16 |
| 4.2.1 . Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 3 minute .....   | 16 |
| 4.2.2 . Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 4 minute .....   | 18 |
| 4.2.3 . Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 5 minuta .....   | 19 |
| 4.2.4 . Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 7 minuta .....   | 20 |
| 5. RASPRAVA.....   | 21 |
| 5.1. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge ....   | 21 |
| 5.2. Isparavanje hranjive podloge u mL pri različitim vremenskim intervalima.....  | 23 |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 6. ZAKLJUČAK.....        | 24 |
| 7. POPIS LITERATURE..... | 25 |
| 8. SAŽETAK.....          | 29 |
| 9. SUMMARY .....         | 30 |
| 10. POPIS TABLICA.....   | 31 |
| 11. POPIS GRAFIKONA..... | 32 |
| 12. POPIS SLIKA .....    | 33 |

## 1. UVOD

Mikrorazmnožavanje je postupak multipliciranja biljnog materijala u posebno specijaliziranim laboratorijima. Postoji više termina koji se koriste za mikrorazmnožavanje, a najtočniji i najpotpuniji bio bi *in vitro* kultura stanica, tkiva i organa (Jelaska, 1994.).

Postavkom teorije totipotentnosti od strane njemačkih biologa Schwanna (1837.) i Schleidena (1838.) nastaje i ideja da se organi, tkiva i stanice biljaka izdvoje i uzgajaju u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Totipotentnost predstavlja sposobnost biljne stanice da formira bilo koji drugi tip stanica ili tkiva koji su na kraju potrebni za regeneraciju cijele biljke (Gautheret, 1983.).

Glavna prednost tehnologije kulture tkiva (mikropropagacije) leži u proizvodnji visokokvalitetnog i ujednačenog sadnog materijala. Također, procesom mikropropagacije osigurava se dugoročno skladištenje zdravog matičnog biljnog materijala i postizanje velikog broja presadnica na relativno malom uzgojnom području. Proces mikropropagacije može se odvijati bez obzira na godišnje doba i vremenske prilike (Markoska-Petrovska i sur., 2003.). Proizvodnja visokog kvalitetnog sadnog materijala uzgojenog od vegetativnih dijelova stvorila je nove mogućnosti u globalnom trgovanju.

Hranjiva podloga sadrži sve neophodne elemente za rast i razvoj same biljke: makroelemente, mikroelemente, šećere, sredstvo za skrućivanje, aminokiseline i ostale zamjene za dušik, nedefinirane zamjene (npr. kokosovo mlijeko), pufere. Kako bi se poboljšao rast, mnoge hranjive podloge sadrže određene organske spojeve, značajne vitamine te biljne regulatore rasta (George i sur., 2008.).

Gamborg i sur. (1968.) te Gamborg i Phillips (1995.) navode jedan da je od važnijih faktora za uspješan *in vitro* uzgoj biljaka i sredstvo za skrućivanje hranjive podloge – agar (Agarose). Zadatak ovog sredstva je povećati viskoznost hranjive podloge zbog čega biljna tkiva i organi ostaju iznad površine hranjive podloge. Agar je najčešće korišteno sredstvo i koristi se za pripremu čvrstih i polučvrstih hranjivih podloga. Doprinosi vlažnosti zraka i utječe na dostupnost vode i otopljene tvari (Debergh, 1983.).

Vrsta hranjive podloge ovisi o izboru biljke. Podloga može biti kruta, polučvrsta ili tekuća, ovisno o prisutnosti ili odsutnosti sredstva za skrućivanje podloge. Neka tkiva reagiraju bolje na čvrste podloge dok druga na tekuće (Prakash i sur. 2002.). Hranjive podloge MS (Murashige i Skoog 1962.) i LS (Linsmaier i Skoog 1965.) su podloge koje se najviše upotrebljavaju. MS hranjiva podloga uspješno se primjenjuje za velik broj kultura i njihovih tipova (Jelaska, 1994.). Murashige i Skoog (MS) hranjiva podloga razvijena je za optimalni rast tkiva duhana, a sadrži relativno male vrijednosti Ca, P i Mg (George i sur., 2008.).

Uspješnost *in vitro* uzgoja biljnih tkiva i organa kao načina razmnožavanja uvelike ovisi o steriliziranosti hranjive podloge.

Prema Pierik (1997.) *in vitro* rast i razvoj biljke određuju još neki složeni faktori:

1. Genetski sastav biljke
2. Hranjive tvari: voda, makro i mikro elementi i šećeri
3. Faktori fizičkog rasta: svjetlost, temperatura, pH, koncentracije O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>
4. Neke organske tvari: regulatori, vitamini itd.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj različitog vremenskog intervala pri najvećem stupnju snage mikrovalne pećnice na sterilizaciju *in vitro* hranjive podloge.

## 2. PREGLED LITERATURE

Sterilizacija je postupak stvaranja aseptičnog stanja, odnosno uklanjanje ili ubijanje svih mikroorganizama i bakterijskih spora. Prema Rao (2008.) sterilizacija hranjive podloge se može vršiti na više načina: fizičkim uništavanjem mikroorganizama, kemijskim uništavanjem mikroorganizama i fizičkokemijskim putem.

Prema Kawachi i Noël (2005.) metode sterilizacije možemo svrstati u četiri kategorije:

- toplinska sterilizacija
- sterilizacija elektromagnetskim valovima
- sterilizacija filtracijom
- kemijska sterilizacija

Sterilizacija u autoklavu je najčešća metoda sterilizacije hranjive podloge za *in vitro* uzgoj biljaka. Autoklav je specijalizirani aparat koji se sastoji od zatvorene komore unutar koje na temperaturi od 121 °C i pri visokom tlaku pare dolazi do sterilizacije (Burger, 1988.; Perkins, 1969.).

Nedostatak postupka sterilizacije u autoklavu je taj što traje dugo vremena (minimalno 15 minuta) (Torres, 2012.). Nakon postupka sterilizacije potrebno je čekati nekoliko sati dok pritisak unutar autoklava ne padne kako bi se omogućilo otvaranje aparata (Bhowmik, 2011.).

Neke od nedostataka sterilizacije hranjive podloge u autoklavu navode sljedeći autori: Schenk i sur. (1991.) utvrdili su da tijekom sterilizacije u autoklavu, dolazi do raspada monosaharida i taloženja određenih mikronutrijenata, što dovodi do smanjene kvalitete MS hranjive podloge.

Pan i Staden (1999.) navode da je sterilizacijom u autoklavu izazvana hidroliza saharoze za 56 % u MS hranjivoj podlozi sa aktivnim ugljenom i 20 % u MS hranjivoj podlozi bez aktivnog ugljena.

Nadalje, hranjive podloge sterilizirane u autoklavu mogu imati toksične i štetne učinke na *in vitro* kulture (Buter i sur., 1993.; Sawyer i Hsiao, 1992.; Wang i Hsiao, 1995.).



Nedostaci autoklavirane hranjive podloge poput promjene pH, stvaranja taloga i onečišćenja od metala uslijed nečistoća u pari, sprječavaju se mikrovalnom sterilizacijom (Keller i sur., 1988. i Tisserat i sur., 1992.).

Sterilizacija mikrovalnom pećnicom brža je nego sterilizacija parom ili suha sterilizacija. Ova metoda sterilizacije je učinkovita i netoksična. Preporuča se koristiti mikrovalnu pećnicu koja je opremljena s rotirajućim stolom i ima do 700 watt (W) (Kawachi i Noël, 2005.). Uspješnost ove metode sterilizacije hranjive podloge ovisi o volumenu hranjive podloge, broju uzoraka koji se sterilizira istovremeno te o snazi mikrovalne pećnice (Arditti, 2008.).

Mikrovalna energija je vrsta visokofrekventnog radio vala, zbog toga molekule vode vibriraju iznimno velikom brzinom, proizvodeći trenje koje u okretu proizvodi toplinu, izazivajući širenje molekula i postiže se sterilizacija (Spencers i sur., 1985.).

Prema Arditti (2008.) važne mjere opreza tijekom sterilizacije hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici su:

1. Ne smiju se koristiti potpuno zatvorene tikvice ili epruvete u kojima se nalazi hranjiva podloga za *in vitro* uzgoj, jer će se unutar njih stvoriti pritisak i mogu eksplodirati
2. Ne smiju se koristiti metalni čepovi
3. Čepovi od vate, koji se smiju koristiti, ne smiju dolaziti u dodir s medijem jer će to dovesti do naknadne kontaminacije
4. Budući da učinci mikrovalne sterilizacije na mnoge komponente hranjive podloge nisu poznati, prije primjene nekog istraživanja treba se provesti preliminarno ispitivanje
5. Aluminijska folija i bilo koji drugi metalni predmeti nikada se ne smiju stavljati u mikrovalnu pećnicu
6. Posude, epruvete ili tikvice i otopine mogu biti vrlo vrući nakon mikrovalne sterilizacije i s njima se treba pažljivo postupati kako bi se spriječile ozljede
7. Zapaljive otopine ne smiju se sterilizirati u mikrovalnoj pećnici
8. Živa tkiva i biljke ne smiju se sterilizirati u mikrovalnoj pećnici, mikrovalne pećnice će ih ubiti ili skuhati
9. Mikrovalne pećnice treba redovito servisirati radi sigurnosti

Mikrovalne pećnice su se koristile u razne svrhe sterilizacije. Tako su Bilbrough (1969.) te Culkin i Fung (1975.) tijekom svog istraživanja koje su provodili koristili mikrovalne pećnice i utvrdili da su mikrovalne pećnice učinkovite u dekontaminaciji prehrambenih proizvoda. Sasaki i sur. (1995., 1998.) primjenjivali su u svom istraživanju mikrovalne pećnice za sterilizaciju ampula za injekcije.

Keller i sur. (1988.) utvrdili su da tijekom sterilizacije pri 700W i uz dodatak 1 do 1,5L morske vode se može sterilizirati podloga za fitoplanktome. Mikroalge su ubijene za 5 minuta, bakterije za 8 minuta, a gljivice za 10 minuta.

Za sterilizaciju staklenog posuđa, Boye i Van den Berg (2000.) koristili su mikrovalnu pećnicu. Prethodno su u posuđe dodali mali volumen destilirane vode. Sterilizacija je provedena tijekom 20 minuta na 600 W. Nakon sterilizacije, vodu su izbacili iz posuđa primjenom sterilnih procesa u laminaru.

Slično istraživanje provodili su Jeng i sur. (1987.). U njihovom istraživanju nije bila dodana destilirana voda u staklenu posudu, stoga je za sterilizaciju mikrovalnom pećnicom bilo potrebno 45 minuta ili više za uništavanje bakterijskih spora.

Latimer i Metsen (1977.) te Sanborn i sur. (1982.) koristili su mikrovalne pećnice za kućanstvo za sterilizaciju plastičnih posuda za kulturu tkiva. Patterson i Bulard (1980., 1981.) utvrdili su da su mikrovalovi u mikrovalnoj pećnici sposobni popraviti stanice u kulturi tkiva.

Wood i Lundergan (1981.) koristili su mikrovalnu pećnicu za sterilizaciju MS hranjive podloge i podloge za mikropropagaciju jagode prema Boxus (1974.). Tretmani su u mikrovalnoj pećnici trajali 1, 1,5, 2 i 3 minute. Utvrdili su da se kontaminacija javila na hranjivim podlogama koje su sterilizirane manje od 2 minute. One hranjive podloge koje su sterilizirane tijekom 2 i 3 minute ostale su čiste.

U svom istraživanju Venturieri sur. (2013.) uspoređivali su rast biljaka *Oncidium cebolleta* i *Phalaenopsis amabilis* na dvije hranjive podloge, od kojih je jedna bila sterilizirana u autoklavu a druga u mikrovalnoj pećnici. Utvrđeno je da dodavanjem 2 mL 30% vodikovog peroksida (Peridrol® otopina) po litri kultivacijskog medija, uz 8-minutno vrijeme vrenja u mikrovalnoj pećnici i 8g/L agara dovoljni za dobivanje očvrnutih hranjivih podloga, olakšano klijanje i rast sjemena bez kontaminacije. Nadalje, biljke na hranjivoj podlozi koja je sterilizirana u mikrovalnoj pećnici pokazale su vrhunski rast.

Youssef i sur. (2001.) utvrdili su da hranjive podloge koje se steriliziraju u mikrovalnoj pećnici 15 minuta na 390 W ili 5, 10 ili 15 minutapri 520 W daju 96 -100% sterilizaciju i potpuno inhibiraju rast *Bacillus subtilis*, *B. megatherium* i *B. coagulans*. Uzorci *Populus alba* koji su uzgajani na hranjivoj podlozi koja je bila sterilizirana u mikrovalnoj pećnici na 260 W u trajanju od 5 minuta pokazali su najveću frekvenciju preživljavanja, dok su oni uzgajani na hranjivoj podlozi steriliziranoj na 520 W tijekom 10 minuta rezultirali najvećim brojem listića. Najduži korijen nastao je na hranjivoj podlozi koja je sterilizirana 15 minuta na 130 W te 10 i 15 minuta pri 390 W i 520 W.

Weber i sur. (2014.) naveli su u svom istraživanju alternativne i jeftinije metode mikropropagacije različitih sorti krumpira. Tako su pripremljenu MS hranjivu podlogu s dodatkom NaOClsterilizirali u mikrovalnoj pećnici od 1200 WGE (model JES2251SJ02, General Electric Company) postavljena na 100% snage, na 5 minuta. Utvrdili su da su biljke dobro rasle i da na svih 16 uzoraka, smještenih u kontroliranom okruženju, nije bilo onečišćenja.

Vora i Jasrai (2012.) u svom istraživanju o mikropropagaciji banane *Musa paradisiaca* Linn var *Grand naine* navode da je MS hranjiva podloga sterilizirana u mikrovalnoj pećnici (model CE1031LAT/XTL, Samsung Electronics) pri različitoj snazi (180 – 900 W) i različitom vremenu (od 10 sekundi do 5 minuta). Svaki tretman uključivao je 5 uzoraka po 40 mL. Utvrdili su da je sterilizacija hranjive podloge uspješno postignuta pri 900 W / 200 mL hranjive podloge i za 4 minute. Utvrdili su i da je hranjiva podloga sterilizirana u mikrovalnoj pećnici pokazala veću prozirnost od one koja je sterilizirana u autoklavu. Također, broj mladica banane za razmnožavanje bio je veći na hranjivoj podlozi koja je sterilizirana u mikrovalnoj pećnici.

Tisserat i sur. (1992.) utvrdili su da se hranjiva podloga potrebna za mikropropagaciju jagode, mrkve i limuna može uspješno sterilizirati u mikrovalnoj pećnici. U svom istraživanju koristili su mikrovalnu pećnicu Sharp Carousal II (model R-5E80, Sharp Electronics Corp.). Utvrdili su da se 15 zdjelica (95x100mm), koje su sadržavale 50 mL BM agar hranjive podloge, uspješno sterilizira na 700 W i 15 minuta. Nadalje, istraživanje je pokazalo da je za sterilizaciju 25 mL hranjive podloge, koje se nalazila u epruvetama (25x150mm), uz dodatak dvije boce od 1 L koje su sadržavale 900 mL destilirane vode, potrebno 15 minuta na 350 W ili 10 minuta na 700 W. Istraživanjem je utvrđeno potrebno vrijeme sterilizacije tekuće hranjive podloge koja sadrži 3 % saharoze i koja je sterilizirana na 700 W za određene volumene hranjive podloge. Tako je za 100 mL potrebno 5 minuta, 250 mL/10 minuta, 500 mL/10 minuta, 1000 mL/15 minuta, 2000 mL/30 minuta, dok je za 3 000 mL potrebno 50 minuta sterilizacije u mikrovalnoj pećnici.

U svom istraživanju Smith (1986.) koristio je agar (2,47 g), soli (2,27 g) i vodu (66, 67 mL) i pripremljenu smjesu stavio u boce koje su bile začepljene čepovima od vate koji su sterilizirani u izbjeljivaču. Tako pripremljene boce stavljene su u mikrovalnu pećnicu Sharp (model R – 6210, Sharp Electronics Corp.) koja ima snagu od 600 W. Nakon što je došlo do ključanja medija, boce su izvađene iz mikrovalne pećnice, protresene i ponovno vraćene u mikrovalnu pećnicu. Utvrđeno je da je hranjiva podloga bila sterilizirana tek nakon drugog ključanja.

Marlow i Muir (1986.) su također utvrdili da je hranjiva podloga bila sterilizirana tek nakon drugog ključanja u mikrovalnoj pećnici. Koristili su 70 mL hranjive podloge stavljene u boce od 250 mL zatvorene sa čepovima od vate koji su sterilizirani u 10% izbjeljivaču. Mikrovalna pećnica je bila postavljena na najveću snagu, a sterilizacija je trajala 70 sekundi, za svaku bocu posebno.

### 3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno tijekom akademske 2018./2019. godine u kontroliranim uvjetima u Laboratoriju za povrćarstvo, cvjećarstvo, ljekovito, začinsko i aromatično bilje na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku.

#### 3.1. Laboratorijska oprema

Tijekom istraživanja korištene su sljedeće grupe laboratorijske opreme:

##### 1. Oprema za pripremu hranjive podloge

Kod postupka pripreme hranjive podloge korišteni su električno kuhalo, rostoffrei posuđe, plastična kuhača, destilirana voda, precizna vaga (0,01 g), špatule za vaganje, pH metar, kemikalije, Erlenmeyer tikvice, staklene menzure i čaše, čepovi od vate, pipete (Slika 1.).

##### 2. Opća oprema

Kao opća oprema korišteni su hladnjak, mikrovalna pećnica Samsung (model MG23F301TAK, Samsung Electronics), kolica, deterdženti za posuđe, četke različitih veličina.

##### 3. Klima komora

Prostor unutar koga se čuvaju *in vitro* kulture (u ovom slučaju samo hranjiva podloga). Sastoji se od polica, fluorescentnih cijevi za osvjetljenje, timera, izvora struje, klima uređaja, stola za opažanje, sudopera i izvora vode



Slika 1. Korištena laboratorijska oprema (izvor: Matic)

### 3.2. Priprema hranjive podloge

Hranjiva podloga koja je sterilizirana u mikrovalnoj pećnici pripremljena je prema recepturi Murashige i Skoog (1962.) na sljedeći način (Slika 2):

- U lonac se usipa destilirana voda i stavi na zagrijavanje na električno kuhalo. Kada se voda zagrije dodaje se agar i miješa dok voda ne prokuha. Nakon što voda prokuha dodaje se šećer, odnosno saharoza. Pipetom se dodaje odgovarajuća količina mikroelemenata, makroelemenata, vitamina i željeza, nakon čega se prelije u menzuru i dopuni do određenog volumena.
- Smjesa se zatim ponovo vraća u lonac i podešava joj se pH na 5,8 korištenjem HCl ili NaOH. Konačni pH odredi se pomoću pH metra. U smjesu se dodaju hormoni indol-3-maslačna kiselina (IBA) iz grupe auksina, koji se priprema otapanjem u NaOH i 6-benzil aminopurin (BAP) iz grupe citokinina, koji se priprema otapanjem u HCl. Točne količine sastojaka korištenih za pripremu hranjive podloge prikazane su u Tablici 1.
- U svaku Erlenmeyer tikvicu se izlijeva po 50 mL smjese, zatvore se sa čepom od vate (Slika 3.), a zatim se stavljaju u mikrovalnu pećnicu na 800 W i različito vrijeme sterilizacije.



Slika 2. Priprema hranjive podloge (izvor: S. Guberac)

Tablica 1. Sastojci i količine sastojaka za pripremu hranjive podloge

| Sastojak             | Količina |
|----------------------|----------|
| <i>Agar</i>          | 6,4 g    |
| <i>Inositol</i>      | 0,1 g    |
| <i>Saharoza</i>      | 30 g     |
| <i>Makroelementi</i> | 100 mL   |
| <i>Mikroelementi</i> | 1 mL     |
| <i>Vitamini</i>      | 1 mL     |
| <i>Željezo</i>       | 5 mL     |
| <i>IBA</i>           | 1 mL     |
| <i>BAP</i>           | 0,5 mg/L |



Slika 3. Pripremljena podloga u Erlenmeyer tikvicama (izvor: Matić)

### 3.3. Sterilizacija hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici

Nakon što je hranjiva podloga bila skuhana i stavljena u Erlenmeyer tikvice te nakon što su tikvice bile zatvorene lagano sa čepovima od vate slijedio je postupak sterilizacije.

U ovom istraživanju je korištena mikrovalna pećnica Samsung (model MG23F301TAK, Samsung Electronics) (Slika 4.) kako bi se ispitala mogućnost sterilizacije hranjive podloge pomoću nje u različitim vremenskim intervalima, a pri najvećem stupnju snage mikrovalne pećnice (800 W).



Slika 4. Mikrovalna pećnica Samsung (model MG23F301TAK, Samsung Electronics)  
(izvor: Matić)

U prvom ispitivanju u svaku od 25 Erlenmeyer tikvica stavljeno je 50 mL hranjive podloge. Svaki tretman uključivao je 5 uzoraka, odnosno 5 Erlenmeyer tikvica s hranjivom podlogom. Ispitivani tretmani su trajali 1 minutu, 3 minute, 4 minute, 5 minuta i 7 minuta. Pri svakom ispitivanom tretmanu snaga mikrovalne pećnice bila je 800 W.

U drugom ispitivanju u svaku od 20 Erlenmeyer tikvica stavljeno je 50 mL hranjive podloge. Svaki tretman uključivao je 5 uzoraka, odnosno 5 Erlenmeyer tikvica s hranjivom podlogom te 400 mL destilirane vode koja se nalazila ustaklenoj laboratorijskoj čaši od 500 mL (Slika 5.). Ispitivani tretmani su trajali 3 minute, 4 minute, 5 minuta i 7 minuta. Pri svakom ispitivanom tretmanu snaga mikrovalne pećnice bila je 800 W.





Slika 5. Erlenmeyer tikvice s hranjivom podlogom i 400 mL destilirane vode u staklenoj laboratorijskoj čaši (izvor: Matić)

### 3.4. Prikupljanje podataka

Nakon provedenog postupka sterilizacije Erlenmeyer tikvice stavljene su u klima komoru (Slika 6.). Podaci o stupnju steriliziranosti i o izgubljenim mL hranjive podloge zabilježeni su nakon 7 dana te nakon 14 dana za sve ispitivane tretmane.



Slika 6. Erlenmeyer tikvice s hranjivom podlogom u klima komori (izvor: Matić)

## 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

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

Tijekom provedbe sterilizacije u mikrovalnoj pećnici bilježeni su podaci o ključanju hranjive podloge. Ključanje hranjive podloge jedino senije dogodilo pri tretmanu od 1 minute, dok je na svim ostalim tretmanima, 3 minute, 4 minute, 5 minuta i 7 minuta, došlo do ključanja hranjive podloge.

Statističkom obradom podataka koji su zabilježeni nakon 7 dana, nisu zabilježene nikakve razlike između ispitivanih tretmana koji su se odvijali pri 3 minute, 4 minute, 5 minuta i 7 minuta. U svim navedenim tretmanima nije došlo do zagađenja hranjive podloge. Kod tretmana koji se provodio na 1 minuti jedino je došlo do zagađenja hranjive podloge, stoga sterilnost iznosi 40 % (Tablica 2.).

Tablica 2. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana

| Tretmani                 | Erlenmeyer tikvica (%) |                  |
|--------------------------|------------------------|------------------|
|                          | Ključanje              | Sterilno         |
| Vremenski interval (min) |                        |                  |
| 1                        | 0 <sup>a</sup>         | 40 <sup>b</sup>  |
| 3                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |
| 4                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |
| 5                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |
| 7                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |

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

Nakon 14 dana ponovno su zabilježeni podaci o postotku steriliziranosti hranjive podloge (Slika 7.). Statističkom obradom podataka ponovno nisu zabilježene nikakve razlike između ispitivanih tretmana koji su se odvijali pri 3 minute, 4 minute, 5 minuta i 7 minuta. U svim navedenim tretmanima nije došlo do zagađenja hranjive podloge. Kod tretmana koji se provodio na 1 minuti jedino je došlo do zagađenja hranjive podloge, stoga sterilnost iznosi 20 % (Tablica 3.)

Tablica 3. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana

| Tretmani                 | Erlenmeyer tikvica (%) |                  |
|--------------------------|------------------------|------------------|
|                          | Ključanje              | Sterilno         |
| Vremenski interval (min) |                        |                  |
| 1                        | 0 <sup>a</sup>         | 20 <sup>b</sup>  |
| 3                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |
| 4                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |
| 5                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |
| 7                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |



Slika 7. Kontaminacija hranjive podloge pri tretmanu od 1 minute zabilježena nakon 14 dana (izvor: Matic)

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

Tijekom statističke obrade podataka koji su zabilježeni nakon 7 dana, a uključivali su tretmane od 3, 4, 5, i 7 minuta nisu zabilježene nikakve razlike. Pri svakom tretmanu došlo je do ključanja hranjive podloge. Iz Tablice 4. vidljivo je da je sterilnost, koja je zabilježena nakon 7 dana, kod svakog ispitivanog tretmana 100 %.

Tablica 4. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana

| Tretmani                 | Erlenmeyer tikvica (%) |                  |
|--------------------------|------------------------|------------------|
|                          | Ključanje              | Sterilno         |
| Vremenski interval (min) |                        |                  |
| 3                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |
| 4                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |
| 5                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |
| 7                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |

#### 4.1.4. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana

Podaci koji su prikupljeni nakon 14 dana i statistički obrađeni (Tablica 5.) pokazuju značajnu razliku u sterilnosti hranjive podloge. Tretman koji se provodio pri 3 minute rezultirao je sa 60 % sterilnosti hranjive podloge, dok je tretman od 4 minute rezultirao sa sterilnošću od 80 %.

Tablica 5. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana

| Tretmani                 | Erlenmeyer tikvica (%) |                  |
|--------------------------|------------------------|------------------|
|                          | Ključanje              | Sterilno         |
| Vremenski interval (min) |                        |                  |
| 3                        | 100 <sup>b</sup>       | 60 <sup>b</sup>  |
| 4                        | 100 <sup>b</sup>       | 80 <sup>b</sup>  |
| 5                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |
| 7                        | 100 <sup>b</sup>       | 100 <sup>a</sup> |

## 4.2. Isparavanje hranjive podloge u mL pri različitim vremenskim intervalima

Nakon 14 dana od postavljanja Erlenmeyer tikvica s hranjivom podlogom u klima komoru, izmjereni su podaci o izgubljenosti hranjive podloge u mL koja je nastala tijekom sterilizacije procesom isparavanja (Slika 8.).

Prema prikupljenim podacima vidi se značajna razlika u vidu manjeg isparavanja hranjive podloge kada je bila prisutna laboratorijska staklena čaša u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode (Grafikon 1., 2., 3., 4.).

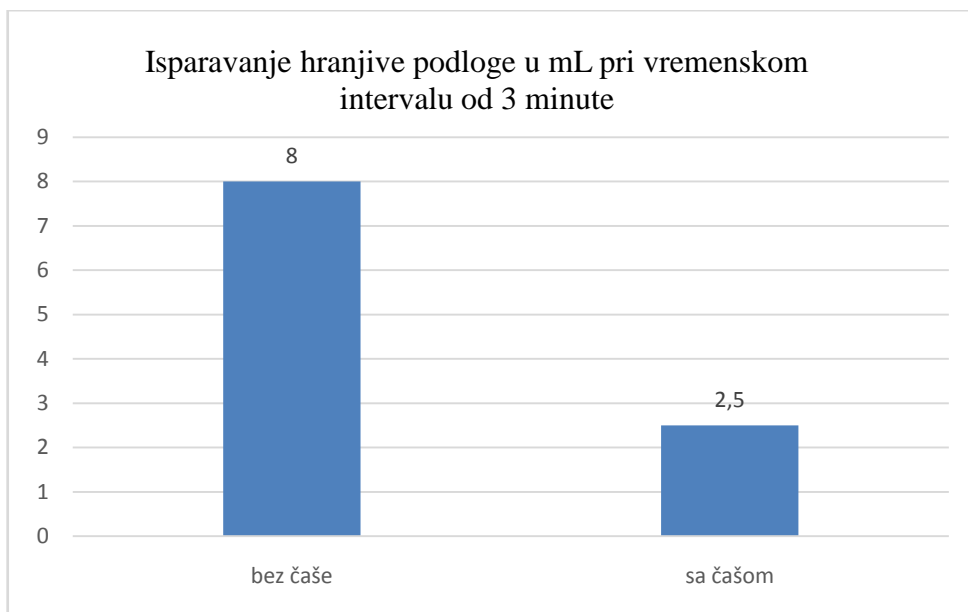


Slika 8. Izgubljena hranjiva podloga isparavanjem bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše (izvor: Matić)

### 4.2.1 . Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 3 minute

Prisutnost laboratorijske čaše u kojoj se nalazila destilirana voda tijekom sterilizacije u mikrovalnoj pećnici doprinijela je značajno manjem gubitku hranjive podloge.

U vremenskom intervalu od 3 minute kada je bila prisutna staklena laboratorijska čaša sa 400 mL destilirane vode, gubitak hranjive podloge iznosio je 2,5 mL, dok je bez prisutnosti destilirane vode taj gubitak iznosio 8 mL hranjive podloge (Grafikon 1.) (Slika 9.).



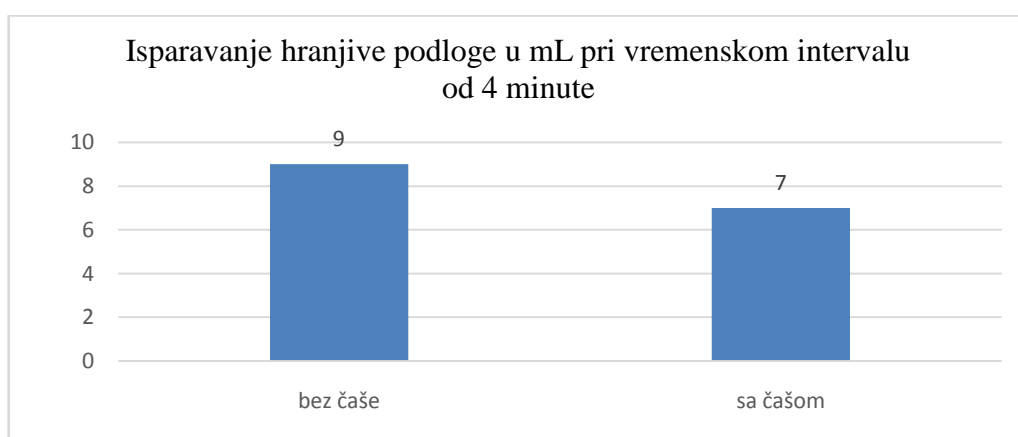
Grafikon 1. Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 3 minute



Slika 9. Izgubljena hranjiva podloga isparavanjem bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše pri tretmanu od 3 minute (izvor: Matić)

#### 4.2.2 . Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 4 minute

Najmanja razlika izgubljenih mL hranjive isparavanjem podloge sa i bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode zabilježena je pri sterilizaciji hranjive podloge u vremenskom intervalu od 4 minute. U tretmanu kada nije bila prisutna staklena laboratorijska čaša u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode gubitak hranjive podloge iznosio je 9 mL (Slika 10.), dok je uz prisutnost destilirane vode gubitak hranjive podloge iznosio 7 mL. Razlika gubitka hranjiva podloge iznosila je samo 2 mL (Grafikon 2.).



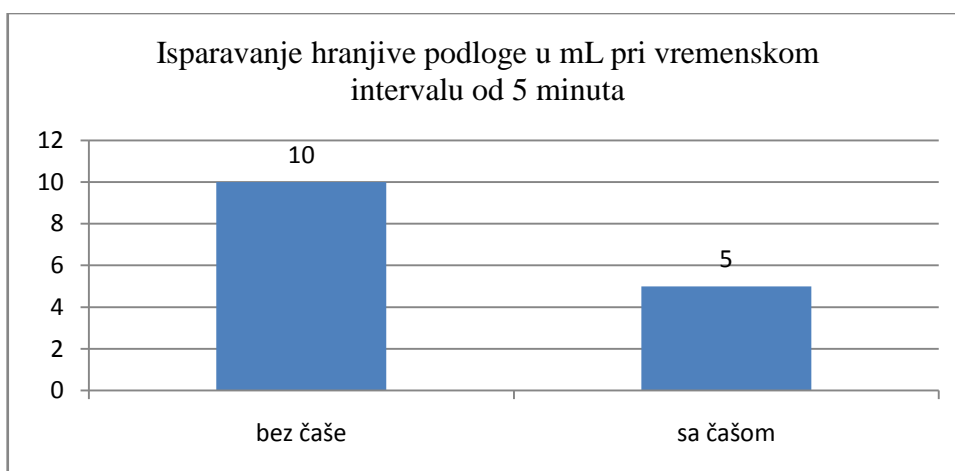
Grafikon 2. Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 4 minute



Slika 10. Izgubljena hranjiva podloga isparavanjem bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše pri tretmanu od 4 minute (izvor: Matić)

### 4.2.3 . Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 5 minuta

Isparavanje hranjive podloge koje je zabilježeno kod vremenskog intervala od 5 minuta kada je bila prisutna staklena laboratorijska čaša u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode upola je manje nego isparavanje koje je zabilježeno s prisutnošću staklene laboratorijske čaše. U ispitivanom vremenskom intervalu od 5 minuta kada nije bila prisutna staklena laboratorijska čaša u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode gubitak hranjive podloge iznosio je 10 mL (Slika 11.), dok je uz prisutnost destilirane vode taj gubitak iznosio samo 5 mL (Grafikon 3.).



Grafikon 3. Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 5 minuta



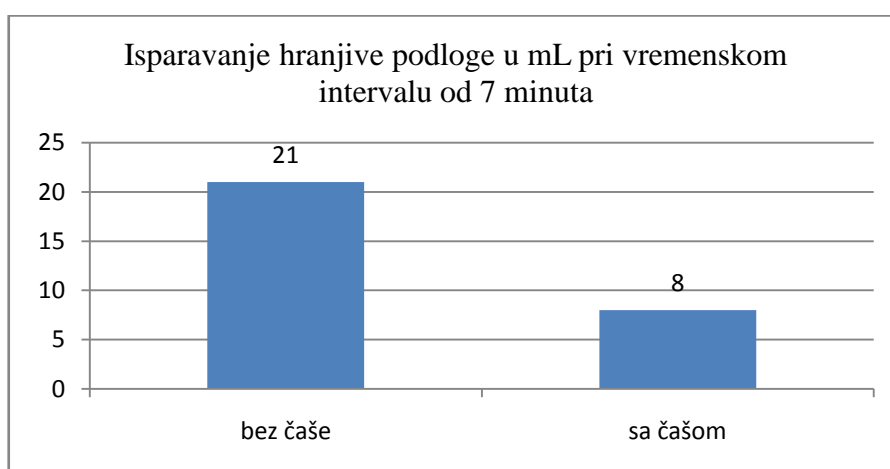
Slika 11. Izgubljena hranjiva podloga isparavanjem bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše pri tretmanu od 5 minuta (izvor: Matić)



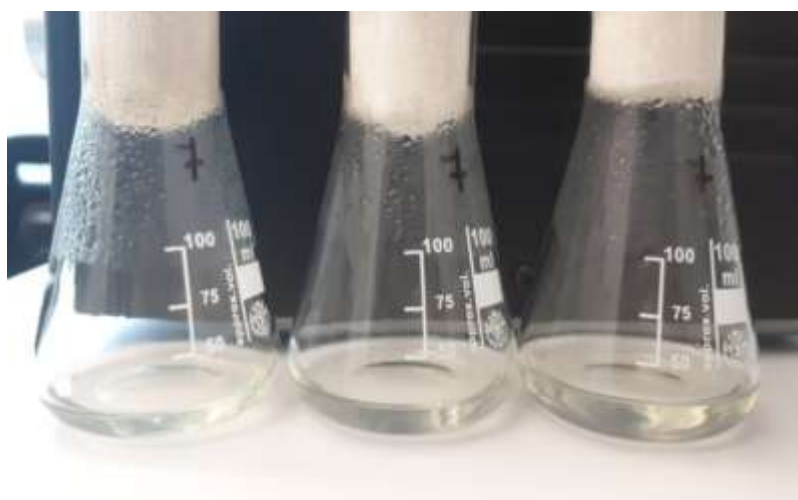
#### 4.2.4 . Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 7 minuta

Prema prikupljenim i obrađenim podacima najveća razlika izgubljenih mL hranjive podloge isparavanjem zabilježena je pri tretmanu od 7 minuta.

Tijekom sterilizacije u mikrovalnoj pećnici kada nije bila prisutna staklena laboratorijska čaša u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode, gubitak hranjive podloge je iznosio 21 mL (Slika 12). U ispitivanom tretmanu kada je laboratorijska staklena čaša bila prisutna taj gubitak je iznosio samo 8 mL, što čini razliku od 13 mL (Grafikon 4.).



Grafikon 4. Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 7 minuta



Slika 12. Izgubljena hranjiva podloga isparavanjem bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše pri tretmanu od 7 minuta (izvor: Matić)

## 5. RASPRAVA

Napretkom tehnologije razvijale su se i mikrovalne pećnice. Stoga su one danas veće snage pa i vrijeme potrebno za sterilizaciju postaje kraće. Nadalje, djelotvornost mikrovalne pećnice često se smanjuje tijekom vremena korištenja, stoga starija pećnica zahtijeva više vremena.

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje MS hranjive podlogeza *in vitro* uzgoj biljaka u mikrovalnoj pećnici Samsung (model MG23F301TAK, Samsung Electronics).

Ispitivani tretmani pri različitim vremenskim intervalima (1 minuta, 3 minute, 4 minute, 5 minuta i 7 minuta) i najvećem stupnju snage mikrovalne pećnice (800W) provodili su se na dva načina:

- Različiti vremenski intervali sterilizacije hranjive podloge bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode
- Različiti vremenski intervali sterilizacije hranjive podloge uz prisutnost staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode

### 5.1. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge

Prema podacima koji su zabilježeni nakon 7 i 14 dana i statistički obrađeni o ispitivanim tretmanima kada nije bila prisutna staklena laboratorijska čaša u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode vidljivo je da je sterilnost MS hranjive podloge iznosila 100 % pri tretmanima koji su se odvijali u vremenskom intervalu od 3, 4, 5 i 7 minuta na 800 W.

Rezultati Youssef i sur. (2001.) pokazuju da se 96 – 100 % sterilizacija hranjive podloge može postići i pri manjem stupnju snage mikrovalne pećnice ali pri dužem vremenskom intervalu: 5 minuta na 390 W ili 5, 10 ili 15 minuta pri 520 W.

One hranjive podloge koje su sterilizirane u vremenskom intervalu od 1 minute pokazale su 40 % sterilnosti hranjive podloge nakon 7 dana, odnosno samo 20 % sterilnosti nakon 14 dana. Ovakve rezultate u svom istraživanju navode i Wood i Lundergan (1981.) gdje su koristili mikrovalnu pećnicu za sterilizaciju MS hranjive podloge i podloge za mikropropagaciju jagode prema Boxus (1974.). Prema njihovim rezultatima vidljivo je da se kontaminacija javila na hranjivim podlogama koje su sterilizirane manje od 2 minute (ispitivani tretmani su trajali 1, 1,5, 2 i 3 minute)

Također, tijekom sterilizacije MS hranjive podloge bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode pri vremenskom intervalu od 1 minute, nije došlo do ključanja hranjive podloge.

Prema rezultatima koje u svojim istraživanjima navode Smith (1986.) te Marlow i Muir (1986.), hranjiva podloga će biti sterilizirana tek nakon drugog ključanja, stoga je izostanak ključanja hranjive podloge pri vremenskom intervalu od 1 minute moguć razlog malog postotka steriliziranosti hranjive podloge (40 % nakon 7 dana, 20 % nakon 14 dana).

U ispitivanim tretmanima kada je bila prisutna staklena laboratorijska čaša u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode, izostavljen je tretman u vremenskom intervalu od 1 minute zbog izostanka ključanja hranjive podloge u prethodno ispitivanom tretmanu bez staklene laboratorijske čaše.

Dobiveni rezultati pokazuju da je do ključanja MS hranjive podloge došlo u svim tretmanima pri svim vremenskim intervalima (3, 4, 5, i 7 minuta) kada se u mikrovalnoj pećnici, zajedno sa 5 Erlenmeyer tikvica u kojima se nalazilo 50 mL hranjive podloge, nalazila i staklena laboratorijska čaša u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode.

Prema dobivenim podacima koji su zabilježeni nakon 7 dana vidljivo je da je sterilnost MS hranjive podloge iznosila 100 % u svim ispitivanim tretmanima. Nakon 14 dana ponovnom zabilježbom podataka uočena je manja sterilnost hranjive podloge. Obradom podataka ona je iznosila:

- pri tretmanu koji se odvijao u vremenskom intervalu od 3 minute – 60 %
- pri tretmanu koji se odvijao u vremenskom intervalu od 4 minute – 80 %

## **5.2. Isparavanje hranjive podloge u mL pri različitim vremenskim intervalima**

Prema prikupljenim i statistički obrađenim podacima vidi se značajan utjecaj prisutnosti laboratorijske staklene čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode na isparavanje MS hranjive podloge.

Najmanja razlika izgubljenih mL hranjive podloge isparavanjem sa i bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode zabilježena je pri sterilizaciji hranjive podloge u vremenskom intervalu od 4 minute. Razlika je iznosila 2 mL.

Najveća razlika izgubljenih mL hranjive podloge isparavanjem sa i bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode zabilježena je pri tretmanu od 7 minuta. U ispitivanom tretmanu kada je laboratorijska staklena čaša bila prisutna taj gubitak je iznosio samo 8 mL, dok je bez prisutnosti čaše gubitak iznosio 21 mL, što čini razliku od 13 mL.

Prema rezultatima Boye i Van den Berg (2000.) te Jeng i sur. (1987.) prisutnost staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazi destilirana voda ne dovodi samo do smanjenog isparavanja hranjive podloge već i do smanjenja potrebnog vremena sterilizacije, 20 minuta na 600 W u istraživanju Boye i Van den Berg (2000.), a 45 minuta ili više u istraživanju Jeng i sur. (1987.).

Rezultati istraživanja Tisserat i sur. (1992.) pokazuju da je potrebno vrijeme sterilizacije u mikrovalnoj pećnici ukoliko se uz hranjivu podlogu nalazi i dodatak destilirane vode 15 minuta na 350 W ili 10 minuta na 700 W za 25 mL MS hranjive podloge.

## 6. ZAKLJUČAK

Sterilizacija hranjive podloge za *in vitro* kulturu obično se izvodi pomoću autoklava. No, to je skupa metoda zbog visoke cijene same opreme (autoklava) i potrošnje energije. Osim toga, autoklaviranje može dovesti do raspadanja organskih sastojaka hranjive podloge poput saharoze.

Iz tih razloga zamjena ove metode sterilizacije hranjive podloge sa nekom drugom, alternativnom metodom može dati jednako učinkovite rezultate u sprečavanju kontaminacije i još efikasnije rezultate u biljnoj proizvodnji.

Sterilizacija pomoću mikrovalne pećnice pokazala se kao privlačna alternativa konvencionalnom načinu sterilizacije hranjive podloge pomoću autoklava. Prednost korištenja mikrovalne pećnice za sterilizaciju hranjive podloge jest u tome što je mikrovalna pećnica jeftina, jednostavna za upotrebu, sterilni medij se postiže u mnogo kraćem vremenu nego autoklaviranjem. Sterilizacija hranjive podloge za kulturu biljnog tkiva u mikrovalnoj pećnici je učinkovita i netoksična.

Prema rezultatima ovog istraživanja vidljivo je da se mikrovalna pećnica može uspješno koristiti kao metoda sterilizacije hranjive podloge za kulturu biljnog tkiva:

- nije bilo velikog odstupanja u postotku steriliziranosti hranjive podloge između svih ispitivanih vremenskih intervala,
- dodatkom 400 mL destilirane vode u staklenu laboratorijsku čašu smanjio se gubitak hranjive podloge procesom isparavanja.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Arditti, J. (2008.): Micropropagation of orchid. Blackwell publishing, UK 2 (1): 106-107.
2. Bhowmik, G. (2011.): Introduction to the Laboratory. U: Analytical techniques in biotechnology. Bhowmik, G. („ur.“), Tata McGraw-Hill Education, New Delhi, 27–28.
3. Bilbrough, J. (1969.): Food sterilization by microwave radiation. Non-Ionizing Radiation. 2:70-72.
4. Boxus, P. (1974.): The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. Journal of Horticulture Science, 49: 209-210.
5. Boye, M., Van den Berg, C. M. G., (2000.): Iron availability and the release of iron-complexing ligands by *Emiliania huxleyi*. Mar. Chem., 70:277–87.
6. Burger, D. W. (1988.): Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. HortScience, 23: 1066-1068.
7. Buter, B., Pescitelli, S. M., Berger, K., Schmid, J. E., Stamp, P. (1993.): Autoclaved and filter sterilized liquid media in maize anther culture: significance of activated charcoal. Plant Cell Reports, (13): 79-82.
8. Culkin, K. A., Fung D. Y. C. (1975.): Destruction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in Microwave-cooked Soups. Journal of Milk and Food Technology, 38(1): 8-15.
9. Debergh, P. C. (1983.): Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiologia Plantarum, 59 (2): 270-276.
10. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968.): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
11. Gamborg, O. L., Phillips, G. C. (1995.): Media preparation and handling. U: Plant Cell, Tissue and Organ Culture - Fundamental Methods. Gamborg, O. L., G. C. Phillips („ur.“), Springer-Verlag, Berlin, 21-34.
12. Gautheret, R.J. (1983.): Plant tissue culture: A history. Bot. Mag. 96: 393–410.
13. George, E. F., Hall, M. A., De Klerk G.J (2008.): Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, Springer Science & Business Media, New York, 65–113, 115–173.
14. Jelaska, S., (1994.): Kultura biljnih stanica i tkiva, Školska knjiga, Zagreb, 398.

15. Jeng, D. K. H., Kaczmarek, K. A., Woodworth, A. G., Balasky, G. (1987.): Mechanism of microwave sterilization in the dry state. Applied Environmental Microbiology, 53:2133–2137.
16. Kawachi, M., Noël, M. (2005.): Sterilization and Sterile Technique. U: Algal Culturing Techniques. Andersen, R. A. („ur.“), Elsevier Academic Press, UK, 65 – 83.
17. 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): 279-283.
18. Latimer, J. M., Matsen, J. M. (1977.): Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *Journal Clinical Microbiology*, 6: 340-342.
19. Linsmaier, E. M., Skoog, F. (1965.): Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plant*, 18: 100-127.
20. Markoska-Petrovska, O., Scheele, J., Roeleveld, J. (2003.): Application of micropropagation technique in breeding of seasonal and evergreen flowers with examples from SBW international BV tissue culture laboratory. *Agronomski glasnik*. 3-5: 207 - 226.
21. Marlow, S. A., Muir, H. J. (1986.): Microwave sterilization of growth media for orchid culture. *Orchid Review*, 94: 335-336.
22. Murashige, T., Skoog, F. (1962.): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plant*, 15: 473-497.
23. Pan, M. J., Staden, J. (1999.): Effect of activated charcoal autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. *Plant Growth Regulation*, (29):135-141.
24. Patterson, M. K., Bulard R. (1980.): Microwave fixation of cells in tissue culture. *Stain Technology*, 55:71-75.
25. Patterson, M. K., Bulard R. (1981): Fixation of cells in tissue culture by microwave irradiation. *J. Tissue Culture Methods*, 6:1-3.
26. Perkins, J.J. (1969): Laboratory and industrial sterilizers. U: Principles and methods of sterilization in health sciences. Perkins, J.J. („ur.“), Thomas, Springfield III., 465-482.
27. Pierik, R. L. M. (1997.): *In vitro Culture of Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 311.

28. Prakash, S., Hoque, M.I., Brinks, T. (2002.): Culture media and containers. U: Low cost options for tissue culture technology in developing countries, Proceedings of a Technical Meeting, IAEA, Austria, 29-41.
29. Rao P.N, S. (2008.): Sterilization and Disinfection. JJM Medical College, Davangere, dept. of microbiology
30. Sasaki, K., Honda, W., Ohsawa, S., Miyake, Y., Kawashima, Y. (1998.): A study of microwave sterilizer for injection ampoules (No.5): evaluation of sterilization effect on the head space of ampoules. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 58: 136-146.
31. Sasaki, K., Honda, W., Shimizu, K., Lizima, K., Ehara, T., Okuzawa K., Miyake Y. (1995.): Microwave continuous sterilization of injection ampoules. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 50: 172-179.
32. Sasaki, K., Mori, Y., Honda, W., Miyake, Y. (1998.) Selection of biological indicator for validating microwave heating sterilization. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*., 52: 60-65.
33. Sawyer, H., Hsiao, K. (1992.): Effects of autoclave-induced carbohydrate hydrolysis on the growth of *Beta vulgaris* cells in suspension. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, (31): 81-86.
34. Schenk, N., Hsiao, K., Bornman, C. H., (1991.): Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant tissue culture media. *Plant Cell Reports*, (10): 115-119.
35. Smith, S. G. (1986.): Using a microwave oven to sterilize agars. *Orchid Review*, 94: 334.
36. Spencers, R.C., Hafiz, C.C. (1985.): Effect of microwave energy on the metabolism of enterobacteriaceae. *Journal of Medical Microbiology*, 19: 269-272.
37. Tisserat, B., Jones, D., Galletta, P. D. (1992.): Microwave sterilization of plant tissue culture media. *Hortscience*, 27(4) 358-336.
38. Torres, K. C., (1989): *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*, Chapman and Hall, New York, London, 38-39.
39. Venturieri A., G., Venturieri A., R., Gisele L. (2013.): Sterilization of culture media for orchids using a microwave oven. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 49 (2): 137–144.
40. Vora, C., Jasrai, Y. T. (2012.): Microwave oven based sterilization of media for micro propagation of banana. *Cibtech Journal of Biotechnology*, 1 (2-3): 18-21.



41. Wang, X., Hsiao, K. (1995.): Sugar degradation during autoclaving: Effects of duration and solution volume on breakdown of glucose. *Physiologia Plantarum*, 94(3): 415-418.
42. 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*
43. Wood, N.J., Lundergan C.A. (1981): Microwave sterilization of tissue culture media *HortScience*, 16: 417 – 418.
44. Youssef, E. M. A., Amin, G. A. (2001.): Microwave sterilization of tissue culture media. *Acta Horticulture*, Tampere, Finland, 513-516.

## 8. SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj različitog vremenskog intervala (1 minuta, 3 minute, 4 minute, 5 minuta i 7 minuta) pri najvećem stupnju snage mikrovalne pećnice (800W) na sterilizaciju *in vitro* hranjive podloge. Podaci su zabilježeni nakon 7 te nakon 14 dana. Svaki ispitivani tretman sadržavao je 5 Erlenmeyer tikvica. Provedena su dva ispitivanja: sterilizacija 50 mL MS hranjive podloge koja se nalazila u Erlenmeyer tikvicama bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode te uz prisutnost staklene laboratorijske čaše (destilirane vode). Rezultati su pokazali da nije bilo velikog odstupanja u postotku steriliziranosti hranjive podloge između svih ispitivanih vremenskih intervala te da se dodatkom 400 mL destilirane vode u staklenu laboratorijsku čašu smanjio gubitak hranjive podloge procesom isparavanja. Najmanji postotak steriliziranosti zabilježen je pri vremenskom intervalu od 1 minute bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše s destiliranom vodom (40 % nakon 7 dan, 20 % nakon 14 dana). Najmanja razlika izgubljenih mL hranjive podloge isparavanjem sa i bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode zabilježena je pri sterilizaciji hranjive podloge u vremenskom intervalu od 4 minute (2 mL), dok je najveća razlika izgubljenih mL zabilježena pri tretmanu od 7 minuta (13 mL).

**Ključne riječi:** hranjiva podloga, sterilizacija, mikrovalna pećnica, vrijeme, isparavanje

## 9. SUMMARY

The aim of the study was to investigate the influence of different time intervals (1 minute, 3 minutes, 4 minutes, 5 minutes, and 7 minutes) at the highest degree of microwave power (800W) on sterilization of *in vitro* nutrient medium. Data were recorded after 7 and after 14 days. Each treatment tested contained 5 Erlenmeyer flasks. Two tests were performed: sterilization of 50 ml of MS nutrient medium contained in Erlenmeyer flasks without the presence of a laboratory glass containing 400 ml of distilled water and in the presence of a laboratory glass (distilled water). The results showed that there was no significant difference in the percentage of sterilization of the nutrient medium between all the time intervals tested and that the addition of 400 ml of distilled water reduced the nutrient loss by evaporation. The lowest percentage of sterilization was recorded at a time interval of 1 minute without the presence of a laboratory glass with distilled water (40 % after 7 days, 20 % after 14 days). The smallest difference of lost ml of nutrient medium by evaporation with and without the presence of a laboratory glass containing 400 ml of distilled water was observed during sterilization of the nutrient medium at treatment of 4 minute (2 m), while the largest difference of lost ml was observed at treatment of 7 minutes (13 m).

**Keywords:** nutrient medium, sterilization, microwave oven, time, evaporation

## **10. POPIS TABLICA**

|   |    |
|---|----|
| Tablica 1. Sastojci i količine sastojaka za pripremu hranjive podloge.....  | 10 |
| Tablica 2. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana.....    | 13 |
| Tablica 3. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge bez staklene laboratorijske čaše u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana.....   | 14 |
| Tablica 4. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 7 dana.....  | 15 |
| Tablica 5. Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju i ključanje hranjive podloge sa staklenom laboratorijskom čašom u mikrovalnoj pećnici nakon 14 dana..... | 15 |

## **11. POPIS GRAFIKONA**

Grafikon 1. Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 3 minute... 17

Grafikon 2. Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 4 minute... 18

Grafikon 3. Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 5 minuta... 19

Grafikon 4. Isparavanje hranjive podloge u mL pri vremenskom intervalu od 7 minuta... 20

## 12. POPIS SLIKA

|   |    |
|---|----|
| Slika 1. Korištena laboratorijska oprema .....  | 8  |
| Slika 2. Priprema hranjive podloge .....  | 9  |
| Slika 3. Pripremljena podloga u Erlenmeyer tikvicama .....  | 10 |
| Slika 4. Mikrovalna pećnica Samsung (model MG23F301TAK, Samsung Electronics) ...  | 11 |
| Slika 5. Erlenmeyer tikvice s hranjivom podlogom i 400 mL destilirane vode u staklenoj laboratorijskoj čaši.....              | 12 |
| Slika 6. Erlenmeyer tikvice s hranjivom podlogom u klima komori.....  | 12 |
| Slika 7. Kontaminacija hranjive podloge pri tretmanu od 1 minute zabilježena nakon 14 dana.....                               | 14 |
| Slika 8. Izgubljena hranjiva podloga isparavanjem bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše .....                          | 16 |
| Slika 9. Izgubljena hranjiva podloga isparavanjem bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše pri tretmanu od 3 minute.....  | 17 |
| Slika 10. Izgubljena hranjiva podloga isparavanjem bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše pri tretmanu od 4 minute..... | 18 |
| Slika 11. Izgubljena hranjiva podloga isparavanjem bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše pri tretmanu od 5 minuta..... | 19 |
| Slika 12. Izgubljena hranjiva podloga isparavanjem bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše pri tretmanu od 7 minuta..... | 20 |

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek  
Sveučilišni diplomski studij, smjer Povrćarstvo i cvjećarstvo

Diplomski rad

Utjecaj vremenskog intervala na sterilizaciju hranjive podloge u mikrovalnoj pećnici

Ružica Matić

## Sažetak:

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj različitog vremenskog intervala (1 minuta, 3 minute, 4 minute, 5 minuta i 7 minuta) pri najvećem stupnju snage mikrovalne pećnice (800W) na sterilizaciju *in vitro* hranjive podloge. Podaci su zabilježeni nakon 7 te nakon 14 dana. Svaki ispitivani tretman sadržavao je 5 Erlenmeyer tikvica. Provedena su dva ispitivanja: sterilizacija 50 mL MS hranjive podloge koja se nalazila u Erlenmeyer tikvicama bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode te uz prisutnost staklene laboratorijske čaše (destilirane vode). Rezultati su pokazali da nije bilo velikog odstupanja u postotku steriliziranosti hranjive podloge između svih ispitivanih vremenskih intervala te da se dodatkom 400 mL destilirane vode u staklenu laboratorijsku čašu smanjio gubitak hranjive podloge procesom isparavanja. Najmanji postotak steriliziranosti zabilježen je pri vremenskom intervalu od 1 minute bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše s destiliranom vodom (40% nakon 7 dan, 20% nakon 14 dana). Najmanja razlika izgubljenih mL hranjive podloge isparavanjem sa i bez prisutnosti staklene laboratorijske čaše u kojoj se nalazilo 400 mL destilirane vode zabilježena je pri sterilizaciji hranjive podloge u vremenskom intervalu od 4 minute (2 mL), dok je najveća razlika izgubljenih mL zabilježena pri tretmanu od 7 minuta (13 mL).

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

**Mentor:** dr.sc. Monika Tkalec Kojić

**Broj stranica:** 33

**Broj grafikona i slika:** 16

**Broj tablica:** 5

**Broj literaturnih navoda:** 44

**Broj priloga:** -

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** hranjiva podloga, sterilizacija, mikrovalna pećnica, vrijeme, isparavanje

**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 Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Agrobiotechnical Sciences**  
**University Graduate Studies, Vegetable and flower growing**

**Graduate thesis**

Influence of different time interval on medium sterilization in microwave oven

Ružica Matić

### **Summary:**

The aim of the study was to investigate the influence of different time intervals (1 minute, 3 minutes, 4 minutes, 5 minutes, and 7 minutes) at the highest degree of microwave power (800W) on sterilization of *in vitro* nutrient medium. Data were recorded after 7 and after 14 days. Each treatment tested contained 5 Erlenmeyer flasks. Two tests were performed: sterilization of 50 ml of MS nutrient medium contained in Erlenmeyer flasks without the presence of a laboratory glass containing 400 ml of distilled water and in the presence of a laboratory glass (distilled water). The results showed that there was no significant difference in the percentage of sterilization of the nutrient medium between all the time intervals tested and that the addition of 400 ml of distilled water reduced the nutrient loss by evaporation. The lowest percentage of sterilization was recorded at a time interval of 1 minute without the presence of a laboratory glass with distilled water (40% after 7 days, 20% after 14 days). The smallest difference of lost ml of nutrient medium by evaporation with and without the presence of a laboratory glass containing 400 ml of distilled water was observed during sterilization of the nutrient medium at treatment of 4 minute (2 m), while the largest difference of lost ml was observed at treatment of 7 minutes (13 m).

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek

**Mentor:** dr.sc. Monika Tkalec Kojić

**Number of pages:** 33

**Number of figures:** 16

**Number of tables:** 5

**Number of references:** 44

**Number of appendices:** -

**Original in:** Croatian

**Key words:** nutrient medium, sterilization, microwave oven, time, evaporation

**Thesis defended on date:**

### **Reviewers:**

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

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1