Krivulja rasta bakterije Lactobacillus plantarum B u mediju kontaminiranom s AFB1 i ZEA

Oreški, Leticija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:551487

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Leticija Oreški

6814/BT

KRIVULJA RASTA BAKTERIJE *Lactobacillus plantarum* B U MEDIJU KONTAMINIRANOM S AFB_1 I ZEA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: Prof. dr. sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Krivulja rasta bakterije *Lactobacillus plantarum* B u mediju kontaminiranom s AFB_1 i ZEA

Leticija Oreški, 6814/BT

Sažetak: Mnogi mikroorganizmi, uključujući bakterije mliječne kiseline, mogu ukloniti ili smanjiti količine mikotoksina u hrani i krmi, a pokazuju i sposobnost vezanja mikotoksina u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Budući da o utjecaju mikotoksina na broj i morfološke karakteristike stanica bakterija nema uopće ili ima vrlo malo podataka, svrha ovog rada bila je odrediti utjecaj aflatoksina B_1 (AFB_1) i zearalenona (ZEA) na morfološke karakteristike i preživljavanje bakterije *Lactobacillus plantarum* B tijekom 72 sata. Mikrobni rast se često prikazuje krivuljom rasta pa je u ovom radu ista dobivena neizravnom metodom određivanja živih stanica (brojanjem poraslih kolonija na krutoj hranjivoj podlozi), izražena kao log CFU/mL. Od morfoloških karakteristika određivana je veličina stanica, korištenjem metode mikrometrije, uporabom objektnog i okularnog mikrometra. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da oba mikotoksina imaju slab utjecaj na morfologiju i rast stanica bakterije *Lactobacillus plantarum* B.

Ključne riječi: aflatoksin B_1; krivulja rasta; *Lactobacillus plantarum*; morfološke karakteristike; zearalenon
Rad sadrži: 25 stranica, 9 slika, 0 tablica, 36 literaturnih navoda, 0 priloga
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Prof. dr. sc. Ksenija Markov
Pomoć pri izradi: Željko Jakopović, mag. ing.

Datum obrane: srpanj, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Growth curve of *Lactobacillus plantarum* B in medium contaminated with AFB_1 and ZEA

Leticija Oreški, 6814/BT

Abstract: Many microorganisms, including lactic acid bacteria, can remove or reduce the amount of mycotoxins in food and feed as well as bind mycotoxins *in vitro* and in vivo. Since there are no available data and data on the influence of mycotoxins on number and morphological characteristics is very limited, the aim of this study was to investigate the effect of aflatoxin B_1 (AFB_1) and zearalenone (ZEA) on morphological characteristics and survival of *Lactobacillus plantarum* B during 72 hours. Microbial growth is often indicated by the growth curve, and in this work it was obtained by an indirect method of determination of live cells (by counting the growing colonies on a solid nutrient medium), expressed as log CFU/mL. As morphological trait, size of cells was determined by using the micrometric method, using the object and ocular micrometers. From obtained results it can be concluded that both mycotoxins have poor effect on morphology of cells as well as on cell growth of *L. plantarum* B.

Keywords: aflatoxin B_1; growth curve*; Lactobacillus plantarum*; morphological characteristics; zearalenone
Thesis contains: 25 pages, 9 figures, 0 tables, 36 references, 0 supplements
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Ph.D. Ksenija Markov, Full professor
Technical support and assistance: Željko Jakopović, Research associate

Defence date: July, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD....1

2. TEORIJSKI DIO....2

2.1. MIKOTOKSINI....2

2.1.1. Aflatoksin B_1....3

2.1.2. Zearalenon....4

2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE....5

2.2.1. *Lactobacillus plantarum*....6

2.3. MIKROBNI RAST....7

2.3.1. Krivulja rasta bakterija....7

3. MATERIJALI I METODE....10

3.1. MATERIJALI....10

3.1.1. Mikroorganizam....10

3.1.2. Podloga za uzgoj mikroorganizma....10

3.1.3. Mikotoksini....11

3.1.4. Aparatura....11

3.1.5. Pribor....11

3.2. METODE RADA....11

3.2.1. Standard AFB_1 i ZEA....11

3.2.2. Priprema uzorka....12

3.2.3. Određivanje krivulje rasta....12

3.2.4. Mikrometrija....13

4. REZULTATI I RASPRAVA....15

4.1. Utjecaj mikotoksina na krivulju rasta *L. plantarum* B....15

4.2. Utjecaj mikotoksina na morfološke karakteristike stanica *L. plantarum* B....17

5. ZAKLJUČCI....21

6. LITERATURA....22

1. UVOD

Mikotoksini su sekundarni proizvodi metabolizma plijesni, koji često dospijevaju u organizam putem kontaminirane hrane, a zatim uzrokuju različite bolesti (HAH, 2013). Izvori mikotoksina u probavnom sustavu sisavaca, a tako i ljudi, su žitarice, proizvodi na bazi žitarica, ali i fermentirani mliječni proizvodi (Schnürer i Magnusson, 2005). Uzrok tome je kontaminacija usjeva mikotoksikogenim plijesnima ili njihovim metabolitima (mikotoksinima), ali i posljedica takozvanog „carry-over" efekta koji predstavlja prijenos tvari iz kontaminirane stočne hrane u hranu animalnog porijekla za ishranu ljudi, primjerice mlijeko, jaja i slično (Giovati i sur., 2015). S obzirom na to da su mnogi mikotoksini termostabilni, prilikom tehnološke obrade hrane ne dolazi do njihove razgradnje, već ostaju prisutni u procesiranim proizvodima, a u organizmu tijekom duljeg vremena i pri niskim koncentracijama predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje (Markov i sur., 2010; Muñoz i sur., 2010). Kako bi se smanjio rizik od neizbježne izloženosti mikotoksinima, poduzimaju se razne mjere s ciljem smanjenja kontaminacije na najmanju moguću mjeru. Iako su razvijene različite fizikalne i kemijske metode dekontaminacije, javlja se sve veći interes za razvojem efikasnijih, ekonomičnijih, sigurnijih te za okoliš prihvatljivijih metoda (Giovati i sur., 2015). U tu svrhu teži se razvoju bioloških metoda koje se provode pod blagim uvjetima (bez ekstremnih pH-vrijednosti i temperatura), bez uporabe štetnih kemikalija i bez gubitaka nutritivne vrijednosti proizvoda (Hassan i sur., 2015; Yang i sur., 2017). Poznato je da mikroorganizmi poput bakterija, kvasaca, plijesni, aktinomiceta i algi mogu ukloniti ili smanjiti količinu mikotoksina u hrani i krmivu (El-Nezami i sur., 1998; Markov i sur., 2010). Od toga su bakterije mliječne kiseline (BMK), posebice iz roda *Lactococcus* i *Lactobacillus* od značajne važnosti (Giovati i sur., 2015). Radi se o skupini probiotika koji imaju ulogu u zaštiti usjeva nakon žetve, a smatraju se GRAS (*eng.* Generally Recognized As Safe) mikroorganizmima pa je dozvoljena njihova široka primjena u industriji hrane i krmiva s ciljem biološke kontrole proizvodnje mikotoksina. Osim što pružaju zaštitu kod skladištenja, dokazani su i dodatni pozitivni učinci bakterija mliječne kiseline na probavni trakt potrošača (Giovati i sur., 2015), a od davnina se koriste u proizvodnji i očuvanju fermentiranih proizvoda pa su dosad prihvaćene kao bezopasne za ljudsko zdravlje. Prirodno su prisutne u različitoj hrani s ciljem produžavanja trajnosti proizvoda (Markov i sur., 2010). S obzirom na to da na mikrobni rast i razmnožavanje te smrt stanica utječe velik broj različitih čimbenika (fizikalnih i kemijskih) (Duraković, 1991), u ovom je radu istražen utjecaj aflatoksina B_1 i zearalenona na rast i morfološke karakteristike bakterije *Lactobacillus plantarum* B tijekom 72 sata uzgoja u laboratorijskim uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKOTOKSINI

Do danas je otkriveno oko četiristo vrsta mikotoksina, od čega su najznačajniji kontaminanti hrane aflatoksini (aflatoksin B_1, aflatoksin M_1), okratoksini (okratoksin A, okratoksin B), zearalenon (ZEA), fumonizini (fumonizin B_1, fumonizin B_2), trihoteceni (T-2 toksin) i patulin (PAT) (HAH, 2013; Hassan i sur., 2015; Varsha i Napoothiri, 2016). Sintetiziraju se tijekom rasta plijesni na supstratima biljnog i životinjskog porijekla, pa su tako glavni izvor mikotoksina kod ljudi, žitarice i njihovi proizvodi, mlijeko i mliječni proizvodi, meso, voće, orašasti plodovi, vino, pivo, kava i drugi (HAH, 2013). Kontaminacija usjeva mikotoksinima moguća je prilikom uzgoja, žetve, transporta, ali i procesiranja te skladištenja istih (Pepeljnjak i sur., 2008; Jebali i sur., 2015; Yang i sur., 2017).

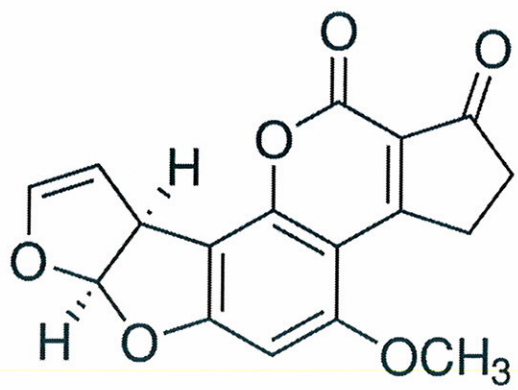
Mikotoksini predstavljaju skupinu stabilnih kemijskih spojeva različite strukture i različitog biološkog djelovanja (Markov i sur., 2010; HAH, 2013), a neke plijesni imaju sposobnost sinteze više od jednog mikotoksina, i obratno, neki mikotoksini su proizvodi više različitih vrsta plijesni (Duraković, 1991). Većina ih je termostabilna pa se termička obrada hrane rijetko koristi kao metoda dekontaminacije (Pepeljnjak i sur., 2008). Osim toga, važni su onečišćivači okoliša čija se sinteza odvija na zrnju, orasima i sličnom materijalu biljnog porijekla, a gutanjem, udisanjem ili dodirom malih količina mikotoksina mogu izazvati po domaćina opasne bolesti koje nazivamo mikotoksikozama (Duraković i Duraković, 2003). Posebno su opasni zbog visoke toksičnosti u malim količinama i odsutnosti bilo kakvog senzorskog upozorenja pri konzumaciji hrane koja sadrži mikotoksine (Markov i sur., 2010; Markov i sur., 2013). Veće doze mikotoksina uzrokuju akutna trovanja, dok dugotrajni unos manjih količina rezultira estrogenim, imunosupresivnim ili karcinogenim učincima (Pepeljnjak i sur., 2008).

Prisutnost mikotoksikogenih plijesni i/ili mikotoksina u hrani predstavlja značajnu opasnost za zdravlje ljudi, ali i veliki ekonomski problem (Čvek i sur., 2012) zbog utjecaja na kvalitetu proizvoda, ali i ekonomičnost procesa proizvodnje (Šutić i Banina, 1979). Posljedica su i povećani troškovi u područjima zdravstva i veterine, troškovi zbrinjavanja kontaminiranih namirnica i stočne hrane te troškovi istraživanja s ciljem smanjenja prisutnosti mikotoksina (Duraković, 1991).

2.1.1. Aflatoksin B_1

Aflatoksini su toksični, karcinogeni, imunosupresivni sekundarni metaboliti koje sintetiziraju plijesni roda *Aspergillus*, prvenstveno *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*, ali i ograničen broj sojeva plijesni rodova *Penicillium* i *Fusarium* (Dalié i sur., 2010; Varsha i Napoothiri, 2016). Općenito su najtoksičnija skupina mikotoksina primarno zbog svog hepatotoksičnog djelovanja, a pokazuju i teratogeno djelovanje pa su, ovisno o primijenjenoj koncentraciji, opasni za zdravlje ljudi i životinja (Dalié i sur., 2010; Muñoz i sur., 2010). Danas je poznato da je minimalno 13 različitih vrsta aflatoksina prisutno u prirodi (HMDB, 2017). Radi se o skupini kemijski srodnih spojeva, od kojih su najvažniji predstavnici aflatoksini B_1, B_2, G_1, G_2, M_1 i M_2. Oznake B i G označavaju boju (B – *eng.* blue, plavo; G – *eng.* green, zeleno) kojom aflatoksini fluoresciraju pri određenoj valnoj duljini UV-svjetlosti, a M prema supstratu iz kojeg su izolirani (M – *eng.* milk, mlijeko).

Aflatoksin B_1 izoliran je iz plijesni *Aspergillus flavus* 1962. godine kada se pojavila X-bolest pernatih životinja u Engleskoj (HAH, 2013; Pleadin i sur., 2014). Od svih nama poznatih aflatoksina, najčešće prisutan je AFB_1, a pritom je i najtoksičniji (Sezer i sur., 2013; Giovati i sur., 2015). Nedavno je dokazano i njegovo genotoksično djelovanje (Varsha i Napoothiri, 2016). LD_{50} za štakore (oralna primjena) iznosi 2.71 mg/kg, a za miševe (također oralna primjena) 9 mg/kg (Anonymous 1, 2013). Dokazano je da AFB_1 zaustavlja rast nekih bakterija mliječne kiseline, pri čemu zona inhibicije rasta ovisi o koncentraciji aflatoksina i vrsti bakterija. Osim toga djeluje i na morfologiju bakterijskih stanica, pri čemu kod štapićastih BMK dolazi do promjene u širini, a kod okruglih BMK do promjene broja stanica u lancu, ovisno o primijenjenoj koncentraciji, duljini vremena djelovanja, ali i vrsti, odnosno soju BMK (Šutić i sur., 1983).

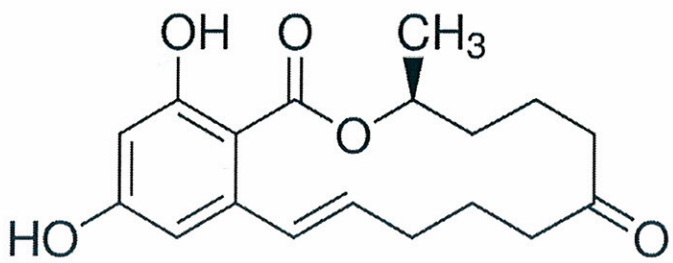


Slika 1. Kemijska struktura aflatoksina B_1 (NCBI, 2007)

Uvjeti pogodni za rast i razvoj mikotoksikogenih plijesni su visoka vlažnost (najmanje 7%), visoka temperatura (28-32 °C) (HMDB, 2017), a važni faktori su i geografsko područje kao i općeniti klimatski uvjeti na određenom području (Duraković, 2003; Markov i sur., 2010). Usjevi koji su česta meta ovih plijesni uključuju žitarice (kukuruz, riža, pšenica), uljarice (kukuruz, pamuk, soja, suncokret), začine (đumbir, kurkuma, čili papričica) te orašaste plodove (badem, orah, kokos) (HMDB, 2017). Aflatoksini mogu biti prisutni i u namirnicama životinjskog porijekla (mlijeko i meso), ako je hrana za životinje prethodno bila onečišćena plijesnima ili mikotoksinima (Markov i sur., 2010; Pleadin i sur., 2014).

2.1.2. Zearalenon

Zearalenon je svrstan u skupinu nesteroidnih estrogenih mikotoksina, kojeg sintetiziraju plijesni iz roda *Fusarium* (Pepeljnjak i sur., 2008; Yang i sur., 2017). Često se naziva fitoestrogenom, a uz *F. graminearum*, najčešći producenti ZEA su i *F. roseum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. oxysporum* i *F. tricinctum* (Minervini i Dell' Aquila, 2008; Čvek i sur., 2012; Hueza i sur., 2014). Djelovanje zearalenona na domaće životinje je uterotropno, estrogeno i anaboličko, a vezanjem za estrogene receptore dovodi do neravnoteže spolnih hormona u ljudi. Sličan je estradiolu (estrogenom hormonu kojeg luče jajnici sisavaca) pa se kompetitivno veže za estrogene receptore. Genotoksičan je i imunotoksičan za humane T-limfocite u velikim koncentracijama, a u djece uzrokuje preuranjeni pubertet (Pepeljnjak i sur., 2008). Osim što u manjoj mjeri uzrokuje hiperestrogeni sindrom u ljudi, utječe i na poremećaje u reprodukciji životinja na farmama (Yang i sur., 2017). Slabije je toksičan za miševe, štakore i zamorce (nakon oralne aplikacije) (Pepeljnjak i sur., 2008).



Slika 2. Kemijska struktura zearalenona (NCBI, 2007)

Otkriće zearalenona dogodilo se s pojavom reproduktivnog poremećaja u svinja, tzv. vulvovaginitisa (Yazar i Omurtag, 2008). U probavnom sustavu se reducira u zearalenol koji ima do 4 puta jači estrogeni efekt (Pepeljnjak i sur., 2008). Utvrđena je maksimalna dozvoljena koncentracija (MDK) za ljude i iznosi 50 µg/kg za određene procesirane, odnosno 200 µg/kg za određene neprocesirane proizvode na bazi kukuruza (Hueza i sur., 2014). LD_{50} za štakore iznosi 16 mg/kg (Anonymous 2, 2013).

Zearalenon je glavni onečišćivač kukuruza, ali se može naći i u zobi, ječmu i pšenici (Minervini i Dell' Aquila, 2008; Yazar i Omurtag, 2008; Čvek i sur., 2012). Kontaminacija ZEA moguća je prije i poslije žetve. Kako se radi o stabilnom kemijskom spoju, nije podložan razgradnji prilikom skladištenja, a ni za vrijeme tehnološke obrade namirnica (Čvek i sur., 2012; Hueza i sur., 2014). Brojni faktori utječu na rast plijesni producenta ZEA, poput temperature, vlažnosti, vrste supstrata i vrste plijesni (Čvek i sur., 2012). Od navedenog, biosintezi pogoduje visoka vlažnost, ali niska temperatura (za razliku od aflatoksina). Zbog utjecaja koji ima na hormonsku ravnotežu, ZEA se u određenim zemljama koristi kao hormon rasta. Tako je njegova primjena dozvoljena u SAD-u, a zabranjena u državama Europske Unije (Yazar i Omurtag, 2008).

2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline predstavljaju skupinu gram-pozitivnih, nesporogenih bakterija, koje povezuju slična metabolička i fiziološka svojstva. Skupina su bakterija koje kao glavni proizvod fermentacije ugljikohidrata daju mliječnu kiselinu. S obzirom na konačni produkt fermentacije, BMK dijelimo na homofermentativne i heterofermentativne. U homofermentativnih kao jedini konačni produkt mliječno-kisele fermentacije nastaje mliječna kiselina i tu ubrajamo bakterije iz rodova *Streptococcus*, *Pediococcus* i različite vrste roda *Lactobacillus*. U heterofermentativnih osim mliječne kiseline nastaju i neki drugi proizvodi, poput etanola i CO_2, a u njih ubrajamo bakterije iz roda *Leuconostoc* i neke vrste roda *Lactobacillus* (Duraković, 1991; Frece i Markov, 2016).

BMK se općenito koriste kao starter kulture u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda, a osim toga imaju i ulogu u smanjenju količine određenih mikotoksina prisutnih u hrani i krmivu. Provedena su mnoga istraživanja koja potvrđuju vezanje aflatoksina pomoću BMK (Haskard i sur., 2001; Markov i sur., 2010). Kako bi se produljila trajnost proizvoda, BMK se u obliku čistih kultura dodaju i u razne prehrambene proizvode i krmivo kao

biokonzervansi. Imaju sposobnost biosinteze širokog spektra antimikrobnih metabolita, koji u konačnici inhibiraju rast mikotoksikogenih plijesni (Schnürer i Magnusson, 2005; Muñoz i sur., 2010; Varsha i Napoothiri, 2016). Na količinu sintetiziranih antifungalnih metabolita značajno utječe rast biomase, koji je uvjetovan temperaturom i vremenom inkubacije (Muñoz i sur., 2010). Osim toga, BMK proizvode velike količine organskih kiselina i sudjeluju u kompeticiji za hranjivim tvarima (Dalié i sur., 2010; Muñoz i sur., 2010; Varsha i Napoothiri, 2016), a novija istraživanja ukazuju i na sposobnost adhezije mikotoksina za površinu stanične stijenke bakterija mliječne kiseline, (Muñoz i sur., 2010; Hassan i sur., 2015) ili čak sposobnost degradacije mikotoksina (Sezer i sur., 2013; Hassan i sur., 2015). Uz to imaju i blagotvoran (probiotički) učinak na crijevnu mikrofloru potrošača (ljudi i životinja), a u prehrani ljudi su prirodno prisutne od davnina te se stoga smatraju bezopasnima za zdravlje. Dodijeljen im je GRAS (Generally Recognized As Safe) status (Schnürer i Magnusson, 2005; Muñoz i sur., 2010; Hassan i sur., 2015).

Mnoge bakterije mliječne kiseline inhibiraju rast plijesni, a neke od njih imaju i potencijal interakcije s mikotoksinima. Stoga se primjenjuju kao alternativa fizikalnim i kemijskim metodama kontrole rasta plijesni. BMK koje posjeduju antifungalna svojstva prema mikotoksikogenim plijesnima obuhvaćaju rodove *Lactococcus* i *Lactobacillus*, a u manjoj mjeri i rodove *Pediococcus* te *Leuconostoc* (Dalié i sur., 2010). Posljednjih par desetljeća dolazi do intenzivnog razvoja metoda biološke dekontaminacije mikotoksikogenih plijesni s naglaskom na primjenu bakterija mliječne kiseline, koje su sposobne vezati i uklanjati mikotoksine iz hrane i iz krmiva (Čvek i sur., 2012).

2.2.1. *Lactobacillus plantarum*

Bakterije roda *Lactobacillus* i *Lactococcus* se najčešće koriste s ciljem inhibicije rasta plijesni i sinteze određenih mikotoksina (Giovati i sur., 2015). Laktobacili su gram-pozitivne bakterije mliječne kiseline koje su štapićastog oblika i tvore lance (Duraković, 1991; Frece i Markov, 2016). Osim što se kao starter kulture koriste u proizvodnji fermentirane hrane, dodaju se i kao biokonzervans, s ciljem produljenja trajnosti proizvoda (Markov i sur., 2010; Frece i Markov, 2016). Dokazana je i njihova učinkovitost u liječenju sindroma iritabilnog crijeva (IBS – Irritable Bowel Syndrome) (Ducrotté i sur., 2012). Pozitivno djeluju na zdravlje domaćina zahvaljujući antimikrobnom efektu koji ispoljavaju prema patogenim

mikroorganizmima, pomažu u metabolizmu mliječnog šećera (laktoze), potiču imunološki sustav, utječu na snižavanje koncentracije kolesterola u krvi, a imaju i antikancerogeno djelovanje (Šušković i Kos, 2001). Općenito je dobro poznata morfološka promjenjivost ovih, a i drugih bakterija mliječne kiseline, u zavisnosti o ekološkim čimbenicima ili različitim drugim agensima koji mogu biti prisutni u mlijeku (Šutić i Banina, 1979).

2.3. MIKROBNI RAST

Rast bakterijskih stanica podrazumijeva njihovo povećanje, prije nego što se u populaciji poveća broj pojedinačnih stanica. Razmnožavanje u bakterija odvija se različitim mehanizmima, primjerice filamentima (aktinomicete), konidiosporama (streptomicete) i pupanjem (npr. *Caulobacter*). Najveći broj bakterija se ipak razmnožava binarnom diobom (cijepanjem), gdje se od jednog roditelja stvaraju dvije stanice kćeri.

Vrijeme nužno za udvostručenje broja stanica u populaciji naziva se vrijeme udvostručenja, ili generacijsko vrijeme (g). U pravilu je ono konstantno za pojedini mikroorganizam, ako se u međuvremenu ne promijene fizikalni i kemijski uvjeti okoline. Bakterija *Escherichia coli* tako ima generacijsko vrijeme nešto ispod 30 minuta, ako se uzgaja u optimalnim uvjetima rasta u laboratoriju. U probavnom traktu, gdje su uvjeti daleko od optimalnih, generacijsko vrijeme *E. coli* može iznositi i do 12 sati (Duraković, 1991). Generacijsko vrijeme bakterije *Lactobacillus plantarum* (u laboratorijskim uvjetima) iznosi 2.85 sati ako raste na glukozi te 4.75 sati ako raste na laktozi (Sedewitz i sur., 1984). Duljina generacijskog vremena daje mnoge korisne informacije, primjerice kratko generacijsko vrijeme upućuje na brz nastanak kolonija mikroorganizma, u periodu kraćem od jednog dana od trenutka nacjepljivanja na hranjivu podlogu. Ipak, većina mikrobnog rasta je prirodno limitirana, odnosno unatoč sposobnosti razmnožavanja mikroorganizama, mikroorganizmi ne proizvode beskonačnu masu stanica (Duraković, 1991).

2.3.1. Krivulja rasta bakterija

Nakon nacjepljivanja bakterija na hranjivu podlogu, njihov rast i razmnožavanje slijede tipičnu krivulju koju nazivamo krivuljom rasta bakterija, kakva je prikazana na slici 3. Krivulja rasta je različita za određenu vrstu bakterija i mijenja se ovisno o tipu hranjive podloge koja je upotrijebljena prilikom uzgoja mikroorganizma. Ona prikazuje odnos broja

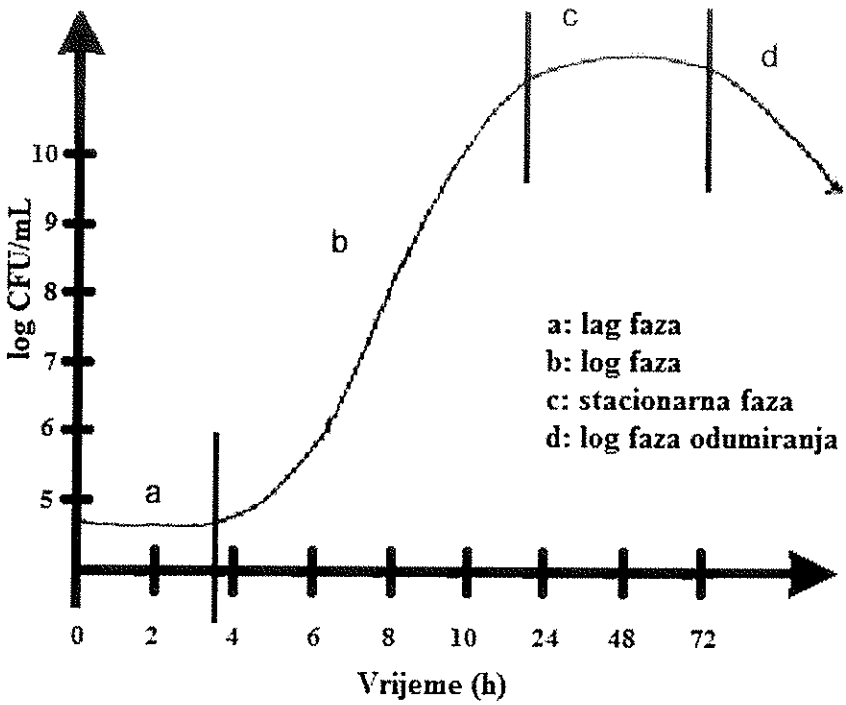
živih stanica i vremena te se dijeli na 4 faze rasta (lag-fazu rasta, log-fazu, stacionarnu fazu rasta te konačno, logaritamsku fazu odumiranja).

Lag-faza (eng. lag=zaostajanje), koja se naziva još i fazom suzdržanog rasta, okarakterizirana je kao prijelazno razdoblje u kojem se bakterije prilagođavaju na nove uvjete okoline. Dolazi do sinteze važnih enzima, obujam stanica raste, no broj stanica se ne povećava. U ovoj su fazi stanice pojačano osjetljive na visoku temperaturu te na različite kemijske agense koji su toksični. Duljina ove faze ovisi o tome jesu li stanice bile normalne ili oštećene prilikom nacjepljivanja, kakva je bila prethodna okolina u kojoj su rasle te koja je bila koncentracija stanica u inokulumu (Duraković, 1991).

U logaritamskoj fazi rasta, koju još nazivamo i eksponencijalnom, dioba stanica je ubrzana, odnosno broj stanica se povećava geometrijskom progresijom. Na osnovu promjene u broju stanica i vremena uzgoja lako se može izračunati generacijsko vrijeme (g), odnosno prosječno vrijeme potrebno za dijeljenje stanica.

Kako se tijekom rasta hranjive tvari troše, a otpadni produkti metabolizma nagomilavaju, u određenom trenutku brzina rasta bakterijske kulture se počinje smanjivati. U tom trenutku započinje stacionarna faza rasta, u kojoj su rast i ugibanje stanica u ravnoteži (ne dolazi do promjene ukupnog broja stanica). Odlika ove faze je biosinteza komercijalno važnih metabolita, poput enzima i antibiotika.

Posljednja nastupa logaritamska faza odumiranja, u kojoj se broj živih stanica smanjuje geometrijskom progresijom koja je obrnuta onoj u log-fazi rasta. Određene stanice mogu još neko vrijeme opstati u ovoj fazi, ali u nekom trenutku (nakon određenog vremenskog perioda poput dana, tjedna ili nekoliko mjeseci) dolazi do nestajanja mikroorganizama. Česti uzrok tome je sušenje hranjive podloge (Duraković, 1991).



Slika 3. Krivulja rasta bakterija (Anonymous 3, 2017)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizam

Kao test mikroorganizam za određivanje utjecaja AFB_1 i ZEA na preživljavanje i morfološke karakteristike, upotrijebljena je bakterijska kultura *Lactobacillus plantarum* B, dobivena iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Podloga za uzgoj mikroorganizma

Za uzgoj i određivanje broja živih bakterija u uzorcima je korišten MRS (Man-Rogosa-Sharpe) - bujon i agar (Biolife, Italija). Uzgoj bakterije *Lactobacillus plantarum* B proveden je u laboratorijskim uvjetima pri 37 °C tijekom 72 sata.

a) MRS (Man-Rogosa-Sharpe) – agar sastava: (g/L)

- pepton 10
- mesni ekstrakt 10
- kvaščev ekstrakt 5
- glukoza 20
- Tween 80 1
- $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ 0,1
- $MnSO_4 \times 7\ H_2O$ 0,05
- natrijev-acetat 5
- agar 20

- u destiliranoj vodi pH vrijednost podloge je 6,5
- sterilizacija pri 121 °C kroz 15 min

b) MRS (Man-Rogosa-Sharpe) – bujon

- istog je sastava kao podloga MRS-agar, samo bez dodanog agara i korištena je kao podloga za određivanje utjecaja AFB_1 i ZEA

3.1.3. Mikotoksini

Standardi mikotoksina:

- AFB_1 „Sigma" – St. Louis, MO, SAD
- ZEA „Sigma" – St. Louis, MO, SAD

3.1.4. Aparatura

- mikroskop
- brojač kolonija (BZG30) WTW-Weilheim
- termostat Sutjeska, Beograd
- vibromikser EV-102 (Tehtnica, Železniki)
- vaga analitička

3.1.5. Pribor

- Erlenmeyer tikvice 250 mL
- Petrijeve zdjelice ø 10 cm
- epruvete mikrobiološke 18 x 180 mm
- mikropipete 100 i 1000 µL JUSTOR 1100G
- okularni mikrometar
- objektni mikrometar

3.2. METODE RADA

3.2.1. Standard AFB_1 i ZEA

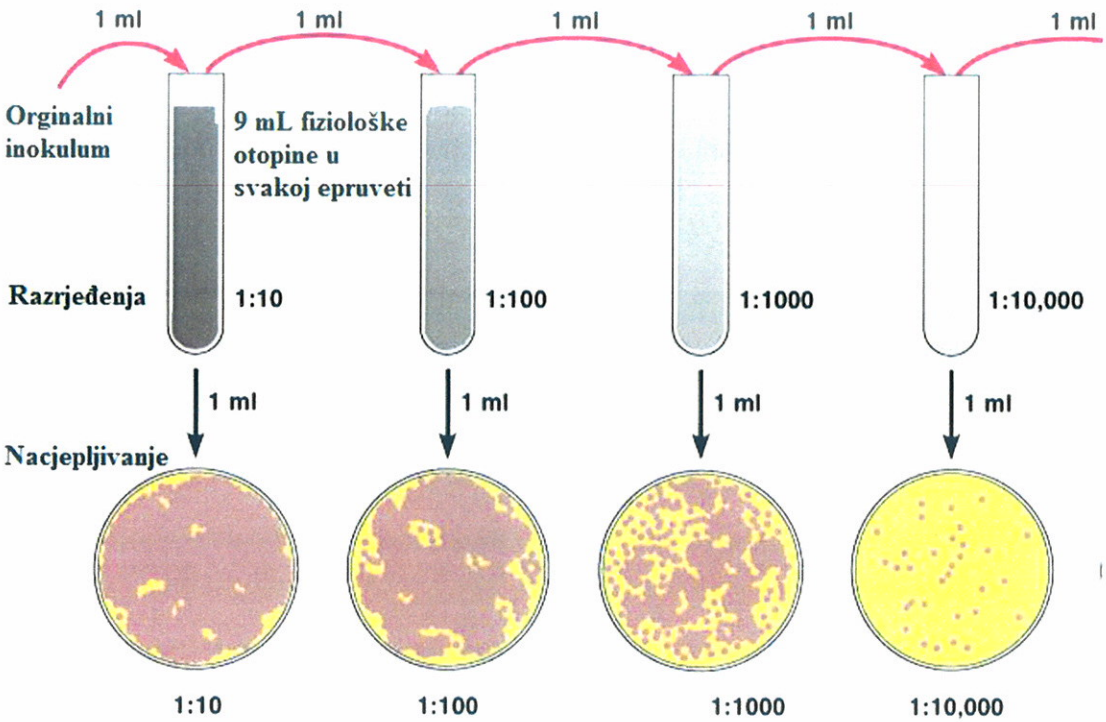
Stock otopine mikotoksina pripremljene su otapanjem kristaliničnog mikotoksina u etanolu do osnovne koncentracije od 2,5 mg/mL za AFB_1 i 10 mg/mL za ZEA i pohranjene na 4 °C do daljnjih analiza. Radne koncentracije odabranih mikotoksina upotrijebljenih u pokusima pripremljene su u mediju za rast BMK.

3.2.2. Priprema uzorka

Lactobacillus plantarum B čuvan je u MRS-bujonu pri 4 °C, u hladnjaku. Kulture su precijepljivane svakih 14 dana i inkubirane pri 37 °C te korištene za određivanje utjecaja AFB_1 i ZEA na preživljavanje i morfološke karakteristike bakterija u tekućoj podlozi. Nakon 24 sata inkubacije pri 37 °C, po 5 mL MRS bujona s nacijepljenom bakterijskom kulturom je dodano u pet Erlenmeyerovih tikvica s 30 mL MRS bujona. Jedna tikvica bila je kontrolna (samo bujon i bakterija), u drugu je dodana etanolna otopina AFB_1 do konačne koncentracije 20 µg/mL, u treću otopina AFB_1 do konačne koncentracije 10 µg/mL, u četvrtu otopina ZEA do konačne koncentracije 75 µg/mL, a u petu otopina ZEA do konačne koncentracije 50 µg/mL.

3.2.3. Određivanje krivulje rasta

U ovom radu je ispitan utjecaj mikotoksina (AFB_1 i ZEA) na krivulju rasta bakterije *Lactobacillus plantarum* B tijekom 72 sata. Prvih 10 sati, svaka 2 sata, a zatim nakon 24, 48 i 72 sata je načinjena serija decimalnih razrjeđenja i po 100 µL suspenzije je nacijepljeno na MRS agar u Petrijevim zdjelicama te stavljeno na inkubaciju 48 sata na 37 °C. Svi pokusi su provedeni u paraleli. Nakon 48 sati inkubacije, u kontrolnom uzorku i u uzorcima s dodanim AFB_1 i ZEA prebrojane su porasle kolonije uz pomoć brojača kolonija te je određen broj živih bakterija izražen kao log CFU/mL. Kod praćenja rasta mikroorganizama korištena je metoda neizravnog (posrednog) određivanja broj živih mikrobnih stanica (slika 4).



Slika 4. Priprema decimalnih razrjeđenja (Anonymous 4, 2017)

3.2.4. Mikrometrija

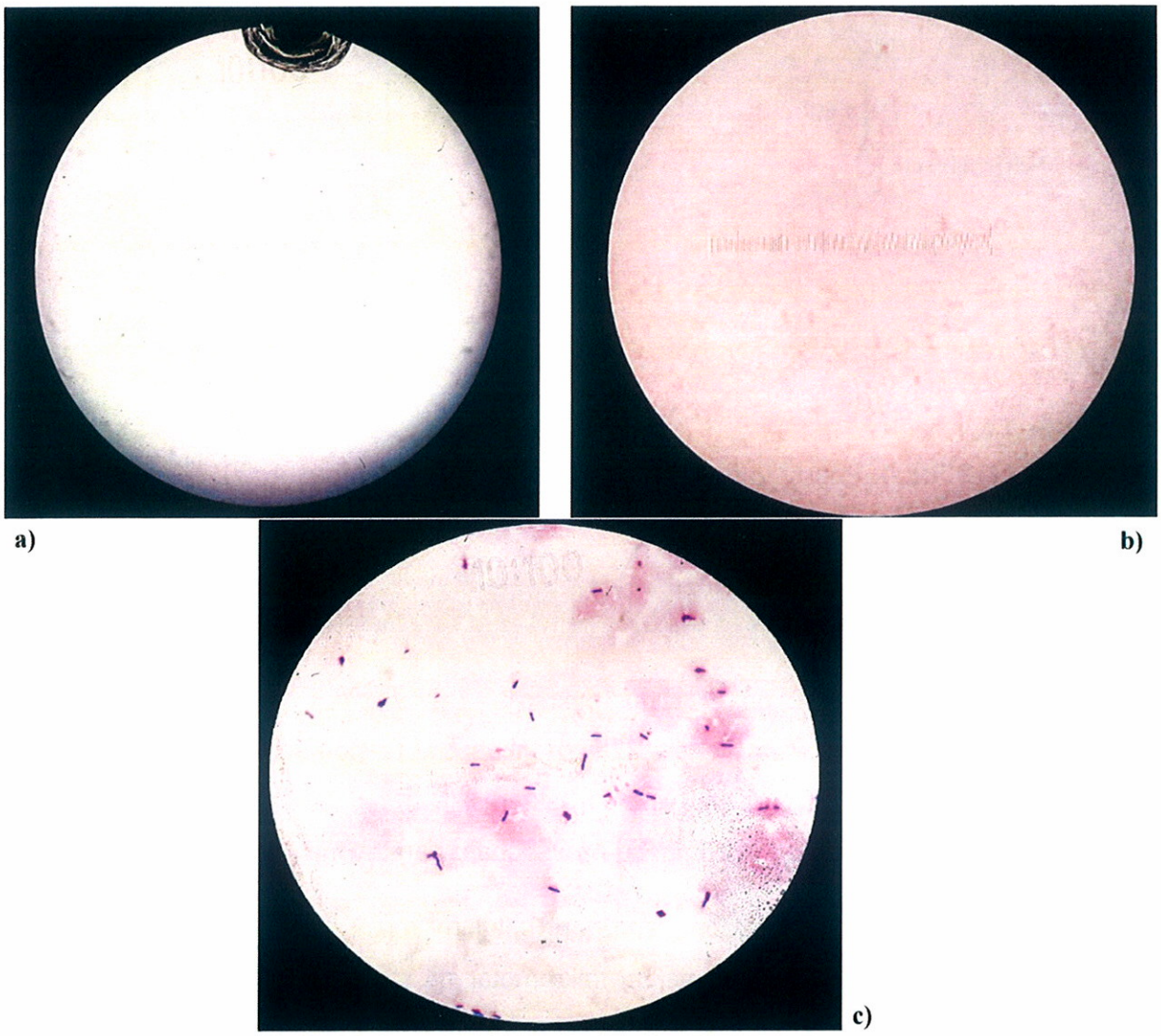
Utjecaj AFB_1 i ZEA na veličinu bakterije *Lactobacillus plantarum* B obojenu metilenskim modrilom je praćen tijekom 72 sata inkubacije uz pomoć okularnog i objektnog mikrometra. Tijekom prvih deset sati veličina bakterijskih stanica se mjerila svaka 2 sata, a zatim nakon 24., 48. i 72. sata. Mjerenja su provedena u paralelama po 50 stanica.

Prije mjerenja bilo je potrebno izbaždariti okularni mikrometar. Okularni mikrometar se stavlja u okular mikroskopa, a objektni mikrometar na stolić mikroskopa. Baždarenje se provodi pod povećanjem od 1000x uz upotrebu imerzijskog ulja, tako da se odredi broj podjeljaka objektne skale koji odgovara 100-tom podjeljku okularne skale. Razmak između dvaju podjeljaka na objektnoj skali je točno 10 µm. Faktor povećanja okularnog mikrometra dobije se tako da se broj podjeljaka objektne skale podjeli sa 100 podjeljaka okularne skale i pomnoži s 10. Za svaku kombinaciju mikroskopa i objektnog i okularnog mikrometra potrebno je provesti baždarenje.

Nakon što je provedeno baždarenje, na stolić mikroskopa se stavi pripremljeni preparat bakterija, a okularni mikrometar ostaje u okularu i izmjeri se koliko podjeljaka na

okularnoj skali zauzima mikroorganizam i pomnoži s faktorom povećanja te se tako dobije veličina određenog mikroorganizma.

Uzorci su mikroskopirani imerzijskim objektivom uz upotrebu imerzijskog ulja.



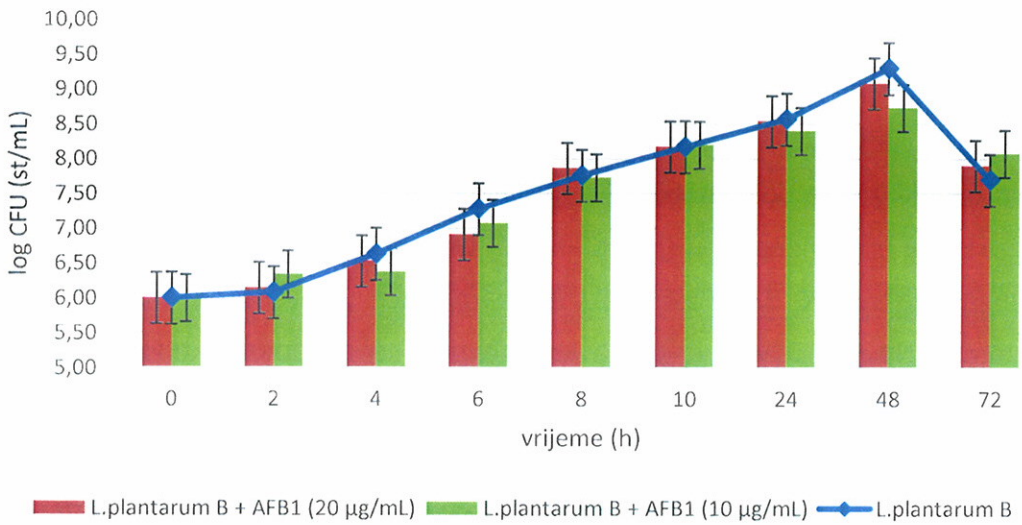
Slika 5. Prikaz a) okularnog mikrometra; b)objektnog mikrometra; c) mjerenje veličine stanice BMK (Vlastita slika)

4. REZULTATI I RASPRAVA

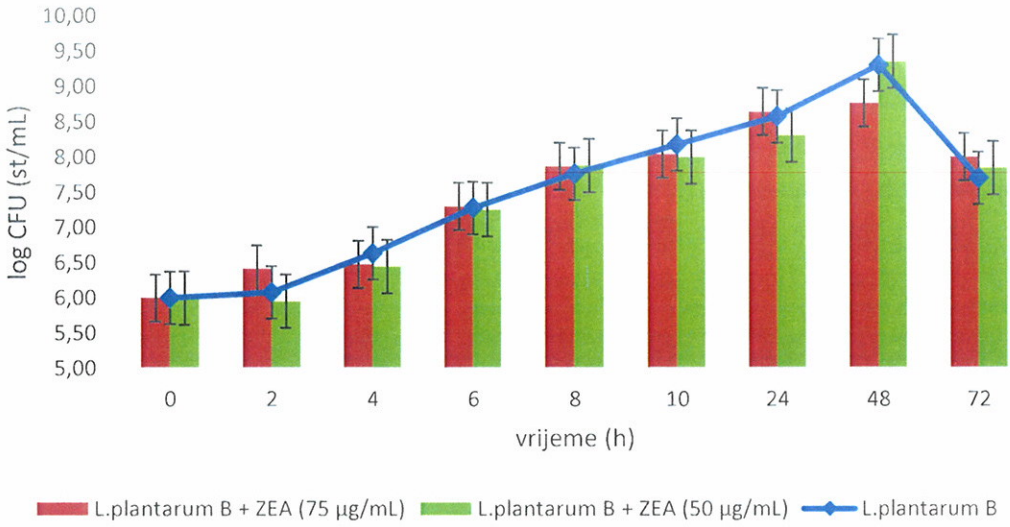
U ovom radu ispitivan je utjecaj mikotoksina AFB_1 i ZEA na preživljavanje i morfološke karakteristike bakterije *Lactobacillus plantarum* B tijekom 72 sata u tekućoj podlozi. Preživljavanje bakterija prikazano je u obliku krivulje rasta, a morfološke karakteristike praćene su mjerenjem veličine bakterija. Rezultati istraživanja prikazani su na slikama 6-9.

4.1. Utjecaj mikotoksina na krivulju rasta *L. plantarum* B

Neizravnim određivanjem broja živih stanica bakterija, brojenjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi (MRS) u Petrijevoj zdjelici, praćen je rast bakterije *Lactobacillus plantarum* tijekom 72 sata sa i bez dodanog AFB_1 i ZEA.



Slika 6. Krivulja rasta *Lactobacillus plantarum* B u prisutnosti i bez AFB_1 u koncentracijama od 20 µg/mL i 10 µg/mL pri 37 °C tijekom 72 sata uzgoja



Slika 7. Krivulja rasta *Lactobacillus plantarum* B u prisutnosti i bez ZEA u koncentracijama od 75 µg/mL i 50 µg/mL pri 37 °C tijekom 72 sata uzgoja

Dobiveni rezultati oblikuju krivulje rasta bakterija te se mogu jasno uočiti pojedine faze rasta (slika 6 i 7). U uzorcima bez dodanih toksina lag-faza, odnosno faza suzdržanog rasta trajala je 2 sata od trenutka nacjepljivanja bakterijske kulture na podlogu, nakon čega je uslijedila je eksponencijalna (logaritamska) faza rasta, koja je trajala do 48. sata uzgoja. Iz rezultata je vidljivo da je izostala stacionarna faza jer je nakon 48. sata nastupila faza odumiranja. Na slici 6 vidljivo je da krivulje rasta u prisutnosti koncentracija AFB_1 prate krivulju rasta bakterija u kontrolnom uzorku, osim u prisutnosti 10 µg/mL AFB_1, gdje je uočeno da je lag faza produžena do 4. sata.

Krivulja rasta uz 50 µg/mL ZEA prati krivulju rasta kontrolnog uzorka dok je pri 75 µg/mL ZEA lag faza trajala 4 sata, a uočena je i stacionarna faza koja je uslijedila nakon 24. sata i trajala do 48. sata, nakon čega nastupa faza odumiranja stanica.

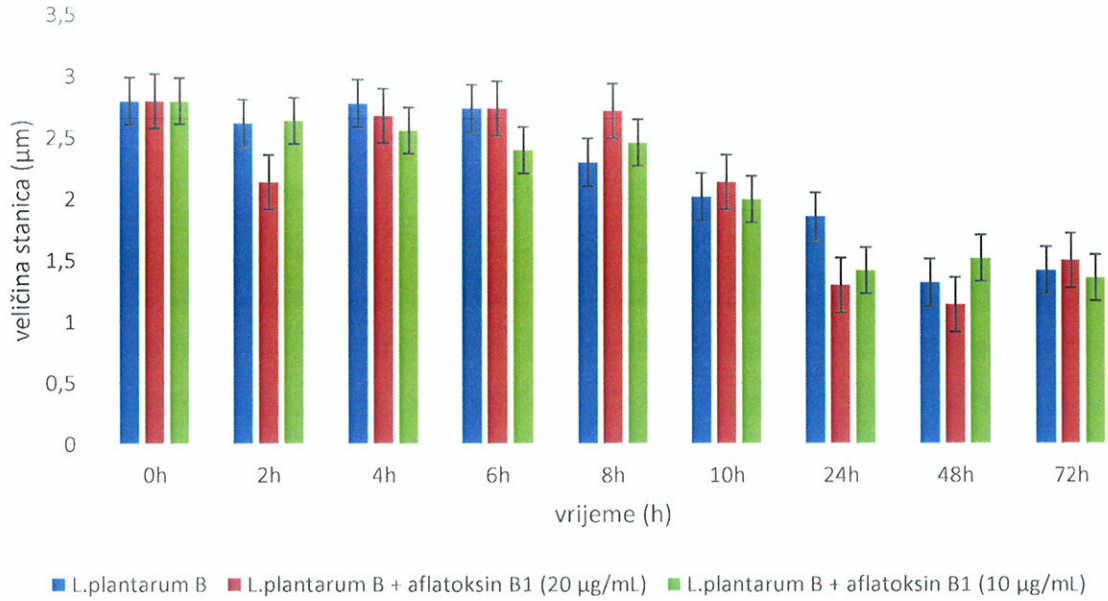
Najveći broj živih stanica postignut je u 48. satu u kontroli i iznosio je 9,30 log CFU/mL, odnosno 9,09 i 8,74 log CFU/mL, za uzorke s 20, odnosno 10 µg/mL dodanog AFB_1 (slika 6), što upućuje na zaključak da manja koncentracija toksina ima jače inhibitorno djelovanje. U pokusu sa dodanim ZEA, maksimalan broj stanica također je postignut u 48. satu i iznosio je 9,30 log CFU/mL, dok je pri koncentracijama ZEA od 75 odnosno 50 µg/mL taj broj nakon 48 sati iznosio 8,76 i 9,35 log CFU/mL. U ovom slučaju veća koncentracija toksina ima jače inhibitorno djelovanje na mikrobni rast (slika 7).

U fazi odumiranja broj živih stanica se smanjuje za 1,6 log jedinica u kontrolnom uzorku, za 1,19 i 0,66 log jedinica u uzorcima s 20 odnosno 10 μg/mL AFB_1 (slika 6), a u pokusima sa dodanim ZEA broj je za 0,76 i 1,5 log jedinica manji pri 75 odnosno 50 μg/mL (slika 7).

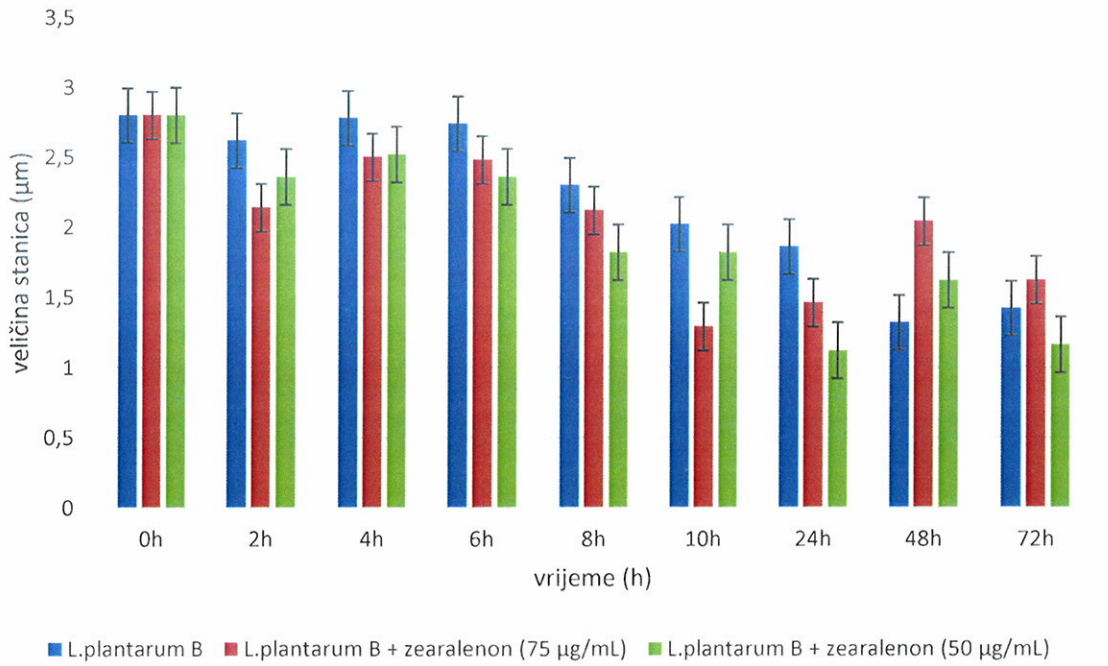
Prema dosadašnjim saznanjima proveden je malen broj istraživanja o utjecaju mikotoksina na bakterije mliječne kiseline. U ovom radu zamijećen je neznatan negativan učinak oba mikotoksina na preživljavanje bakterija *Lactobacillus plantarum* B, jer krivulja rasta bakterija uz dodatak bilo AFB_1 ili ZEA prati krivulju rasta u kontroli. Prisustvo mikotoksina u okolini u kojoj su bakterije rasle nije vidljivo utjecalo na pojedine faze rasta osim kod uzoraka uz 75 μg/mL ZEA, gdje je zabilježena i stacionarna faza rasta. Slične rezultate o utjecaju AFB_1 i ZEA, ali na stanice kvasca, dobili su neki autori (Engler i sur., 2000; Dziuba i sur., 2007; Foszczyńska i Dziuba, 2007) koji su dokazali da AFB_1 ne inhibira rast kvasca *Kluyveromyces marxianus*, dok ZEA ima slabi utjecaj na preživljavanje kvasaca iz roda *Saccharomyces*.

4.2. Utjecaj mikotoksina na morfološke karakteristike stanica *L. plantarum* B

U mikroskopskim preparatima kontrolnog uzorka i uzoraka s AFB_1 i ZEA vidljiva je promjena u veličini stanica u ovisnosti o vremenu kontakta između bakterije i mikotoksina. Pokusi su provedeni u paralelama tijekom 72 sata. Rezultati istraživanja su prikazani na slikama 8 i 9.



Slika 8. Utjecaj AFB_1 u koncentracijama 20 µg/mL i 10 µg/mL na veličinu *L. plantarum* B tijekom 72 sata



Slika 9. Utjecaj ZEA u koncentracijama 75 µg/mL i 50 µg/mL na veličinu *L. plantarum* B tijekom 72 sata

Određivanje veličine stanica bakterija provedeno je mikroskopiranjem, pod povećanjem od 1000x, uz imerzijsko ulje i uz upotrebu okularnog i objektnog mikrometra. Za svako je mjerenje nasumično odabrano po 50 stanica u uzorku, a rezultati su prikazani na slikama 8 i 9.

Iz rezultata prikazanih na slici 8 vidljivo je da AFB_1 utječe na veličinu stanica *L. plantarum* B iako nije jasno vidljiv trend kojim AFB_1 utječe na morfologiju stanica. S obzirom na to da postoji malo istraživanja o djelovanju mikotoksina na BMK, u nekim je prijašnjim istraživanjima dokazan utjecaj aflatoksina na morfološke, ali i fiziološke karakteristike ovih bakterija (Šutić i Banina, 1979). Isti autori navode da promjene stanica BMK ovise o primijenjenoj koncentraciji mikotoksina te duljini izlaganja, a takve su promjene uglavnom nepoželjne prilikom npr. industrijske prerade mlijeka u mliječne proizvode. Nadalje, autori navode da su u prisutnosti AFB_1 zapažene promjene u dužini i širini stanica i da su kod štapićastih bakterija štapići duži i širi. Rezultati na slici 8 pokazuju da AFB_1 u obje odabrane koncentracije različito djeluje na stanice bakterija, i da su najveće promjene zabilježene u 8., 24. i 48. satu. Bakterije *Lactobacillus* vrste imaju sposobnost vezanja AFB_1 u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Haskard i sur., 2001; Markov i sur., 2010; Muñoz i sur., 2010; Hassan i sur., 2015), a predložen je i mehanizam vezanja AFB_1 koji se odvija u dva procesa; vezanje (adsorpcija) te otpuštanje (desorpcija) za, odnosno od mjesta vezanja na površini stanice (Peltonen i sur., 2001). Na osnovu dobivenih rezultata može se pretpostaviti da je došlo naizmjence do vezanja i otpuštanja AFB_1 u ovisnosti o koncentraciji AFB_1 i vremenu izloženosti stanica aflatoksinu.

Stanice bakterije *L. plantarum* u prisutnosti 50 i 75 µg/mL ZEA bile su u prosjeku manje veličine u odnosu na veličinu stanica u mediju bez dodanog toksina tijekom 24 sata inkubacije. Međutim, tijekom dužeg kontakta stanica sa koncentracijom ZEA od 75 µg/mL (48. i 72. sat) uočeno je da se veličina stanica povećava (slika 9). Za razliku od utjecaja AFB_1 gdje je uočeno otprilike svaka dva sata naizmjenično povećanje i smanjenje stanica, u pokusima sa zearalenonom je vidljivo da tek pri dužem utjecaju mikotoksina dolazi do povećanja veličine stanica.

Najveća razlika u veličini stanica u uzorcima s dodanim AFB_1 uočena je nakon 24 sata, a iznosi 69,89 % i 76,34 % od kontrole uz 20 µg/mL odnosno 10 µg/mL AFB_1 (slika 8). U uzorcima sa ZEA najveća promjena uočena je već nakon 10 sati uz koncentraciju ZEA od 75 µg/mL i iznosila je 63,86 % u odnosu na kontrolu, dok je najveća razlika s koncentracijom ZEA od 50 µg/mL uočena nakon 24 sata i iznosila je 60,22 % od kontrole (slika 9).

Dobiveni rezultati ukazuju da mikotoksini, AFB_1 i ZEA, imaju različit utjecaj na veličinu stanica BMK i da te promjene ovise o koncentraciji i vremenu djelovanja mikotoksina na stanice bakterija.

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti:

1. Aflatoksin B_1 i zearalenon pokazuju slab učinak na rast i morfološke karakteristike bakterije *Lactobacillus plantarum* B.
2. Utjecaj AFB_1 i ZEA na broj i veličinu stanica bakterije *Lactobacillus plantarum* B ovisi o primijenjenoj koncentraciji i dužini djelovanja mikotoksina.
3. Dobiveni rezultati ukazuju da se bakterija *Lactobacillus plantarum* B prilagodila sredini u kojoj su prisutni mikotoksini.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2013) Cayman Chemical Company; Aflatoxin B_1 Safety Data Sheet, <https://www.caymanchem.com/msdss/11293m.pdf> Pristupljeno 18. lipnja 2017.

Anonymous 2 (2013) Cayman Chemical Company; Zearalenone Safety Data Sheet, <http://www.chemblink.com/MSDS/MSDSFiles/17924-92-4_Cayman.pdf> Pristupljeno 18. lipnja 2017.

Anonymous 3 (2017) Krivulja rasta bakterija, <https://www.google.hr/search?q=krivulja+rasta&client=firefox-b&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi0wayRw93UAhViDcAKHWCEA98Q_AUIBigB&biw=1280&bih=889#tbm=isch&q=krivulja+rasta+bakterija&imgrc=jshyCd-p3or84M:> Pristupljeno 26. lipnja 2017.

Anonymous 4 (2017) Priprema decimalnih razrjeđenja, <https://www.google.hr/search?q=decimal+dilutions&client=firefox-b&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiRqaHIid7UAhXML8AKHc31BOwQ_AUICigB&biw=1280&bih=889#imgrc=p05PBlXDZbLZOM:> Pristupljeno 26. lipnja 2017.

Čvek D., Markov K., Frece J., Friganović M., Duraković L., Delaš F. (2012) Adhesion of Zearalenone to the Surface of Lactic Acid Bacteria Cells. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **7**: 49-52.

Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F. (2010) Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* **21**: 370-380.

Ducrotté P., Sawant P., Jayanthi V. (2012) Clinical trial: Lactobacillus plantarum 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology* **18**: 4012-4018.

Duraković S. (1991) Prehrambena mikrobiologija, 1.izd., Medicinska naklada.

Duraković S., Duraković L. (2003) Mikologija u biotehnologiji, 1.izdr., Kugler.

El-Nezami H., Kankaanpaa P., Salminen S., Ahokas J. (1998) Ability of Dairy Strains of

Lactic Acid Bacteria to Bind a Common Food Carcinogen, Aflatoxin B_1. *Food and Chemical Toxicology* **36**: 321-326.

Frece J., Markov K. (2016) Autochthonous starter cultures U: Fermented Meat Products: Health Aspects, (Zdolec, N., ured.), In Book series: Food biology, R.C. Ray (Editor), CRC Taylor & Francis

Giovati L., Magliani W., Ciociola T., Santinoli C., Conti S., Polonelli L. (2015) AFM_1 in Milk: Physical, Biological and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. *Toxins* **7**: 4330-4349.

HAH (2013) Što su mikotoksini?. HAH - Hrvatska agencija za hranu, <https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/> Pristupljeno 30. svibnja 2017.

Haskard C.A., El-Nezami H.S., Kankaanpää P.E., Salminen S., Ahokas J.T. (2001) Surface binding of aflatoxin B_1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* **67** (7), 3086-3091.

Hassan Y.I., Zhou T., Bullerman L.B. (2015) Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. *Food Science and Technology International* **22**: 79-90.

HMDB (2017) Showing metabocard for Aflatoxin B1 (HMDB06552). HMDB - Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB06552#biological_properties> Pristupljeno 14. lipnja 2017.

Hueza I.M., Raspantini P.C.F., Raspantini L.E.R., Latorre A.O., Górniak S.L. (2014) Zearalenone, an Estrogenic Mycotoxin, Is an Immunotoxic Compound. *Toxins* **6:** 1080-1095.

Jebali R., Abbes S., Salah-Abbes J.B., Younes R.B., Haous Z., Oueslati R. (2015) Ability of Lactobacillus plantarum MON03 to mitigate aflatoxins (B_1 and M_1) immunotoxicities in mice. *Journal of Immunotoxicology* **12**: 290-299.

Markov K., Frece J., Čvek D., Lovrić N., Delaš F. (2010) Aflatoksin M_1 u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **60**: 244-251.

Markov K., Pleadin J., Bevardi M., Vahčić N., Sokolić-Mihalak D., Frece J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control* **34**: 312-317.

Minervini F., Dell' Aquila M.E. (2008) Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. *International Journal of Molecular Sciences* **9**: 2570-2584.

Muñoz R., Arena M.E., Silva J., González S.N. (2010) Inhibition of mycotoxin-producing Aspergillus nomius VSC 23 by lactic acid bacteria and Saccharomyces cerevisiae. *Brazilian Journal of Microbiology* **41**: 1019-1026.

National Center for Biotechnology Information (2007) PubChem Compound Database; CID=186907, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24891116> Pristupljeno 14. lipnja 2017.

National Center for Biotechnology Information (2007) PubChem Compound Database; CID=5281576, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24902175#section=Top> Pristupljeno 14. lipnja 2017.

Peltonen K., El-Nezami H., Haskard C., Ahokas J., Salminen S. (2001) Aflatoxin B1 binding by Dairy Strains ofLactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Journal of Dairy Science 84, 2152-2156.

Pepeljnjak S., Cvetnić Z., Šegvić Klarić M. (2008) Okratoksin A i zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva* **50**: 147-159.

Pleadin J., Markov K., Frece J., Vulić A., Perši N. (2014) Bio-Prevalence, Determination and Reduction of Aflatoxin B1 in Cereals. U: Aflatoxins: Food Sources, Occurrence and Toxicological Effects, (Faulkner A.G., ured.), Nova Science Publishers, USA, str. 1-34.

Schnürer J., Magnusson J. (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* **16**: 70-78.

Sedewitz B., Heinz Schleifer K., Götz F. (1984)
Physiological Role of Pyruvate Oxidase in the Aerobic Metabolism of Lactobacillus plantarum. *Journal of Bacteriology* **160**: 462-465.

Sezer Ç., Güven A., BİIge Oral N., Vatansever L. (2013) Detoxification of aflatoxin B^1 by bacteriocins and bacteriogenic lactic acid bacteria. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **37**: 594-601.

Šušković J., Kos B. (2001) Probiotici i prebiotici, interna skripta, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Šutić M., Banina A. (1979) Promene bakterija mlečne kiseline pod uticajem aflatoksina B_1 i značaj za proizvodnju. *Mljekarstvo* **29**: 106-111.

Šutić M., Dević V., Obradović D., Banina A. (1983) Osetljivost sojeva Lactobacillus casei i Lb. lactis na aflatoksin B_1. *Mljekarstvo* **33**: 259-267.

Varsha K.K., Napoothiri K.M. (2016) Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control* **69**: 61-64.

Yang W-C., Hsu T-C., Cheng K-C., Liu J-R. (2017) Expression of the Clonostachys rosea lactonohydrolase gene by Lactobacillus reuteri to increase its zearalenone-removing ability. *Microbial Cell Factories* **16**: 69

Yazar S., Omurtag G.Z. (2008) Fumonisins, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences* **9**: 2062-2090.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

ime i prezime studenta