

Antibakterijsko djelovanje citrinina na odabrane patogene bakterije i *Gluconobacter oxydans*

Dobrić, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:389678>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Nina Dobrić

1162/BPI

**ANTIBAKTERIJSKO
DJELOVANJE CITRININA NA
ODABRANE PATOGENE
BAKTERIJE I
*Gluconobacter oxydans***

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Ksenije Markov, te uz pomoć Željka Jakopovića, mag.ing.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE CITRININA NA ODABRANE PATOGENE BAKTERIJE I *Gluconobacter oxydans*

Nina Dobrić, 1162/BPI

Sažetak:

Citrinin je mikotoksin kojeg proizvode neke vrste plijesni iz roda *Penicillium*, ali i plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Monascus*. Zbog svoje kemijske strukture citrinin posjeduje širok raspon toksičnih učinaka i njegova prisutnost predstavlja opasnost po zdravlje ljudi i životinja. Cilj ovog rada bio je ispitati antibakterijska svojstva citrinina na najčešće patogene mikroorganizme, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* te nepatogenu bakteriju *Gluconobacter oxydans*. Antibakterijsko djelovanje citrinina određeno je disk difuzijskom metodom, mjerenjem promjera zona inhibicije rasta na čvrstim hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama te turbidimetrijskom metodom u mikrotitarskim pločicama. Također, praćen je broj živih bakterija tijekom izloženosti različitim koncentracijama citrinina. Rezultati dobiveni disk difuzijskom metodom pokazali su inhibicijsko djelovanje koncentracije citrinina od 200 mg mL⁻¹ na sve ispitivane mikroorganizme, a niža koncentracija (100 mg mL⁻¹) nije spriječila rast *E. coli* i *S. typhimurium*. Turbidimetrijskom metodom, kao i praćenjem broja živih bakterija, dokazana je antibakterijska aktivnost dviju koncentracija citrinina.

Ključne riječi: citrinin, antibakterijska svojstva, inhibicija, disk difuzijska metoda, turbidimetrijska metoda

Rad sadrži: 44 stranice, 19 slika, 2 tablice, 75 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: Željko Jakopović, mag.ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Jadranka Frece
2. Prof.dr.sc. Ksenija Markov
3. Prof.dr.sc. Jasna Novak
4. Prof.dr.sc. Blaženka Kos (zamjena)

Datum obrane: 19. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CITRININ AGAINST SELECTED PATHOGENIC BACTERIA AND *Gluconobacter oxydans*

Nina Dobrić, 1162/BPI

Abstract:

Citrinin is a mycotoxin produced by several species of molds of the *Penicillium* genera, but also *Aspergillus* and *Monascus* genera. Due to its chemical structure, citrinin has a wide toxic effect and its presence poses a risk to human and animal health. The aim of this study was to determine antibacterial properties of citrinin against selected pathogenic microorganisms, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and the non-pathogenic *Gluconobacter oxydans*. Antibacterial activities of citrinin was determined by disk diffusion method, measuring diameter of inhibition zone on solid media in Petri dishes and turbidimetric method in microtitre plates. Also, number of living bacteria was monitored during the exposure of different concentrations of citrinin. The results of the disk diffusion method showed an inhibitory effect of citrinin in concentration of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ on all tested microorganisms, while a lower concentration (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) did not prevent the growth of *E. coli* and *S. typhimurium*. Turbidimetric method, as well as monitoring number of living bacteria, proved antibacterial activities of citrinin in both concentrations.

Keywords: citrinin, antibacterial activity, inhibition, disk diffusion method, turbidimetric method

Thesis contains: 44 pages, 19 figures, 2 tables, 75 references, 0 supplement

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Ksenija Markov, Full Professor

Technical support and assistance: Željko Jakopović, MSc

Reviewers:

1. PhD. *Jadranka Frece*, Full professor
2. PhD. *Ksenija Markov*, Full professor
3. PhD. *Jasna Novak*, Full professor
4. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 19 September 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MIKOTOKSINI	2
2.2. POJAVNOST MIKOTOKSINA CITRININA	2
2.3. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA CITRININA	3
2.4. BIOSINTETSKI PUT CITRININA	4
2.5. MEHANIZAM DJELOVANJA CITRININA	6
2.6. TOKSIČNI UČINCI U ORGANIZMU	7
2.6.1. Akutna i subkronična toksičnost	7
2.6.2. Nefrotoksičnost	7
2.6.3. Citotoksičnost, genotoksičnost	8
2.6.4. Mutagenost	9
2.6.5. Karcinogenost	9
2.7. TEST-MIKROORGANIZMI	10
2.7.1. <i>Escherichia coli</i>	10
2.7.2. <i>Salmonella typhimurium</i>	10
2.7.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.7.4. <i>Gluconobacter oxydans</i>	11
2.7.5. <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.7.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Mikroorganizmi	13
3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama	13
3.1.3. Mikotoksin i kemikalije	14
3.1.4. Pribor i aparatura	14
3.2. METODE	15
3.2.1. Priprema kultura test-mikroorganizama	15
3.2.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti citrinina disk difuzijskom metodom	15
3.2.3. Određivanje antibakterijske aktivnosti citrinina turbidimetrijskom metodom	17
3.2.4. Određivanje broja živih stanica	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE CITRININA ODREĐENO DISK DIFUZIJSKOM METODOM	21
4.2. KRIVULJA RASTA BAKTERIJA U PRISUTNOSTI CITRININA	22
4.3. PREŽIVLJAVANJE ODABRANIH BAKTERIJA U PRISUTNOSTI CITRININA	30
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma toksikotvornih plijesni, a mogu se sintetizirati tijekom njihova rasta na nizu različitih supstrata. Biogenerički i strukturno, mikotoksini pripadaju različitim vrstama prirodnih spojeva. Njihova biološka aktivnost obuhvaća akutnu i kroničnu toksičnost, citotoksičnost, hepatotoksičnost, neurotoksičnost, teratogenost, mutagenost, karcinogenost (također i antitumorsko djelovanje), insekticidne i antimikrobne osobine (Duraković i Duraković, 2003).

Mnogobrojni su se spojevi, danas uvršteni među mikotoksine, 30-ih i 40-ih godina 20. st. istraživali kao antibiotici. Zahvaljujući ljekovitom učinku penicilina, ali i drugih antibiotika, smatralo se kako su produkti metabolizma plijesni korisni ili barem neškodljivi. Istina je, međutim da se mnogi od tih metabolita ne mogu primijeniti u liječenju zaraznih bolesti, usprkos tome što su otrovni za patogene mikroorganizme. Naime, previše su opasni za organizam sisavaca (Duraković i Duraković, 2003).

Tijekom istraživanja antibiotika sredinom prošlog stoljeća zanimljiv je postao i citrinin kada je identificirana njegova široka antibakterijska aktivnost (Raistrick i Smith, 1941). Međutim, zanimanje je opalo kada je uočeno toksično djelovanje na sisavce (Ambrose i DeEds, 1946).

Citrinin je poliketidni mikotoksin kojeg proizvodi nekoliko vrsta plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Monascus* (Kováč i sur., 1961; Bevardi, 2013). Pokazuje antibiotska svojstva prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama, ali se nikad nije koristio kao lijek zbog svoje visoke nefrotoksičnosti. Toksičnost se u najvećoj mjeri očituje na bubrezima, ali i na jetri i koštanoj srži (Gupta i sur., 1983).

Citrinin je slabo istražen mikotoksin, kako na području Europske unije, tako i u Hrvatskoj (Pleadin i sur., 2015a), a i broj istraživanja o pojavnosti citrinina je značajno manji u odnosu na druge mikotoksine te su dostupni podaci o njegovoj pojavnosti vrlo ograničeni (EFSA, 2012). Kako su istraživanja uglavnom koncentrirana na toksično djelovanje na čovjeka i životinje, cilj ovog rada bio je ispitati antibakterijsko djelovanje citrinina na gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* (3014), *Salmonella typhimurium* (3064), *Pseudomonas aeruginosa* (3024), *Gluconobacter oxydans* (6160) te gram-pozitivne: *Listeria monocytogenes* (3112) i *Staphylococcus aureus* (3048) disk difuzijskom i turbidimetrijskom metodom uz praćenje broja živih stanica tijekom 72 sata uzgoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini su sekundarni metaboliti toksikotvornih plijesni i vrlo su česti kontaminanti hrane i hrane za životinje. Predstavljaju skupinu stabilnih kemijskih spojeva, raznolike strukture i biološkog djelovanja (Markov i sur., 2010; HAH, 2013). Bolesti koje uzrokuju nazivaju se mikotoksikoze, a mogu se podijeliti na primarne i sekundarne. Primarna mikotoksikoza se odnosi na kontaminaciju hrane biljnog podrijetla kao posljedica rasta plijesni na žitaricama, voću i povrću. Ako se životinje hrane tako kontaminiranom hranom, mikotoksini mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka putem mesa, jaja, mlijeka i mliječnih proizvoda tzv. „carry over“ efektom, što predstavlja sekundarnu mikotoksikozu (Peraica i Rašić, 2012; Markov i sur., 2013; Giovati i sur., 2015; Pleadin i sur., 2015b). FAO (eng. *Food and Agriculture Organisation*) procjenjuje da je 25% hrane, uglavnom biljnog podrijetla, proizvedene na svijetu, kontaminirano mikotoksinima (Šarkanj i sur., 2010), a s obzirom na njihova toksična svojstva, od iznimne je važnosti kontrolirati prisutnost i količinu mikotoksina u hrani.

Različiti rodovi plijesni (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*) koji rastu na različitim usjevima i prehrambenim proizvodima, posebice žitaricama, orašastim i voćnim plodovima mogu prirodno sintetizirati mikotoksine (Oancea i Stoia, 2008). Budući da se radi o sekundarnim metabolitima, koji nemaju određenu metaboličku funkciju prilikom rasta plijesni, neki su mikotoksini proizvodi više različitih vrsta plijesni, a neke plijeni sintetiziraju i više od jednog mikotoksina (Duraković i Duraković, 2000). Raznolika kemijska struktura mikotoksina omogućuje širok raspon toksičnih učinaka, a visoka toksičnost i u vrlo malim količinama, kao i odsutnost senzorskog upozorenja prilikom konzumacije kontaminirane hrane predstavlja veliku opasnost za ljudsko zdravlje (Markov i sur., 2010; Markov i sur., 2013).

2.2. POJAVNOST MIKOTOKSINA CITRININA

Citrinin je mikotoksin kojeg proizvode neke vrste plijesni iz rodova *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. viridicatum*, *P. expansum*, *P. notatum*), ali i plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Monascus*. Prvi put je izoliran 1931. godine iz plijesni *Penicillium citrinum* (Hetherington i Raistrick, 1931). *P. citrinum* kao najznačajniji producent citrinina vrlo je raširena plijesan i može se izolirati iz velikog broja namirnica i stočne hrane (Pleadin i sur., 2015a). Neke vrste iz

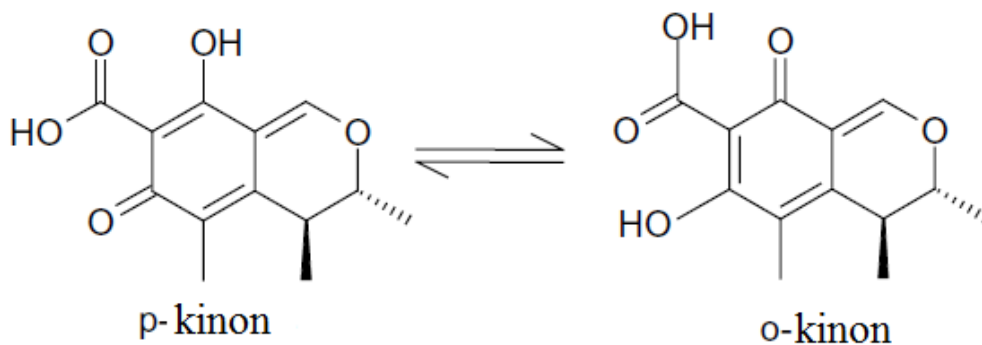
rodova *Aspergillus* i *Penicillium* osim citrinina također mogu proizvoditi i druge mikotoksine poput okratoksina A i patulina.

Glavni izvori navedenih plijesni, a ujedno i citrinina su žitarice i proizvodi na bazi žitarica, ali se također vrlo često nalazi i na drugim proizvodima biljnog podrijetla kao što su riža, sjemenke suncokreta, voće, voćni sokovi, crne masline, orašasti plodovi (npr. bademi, lješnjaci, pistacio) i začinsko bilje (npr. kurkuma, komorač, crni papar i dr.). Također je dokazana prisutnost i u siru, pokvarenim mliječnim proizvodima, u sake-u te različitim dodacima prehrani (EFSA, 2012; Ostry i sur., 2013; Wang i sur., 2013; Jeswal i Kumar, 2015; Pleadin i sur., 2015a). Citrinin se vrlo često nalazi i kao neželjeni sastojak fermentacijskih proizvoda, dobivenih upotrebom vrsta plijesni iz roda *Monascus* koje rastu na riži, tzv. crvene riže koja se u Aziji koristi kao konzervans i prehrambeno bojilo (de Oliveria Filho i sur., 2017). Sinteza citrinina odvija se nakon žetve prilikom skladištenja namirnice.

Poznata je istovremena pojava citrinina s patulinom u jabučnim sokovima i džemovima od jabuka, a uobičajena je zajednička pojava citrinina s okratoksinom A ili npr. aflatoksinom B₁ na žitaricama, posebice riži. Vjeruje se da su citrinin i okratoksin A uključeni u etiologiju endemske nefropatije svinja u Danskoj, kao i etiologiju bolesti bubrega nazvanu balkanska endemska nefropatija (Flajs i Peraica, 2009; EFSA, 2012). Također se ustanovilo da citrinin povećava toksičnost okratoksina A kako aditivno tako i sinergistički (Ji i sur., 2015). Na prirodnim supstratima uglavnom ne nalazimo čiste, nego mješovite kulture plijesni. Poznato je da su mješovite mikrobnе kulture često biokemijski aktivnije od čistih kultura pa problem biosinteze različitih metabolita, koji nastaju tijekom rasta plijesni u mješovitim kulturama, postaje još značajniji. Broj istraživanja o pojavnosti citrinina je značajno manji u odnosu na druge mikotoksine te su dostupni podaci o njegovoj pojavnosti vrlo ograničeni (EFSA, 2012).

2.3. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA CITRININA

Prema IUPAC nomenklaturi citrinin je (3*R*, 4*S*)-4,6-dihidro-8-hidroksi-3,4,5-trimetil-6-okso-3*H*-2-benzopiran-7-karboksilna kiselina molekulske formule C₁₃H₁₄O₅ i molarne mase 250,25 g mol⁻¹.



Slika 1. Strukturna formula izomera citrinina (Xu i sur., 2006)

Strukturno je to kinon s dvije intramolekularne vodikove veze. Formira žućkaste kristale u obliku iglica. Kristalizira u nepravilnoj strukturi u *p*-kinonske i *o*-kinonske tautomerne oblike (slika 1) koji su u dinamičkoj ravnoteži u čvrstom stanju. Ima konjugiranu, planarnu strukturu koja osigurava fluorescenciju (Franco i sur., 1996; de Oliveria Filho, 2017). Praktički je netopiv u hladnoj vodi, slabo je topiv u vrućoj vodi, ali je dobro topiv u natrijevom hidroksidu, natrijevom karbonatu, natrijevom acetatu kao i u polarnim organskim otapalima kao što su metanol, acetonitril, etanol i drugi (Deshpande, 2002).

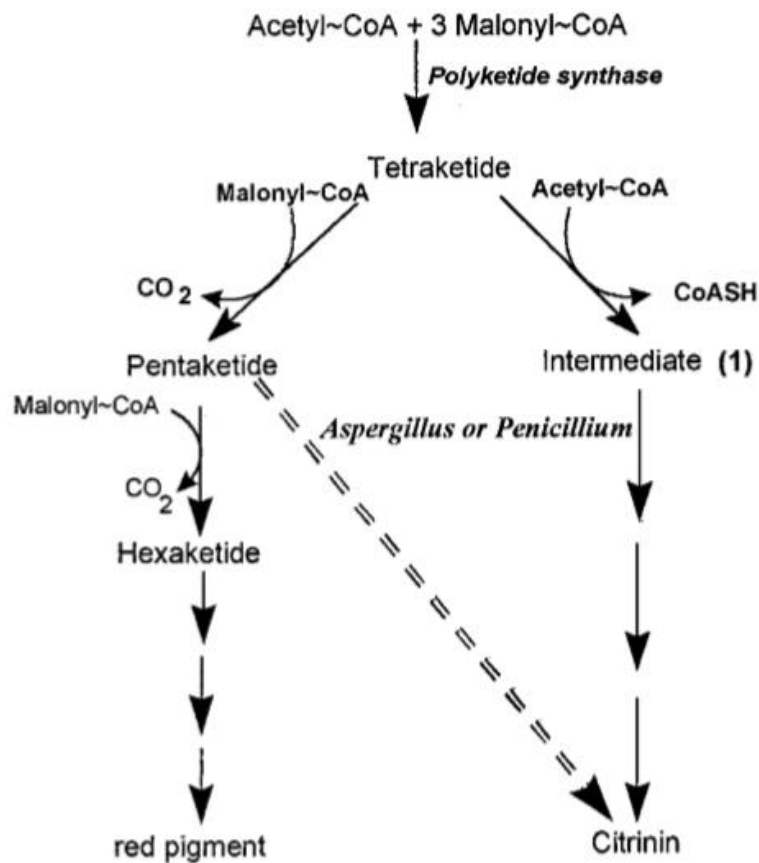
Temperatura tališta je 172 °C. ApSORPCIJSKI UV maksimum postiže se pri 250 nm i 333 nm (u metanolu). Može tvoriti kelatne komplekse (Xu i sur., 2006). Razgradnja citrinina odvija se na temperaturama iznad 175 °C u suhim uvjetima ili iznad 100 °C u prisutnosti vode (Trivedi i sur., 1993) te se može razgraditi u kiselim ili alkalnim otopinama zagrijavanjem (Xu i sur., 2006).

2.4. BIOSINTETSKI PUT CITRININA

Penicillium citrinum je kserofilna plijesan s minimalnom a_w vrijednošću 0,82, raste u temperaturnom rasponu 5-40 °C, a biosinteza citrinina je moguća u rasponu 15-30 °C. Optimalna temperatura za rast i biosintezu citrinina je 30 °C (Duraković i Duraković, 2000; Xu i sur., 2006; Bevardi, 2013).

U filamentoznih plijesni poliketidni put je glavni put nastajanja citrinina kao sekundarnog metabolita. Poznato je da plijesni iz roda *Aspergillus* sintetiziraju citrinin kondenzacijom jedne molekule acetil-koenzima A i četiri molekule malonil-koenzima A uz adiciju tri metilne jedinice. Hajjaj i sur. (1999) su opisali metabolički put biosinteze citrinina u plijesni *Monascus ruber* kroz mogućnost njegovog nastanka kondenzacijom jedne molekule

acetil-koenzima A i tri molekule malonil-koenzima A. Dodatkom još jedne molekule acetil-koenzima A nastaje prvi međuprodukt, ali se ne može ni isključiti mogućnost da molekula malonil-koenzima A reakcijom kondenzacije i dekarboksilacije s tetraketidom tvori prvi međuprodukt. Sljedeća reakcija uključuje O-alkilaciju i cijepanje jednostruke veze između C-1 i C-9 atoma te nastanak drugog i trećeg međuprodukta podjednake molekulske mase. Nastali tetraketid tijekom rasta *M. ruber* uzrokuje proizvodnju citrinina i crvenog pigmenta (slika 2). Cjeloviti proces biosinteze citrinina još nije u potpunosti razjašnjen, a literaturni podaci ujedno navode i da je potrebno proučiti enzime i enzimске reakcije koje sudjeluju u biosintetskom putu (Hajjaj i sur., 1999).



Slika 2. Biosintetski put citrinina i crvenog pigmenta u *M. ruber* (puna linija) i u vrstama roda *Penicillium* i *Aspergillus* (isprekidana linija) (Hajjaj i sur., 1999)

2.5. MEHANIZAM DJELOVANJA CITRININA

Mehanizam toksičnosti citrinina nije u potpunosti razjašnjen, međutim ustanovljeno je da inhibira sintezu RNA i DNA, uzrokuje oksidativni stres u stanicama, promjene na mitohondrijima, uzrokuje i poremećaje u održavanju razine kalcija, aktivira specifične signalne puteve, a ima utjecaja i na proces mitoze.

Inhibicija sinteze RNA i DNA citrininom opisana je u različitim kulturama stanica sisavaca, uključujući stanice bubrega (Yoneyama i Sharma, 1987; Wasternack i Weisser, 1992). Otkriveno je da citrinin povećava formiranje reaktivnih kisikovih vrsta te stimulira nastajanje superoksidnih aniona u respiratornom lancu. Time inducira oksidativni stres, uz inhibiciju glutation reduktaze i transhidrogenaze u stanicama jetre štakora (Ribeiro i sur., 1997). Citrinin također inducira oksidativni stres indukcijom lipidne peroksidacije i sintezom proteina toplinskog šoka u Vero stanicama (Bouslimi i sur., 2008) i HEK293 humanim stanicama bubrega (Liu i sur., 2003), te značajnim smanjenjem glutationa u alveolarnim epitelnim stanicama (Johannessen i sur., 2007). Provedeno istraživanje na PK15 stanicama s citrininom i u kombinaciji citrinina i okratoksina A potvrđuje oksidativni stres u stanicama uzrokovan smanjenjem omjera reduciranog i oksidiranog glutationa. U kombinaciji citrinina i okratoksina A pokazao se učinak i na proteine toplinskog šoka u PK15 stanicama (Šegvić Klarić i sur., 2014).

Višestruki učinci na funkcije mitohondrija dokazani su na bubrežnim stanicama štakora. Smanjena respiracija uz smanjenje razine staničnog ATP dovelo je do smrti stanica (Aleo i sur., 1991). Povećanje mitohondrija i posljedično stanična smrt potvrđena je i sa stanicama bubrega hrčaka (Chagas i sur., 1994).

Citrinin djeluje i na transport kalcija u mitohondrije. U istraživanju sa epitelnim stanicama bubrega svinje (PK15) praćen je utjecaj citrinina na povećanje citosolne koncentracije kalcija koji dovodi do povećanog ulaska kalcija u mitohondrije, što dalje dovodi do otpuštanja citokroma c i apoptoze stanice (Šegvić Klarić i sur., 2012).

Jedan od mehanizama toksičnog učinka je i utjecaj na signalne puteve u stanici, aktivacijom mitogenom aktiviranih protein kinaza (Rumora i sur., 2014).

Izlaganje stanica HEK293 citrininu rezultiralo je zaustavljanjem G2 faze mitoze staničnog ciklusa, povećanim mitotskim indeksom, supresijom sastava mikrotubula tijekom interfaze i stvaranjem vretena tijekom mitoze. To ukazuje da citrinin uzrokuje poremećaje u procesu mitoze (Chang i sur., 2011).

2.6. TOKSIČNI UČINCI U ORGANIZMU

Toksičnost citrinina nije detaljno proučena i nema dovoljno podataka koji ukazuju na njegove toksične učinke u ljudi (Pleadin i sur., 2015a). Klasificiran je kao toksičan do umjereno toksičan (Frank, 1992).

2.6.1. Akutna i subkronična toksičnost

Rezultati dobiveni u dosadašnjim istraživanjima upućuju na značajne razlike u osjetljivosti različitih vrsta životinja, dozi, a i samom načinu primjene citrinina.

Primjerice, LD₅₀ subkutano primijenjene doze za štakore je 67 mg kg⁻¹ t.t. (Ambrose i DeEds, 1946). Phillips i Hayes (1978) proučavali su promjene u jetri i bubrezima kod miševa i uočili patološke promjene na jetri nakon jedne intraperitonealne doze citrinina od 35 mg kg⁻¹ t.t. LD₅₀ intraperitonealno iznosi za mužjake miševa 58 mg kg⁻¹ t.t., za ženke 62 mg kg⁻¹ t.t. LD₅₀ za miševu kojima je citrinin doziran oralno bio je 112 mg kg⁻¹ t.t. (Jordan i sur., 1977).

Subkutana primjena citrinina u dozama od 50, 75 ili 100 mg kg⁻¹ t.t. bila je letalna za zamorce uslijed nekroze bubrežnih tubula, akutnog miokarditisa i nekroze sluznice želuca. Doza od 25 mg kg⁻¹ t.t nije bila smrtonosna za testne životinje (Ambrose i DeEds, 1946) dok je oralnom primjenom citrinina tijekom 14 dana određena prosječna letalna doza od 43 mg kg⁻¹ t.t. po danu za zamorce (Thacker i sur., 1977). Hrčci su dobro podnosili izloženost s 250 i 500 mg citrinina po kg hrane tijekom dva tjedna, bez kliničkih znakova toksičnosti i histopatoloških promjena (Carlton i Szczech, 1978). Intravenskom primjenom citrinina, LD₅₀ za zečeve iznosi otprilike 20 mg kg⁻¹ t.t. Hanika i sur. (1983) odredili su intraperitonealnu dozu LD₅₀ od 50 mg kg⁻¹ t.t. te oralnu 72-satnu LD₅₀ od 134 mg kg⁻¹ tjelesne težine.

Lee i sur. (2010) proveli su 90-dnevno istraživanje s muškim štakorima s ciljem uspostavljanja sigurne dnevne koncentracije crvene riže kao prehrambenog aditiva. Rezultati upućuju na to da se doza citrinina od 20 µg kg⁻¹ t.t. dnevno može smatrati kao razina neprimijećenih štetnih učinaka (NOAEL, eng. *no-observed-adverse-effect level*) za štakore. U dosadašnjoj literaturi ne postoje druga istraživanja subkronične toksičnosti, koje bi se mogle koristiti za identifikaciju NOAEL.

2.6.2. Nefrotoksičnost

Arai i Hibino (1983) proučavali su tijekom 80 tjedana štakore hranjene komercijalno dostupnom hranom u prahu u koju je umješan citrinin. Dio životinja je žrtvovan i istražen histopatološki i strukturno nakon 32, 40, 60 i 80 tjedana. Tjelesna težina tretiranih štakora

opadala je tijekom eksperimenta što je otežavalo procjenu stvarne doze. Međutim, početni unos hrane od 20 g doveo bi do izlaganja približno 70 mg kg^{-1} t.t. Tretirana skupina štakora pokazala je povećanje omjera težine bubrega i jetre prema tjelesnoj težini pri svakom pregledu. Počevši od 40. tjedna svi su štakori pokazali fokalnu hiperplaziju tubularnog epitela i male adenome. Nakon 60. tjedna u bubrezima su se pojavili masivni benigni adenomi. Bubrežni kao glavni ciljani organ pokazao je progresivne histopatološke promjene i visoke incidencije adenoma. Ovo je istraživanje bilo ograničeno na maksimalno razdoblje od 80 tjedana, što je nešto kraće od normalnog trajanja istraživanja kancerogenosti glodavaca, tj. najmanje 2 godine (104 tjedna). Stoga se s obzirom na visoku učestalost adenoma, ne može isključiti da bi se karcinomi pojavili ako bi se vrijeme izlaganja povećalo do punog trajanja istraživanja kancerogenosti.

Pokusi na trima beagla (Carlton i sur., 1974), pri čemu su psi unosili citrinin hranom, rezultirali su znakovima bolesti bubrega (dehidracija i povećani unos vode). Najosjetljiviji pokazatelj toksičnosti citrinina kod pasa koji su uzimali oralnu dozu od 5 mg kg^{-1} t.t. po danu bilo je značajno povećanje aktivnosti laktat dehidrogenaze u urinu prije same pojave kliničkih znakova bubrežne bolesti. Intravenske injekcije s $20 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ nisu u psima uzrokovale promjene strukture bubrežnog tkiva (Krejci i sur., 1996). S druge strane, $80 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ značajno je povećalo hematokrit i bubrežno izlučivanje proteina i glukoze i brojne strukturne lezije u stanicama bubrega.

2.6.3. Citotoksičnost, genotoksičnost

Citotoksičnost citrinina značajno varira od jedne stanične kulture do druge. Genotoksičnost ispitivana na bakterijama i stanicama sisavaca dvosmisleno je utvrđena jer su različiti testni sustavi dali i pozitivne i negativne rezultate.

Citrinin primijenjen na kultiviranim stanicama hepatoma (rak stanica jetre) u dozama do $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ bio je citostatičan, dok je u koncentracijama $50\text{-}200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ bio citotoksičan (Lorkowski i sur., 1980). Procijenjeni IC_{50} (pola maksimalne inhibitorne koncentracije) citrinina na Vero stanice je oko $220 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ nakon 48-satnog izlaganja (Bouslimi i sur., 2008). Tijekom jednako dugog izlaganja, IC_{50} citrinina za stanične linije ljudskih embrija bio je $120 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Nakon 24 satnog izlaganja, IC_{50} za ljudske stanice promielocitne leukemije (HL-60) i svinjskih bubrežnih stanica PK15 bio je $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ odnosno $48 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (Yu i sur., 2006; Šegvić Klarić i sur., 2007).

Više oštećenja na DNA detektirano je komet testom (gel-elektroforeza pojedinačnih stanica) Vero stanica izlaganih 24 h citrininu (Bouslimi i sur., 2008). Međutim, ista metoda daje

negativne rezultate za embrionalne stanice bubrega (HEK293) (Liu i sur., 2003) i humane stanice jetre (HepG2) (Knasmüller i sur., 2004).

Genotoksičnost je potvrđena s različitim kulturama stanica izloženim citrininu. Izlaganje PK15 stanica (epitelne stanice bubrega svinje) kroz 24 h s 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ citrinina rezultiralo je značajnim povećanjem broja mikronukleusa (Šegvić Klarić i sur., 2007). To povećanje je također primijećeno u HepG2 stanicama (Knasmüller i sur., 2004), humanim limfocitima (Dönmez-Altuntas i sur., 2007) i stanicama V79 kineskog hrčka (Pfeiffer i sur., 1998), ali pri različitim koncentracijama citrinina.

2.6.4. Mutagenost

U bakterijskim testovima korišteno je pet sojeva *Salmonella typhimurium* pri čemu citrinin nije pokazivao mutagenost (Wehner i sur., 1978; Sabater-Vilar i sur., 1999; Knasmüller i sur., 2004). Pozitivan odgovor je detektiran u jednom soju s nestandardnim protokolom, prema kojemu je primarna kultura hepatocita štakora korištena kao sustav metaboličke aktivacije (Sabater-Vilar i sur., 1999). Ti rezultati pokazuju da citrinin zahtjeva složenu staničnu biotransformaciju da postane mutagen. Citrinin nije inducirao SOS odgovor u *E. coli* PQ37 (Malaveille i sur., 1991; Sakai i sur., 1992). Prema Martin i sur. (1986) citrinin uzrokuje jednolančane prekide na kromosomalnoj DNA *E. coli* i inducira sintezu popravka u permeabiliziranim stanicama.

2.6.5. Karcinogenost

Podaci o karcinogenosti citrinina u dostupnoj literaturi su vrlo rijetki. IARC (1986) zaključuje da postoje ograničeni dokazi za karcinogenost citrinina na pokusnim životinjama i da se ne može procijeniti karcinogenost citrinina kod ljudi. Citrinin je svrstan u grupu 3 (ne može se klasificirati karcinogenost za ljude).

U ispitivanju toksičnosti kroz 80 tjedana sa štakorima, sve životinje su pokazale, počevši od 40. tjedna, fokalnu hiperplaziju tubularnog epitela i male bubrežne adenome, ali ne i karcinome ili srodne tumore mokraćnog sustava (Arai i Hibino, 1983). Kako je istraživanje ograničeno na 80. tjedana, ne može se isključiti pojavnost karcinoma nakon duljeg izlaganja i/ili razdoblja promatranja.

Tumori bubrega također nisu zapaženi ni kod štakora nakon što su tretirani kroz 48 tjedana hranom koja je sadržavala 200 i 500 mg citrinina po kg tjelesne težine (Shinohara i sur.,

1976). Kanisawa (1984) nije utvrdio da citrinin uzrokuje tumore kod miševa izloženih citrininu prehranom u koncentracijama 0 mg kg^{-1} , 100 mg kg^{-1} ni 200 mg kg^{-1} tijekom 70 tjedana.

2.7. TEST-MIKROORGANIZMI

2.7.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli je gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*. Enterobakterije se uobičajeno nalaze u probavnom traktu i ljudi i životinja. Neki od rodova koji pripadaju u porodicu *Enterobacteriaceae* kao što su rodovi *Escherichia* i *Salmonella* su izuzetno patogeni, a prisustvo u namirnicama indikator je nedovoljne higijene tijekom proizvodnje, čuvanja ili manipulacije hranom. Namirnice u kojima se uspostavi prisutnost enterobakterija smatraju se zdravstveno neispravnim.

E. coli se pronalazi pojedinačno ili u parovima. Neki sojevi posjeduju kapsulu, a većina ima flagele što omogućava pokretljivost. Stanice su štapićastog oblika. *E. coli* se razmnožava na temperaturama od 10 do $46 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a optimalna temperatura za rast je $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Vrlo je otporna bakterija i vrlo lako se prilagođava različitim uvjetima u okolini (Duraković, 1996; Matić, 2009).

2.7.2. *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium je gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija koja također pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Bakterije dolaze pojedinačno ili u parovima i uglavnom su pokretne zbog posjedovanja peritrihijalnih flagela i fimbrija. Stanice su štapićastog oblika. Dobro rastu i razmnožavaju se na velikom broju podloga, a samim time mogu se razvijati i u velikom broju namirnica raznolikog sastava. Razmnožavaju se u temperaturnom intervalu od 5 do $47 \text{ }^{\circ}\text{C}$, optimalna temperatura je $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Sintetiziraju endotoksine, a rijetko i egzotoksine (Duraković, 1996; Matić, 2009).

2.7.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je gram-negativna, aerobna bakterija štapićastog oblika. Stanice posjeduju polarno smješteni bič te fimbrije što ih čini pokretnima. Neki sojevi imaju kapsulu. Optimalna temperatura rasta je $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ali rastu i do $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$. *Pseudomonas aeruginosa* jedan je od najčešćih bolničkih patogena te uzrokuje brojne infekcije i prirodno je rezistentan na veliki broj antibiotika (Gužvinec i sur., 2012). Za bakterije iz roda *Pseudomonas* su

karakteristični minimalni zahtjevi za nutrijentima te su mnoge sposobne koristiti raznolike hranjive tvari iz okoliša kao izvor energije te su zbog toga široko rasprostranjene i imaju iznimne mogućnosti preživljavanja u okolišu (Drenjačević i Vraneš, 2013).

2.7.4. *Gluconobacter oxydans*

Gluconobacter oxydans je gram-negativna aerobna bakterija. Stanice ne posjeduju flagele i nepokretne su. Uglavnom su štapićastog ili ovalnog oblika. Bakterija *Gluconobacter oxydans* se pojavljuje u brojnim namirnicama poput meda, voća, vina, pive, vinskog octa i slično. Uzrokuje i kvarenje ananasa te crvenilo na jabukama i kruškama. Raste u temperaturnom intervalu od 25 °C do 30 °C, optimalno na 28 °C. Budući da je nepatogena, odnosno ne djeluje štetno na zdravlje ljudi i životinja, *Gluconobacter oxydans* je industrijski dobro iskorištena bakterija. Koristi se prilikom nepotpune oksidacije šećera (L-sorboze iz D-sorbitola), alkohola i kiselina (D-glukonske kiseline, 5-keto i 2-ketoglukonske kiseline iz D-glukoze) (De Ley, 1961; Markov i sur., 2019).

2.7.5. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je gram-pozitivna fakultativno anaerobna bakterija, ali može rasti i u aerobnim, mikroaerofilnim, anaerobnim uvjetima i pod vakuumom. Stanice se pronalaze pojedinačno ili u kratkim lancima, štapićastog su oblika i posjeduju flagele (Ryser i Marth, 2007). Iako je optimalna temperatura za rast ovog patogena 37 °C, *Listeria monocytogenes* ima mogućnost razmnožavanja i na izuzetno niskim temperaturama. Zbog sposobnosti razmnožavanja na temperaturama skladištenja (+4 °C) može uzrokovati velike probleme u prehrambenoj industriji (Matić, 2009).

2.7.6. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je gram-pozitivna, aerobna ili fakultativno anaerobna bakterija. Stanice su kuglastog oblika i najčešće u nakupinama u obliku grozdova. Raste u rasponu temperatura od 7 do 48 °C, a optimalna temperatura je 37 °C. *S. aureus* je široko rasprostranjen u prirodi, patogen i izaziva mnoštvo različitih infekcija i intoksikacija (Duraković, 1996). Iako je *Staphylococcus aureus* u nekih ljudi normalni stanovnik nosne šupljine i ždrijela, vrlo je važan patogen u mikrobiologiji namirnica, budući da je uzročnik stafilokoknog otrovanja. *Staphylococcus aureus* je najotpornija od svih nespороgenih bakterija: ima sposobnost tolerancije visokog sadržaja soli i ugljikohidrata, ekstremnih pH i visokih temperatura (60

°C/60 min), preživljava sušenje i otporna je na djelovanje mnogih antibiotika. Enterotoksini koje sintetizira *Staphylococcus aureus* su jedni od najpoznatijih i najopasnijih otrovnih supstanci za čovjeka koji se mogu pronaći u hrani. Kontaminacije namirnica s *S. aureus* najčešće su povezane s lošim higijenskim uvjetima prerade i pripreme hrane (Duraković, 1996; Matić, 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

Antimikrobno djelovanje mikotoksina citrinina ispitano je na 6 test-mikroorganizama *Escherichia coli* (3014), *Salmonella typhimurium* (3064), *Pseudomonas aeruginosa* (3024), *Gluconobacter oxydans* (6160), *Listeria monocytogenes* (3112) i *Staphylococcus aureus* (3048) dobivenih iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za Opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Test-mikroorganizmi čuvani su kao čiste kulture na odgovarajućim hranjivim podlogama pri temperaturi od 4°C do početka pokusa.

3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama

Za uzgoj i praćenje rasta bakterija *Escherichia coli* (3014), *Salmonella typhimurium* (3064), *Pseudomonas aeruginosa* (3024), *Listeria monocytogenes* (3112) i *Staphylococcus aureus* (3048) korišteni su hranjivi bujon i hranjivi agar (Biolife, Italija) pripremljeni iz dehidratiranih podloga u prahu suspendiranjem u 1000 mL destilirane vode. Podloge se nakon otapanja steriliziraju u autoklavu na 121 °C tijekom 15 minuta.

Hranjivi bujon sastava:

- mesni ekstrakt (3 g/L)
- pepton (5 g/L)

U destiliranoj vodi otopljeno je 8 g dehidratirane podloge, a pH podloge iznosi 6,5.

Hranjivi agar sastava:

- mesni ekstrakt (3 g/L)
- pepton (5 g/L)
- agar (15 g/L)

U destiliranoj vodi otopljeno je 23 g dehidratirane podloge, a pH podloge iznosi 6,5.

Za uzgoj i praćenje rasta bakterije *Gluconobacter oxydans* (6160) korišteni su YPM (Yeast-Peptide-Mannitol) bujon i YPM agar (Biolife, Italija). Podloge se nakon otapanja steriliziraju u autoklavu na 121 °C tijekom 15 minuta.

YPM bujon sastava:

- kvašćev ekstrakt (5 g/L)
- pepton (3 g/L)
- manitol (25 g/L)

U destiliranoj vodi pH podloge iznosi 6,5.

YPM agar sastava:

- kvašćev ekstrakt (5 g/L)
- pepton (3 g/L)
- manitol (25 g/L)
- agar (20 g/L)

U destiliranoj vodi pH podloge iznosi 6,5.

3.1.3. Mikotoksin i kemikalije

- citrinin „Acros Organics“ – New Jersey, SAD
- etanol (Grammol, Hrvatska)
- antibiotik ciprofloksacin (Roseto, Italija)

3.1.4. Pribor i aparatura

U eksperimentalnom radu korišten je slijedeći pribor i aparatura:

- Pribor:

- Epruvete (16 x 160 mm)
- Epruvete mikrobiološke (18 x 180 mm)
- Mikrobiološka ušica
- Mikropipete (10-1000 µL; Eppendorf, Njemačka)
- Staklene čaše
- Petrijeve zdjelice (ø 10 cm)
- Štapići po Drigalskom
- Histološka pinceta

- Diskovi od filter-papira (\varnothing 6 mm) (Macherey-Nagel GmbH, Njemačka)
 - Mikrotitarska pločica
 - Bunsenov plamenik
- Aparatura:
- Vibromikser Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija)
 - Brojač kolonija (BZG30)WTW-Weilheim
 - Čitač mikrotitarskih pločica „Tecan“
 - Termostati Sutjeska, Beograd
 - Autoklav (Sutjeska, Beograd)
 - Analitička vaga (Sartorius, Njemačka)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema kultura test-mikroorganizama

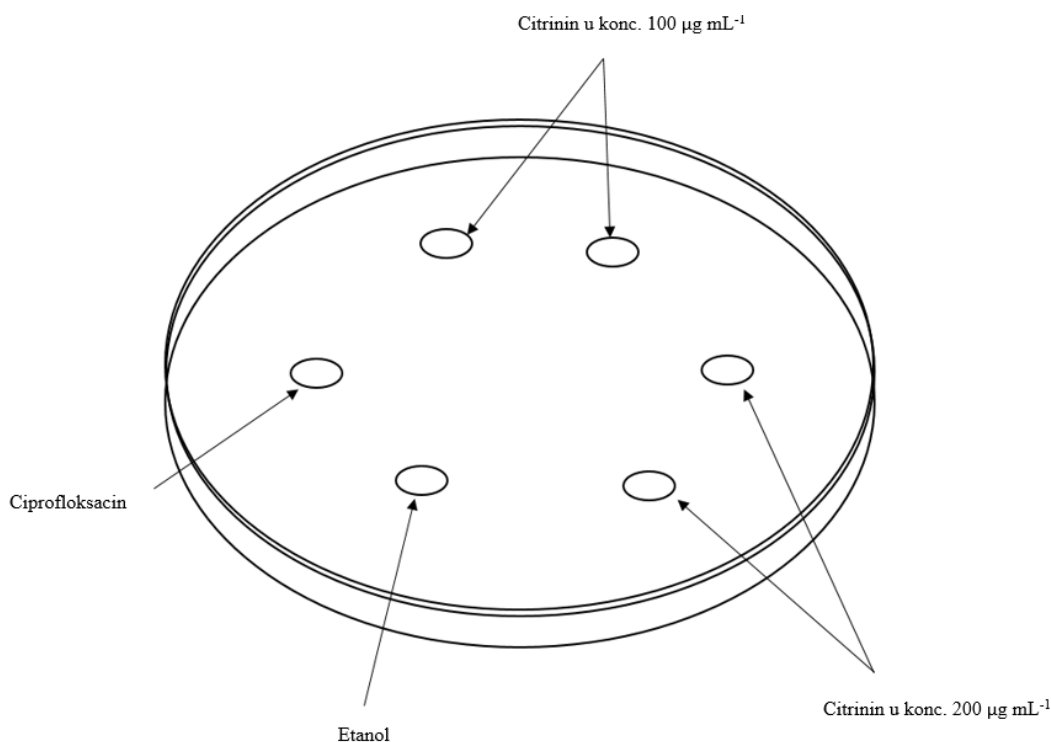
Na kosi hranjivi agar odnosno YPM agar (*Gluconobacter oxydans*) naciepljene su čiste kulture test-mikroorganizama te su stavljene u termostat na inkubaciju pri temperaturama od 37 °C, odnosno 28 °C (*Gluconobacter oxydans*) kroz 24 sata. Porasle kolonije na hranjivoj podlozi su zatim precijepljene u tekuću hranjivu podlogu (hranjivi bujon odnosno YPM). Za određivanje antimikrobne aktivnosti citrinina turbidimetrijskom metodom pripremljena je prekonoćna kultura bakterija. Kolonije precijepljene s agara u tekuću podlogu stavljene su u termostat na inkubaciju kroz 24 sata na odgovarajuće temperature.

3.2.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti citrinina disk difuzijskom metodom

Osnova određivanja antibakterijske aktivnosti disk difuzijskom metodom je postavljanje impregniranih diskova od filter papira na površinu čvrste hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama na koje su prethodno naciepljene bakterijske kulture. Diskovi se impregniraju s određenim koncentracijama tvari čije se antibakterijsko djelovanje ispituje. Tijekom inkubacije, kako ispitivana tvar difundira iz diska kroz medij, stvara se koncentracijski gradijent pri čemu su najveće koncentracije uz disk, a sve manje koncentracije s većom udaljenošću. Ako je bakterija osjetljiva na ispitivanu tvar, formira se svijetlije područje bez rasta tzv. zona inhibicije oko impregniranog diska. Osjetljivost test-mikroorganizma

proporcionalna je promjeru zone inhibicije (u mm). Sam promjer zone inhibicije ovisi o više varijabli kao npr. sama koncentracija i molekulska masa tvari koja se ispituje (otežana difuzija kroz medij), sastav medija ili koncentracija nacijepljene bakterijske kulture (veća količina inokuluma u nekoj mjeri može smanjiti zonu inhibicije) (Chess, 2009).

Kako bi se odredila antibakterijska aktivnost citrinina disk difuzijskom metodom, bakterijske suspenzije (0,1 mL) svakog mikroorganizma (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) sterilno se nacijepe na površinu čvrstog hranjivog agara odnosno YPM agara (*Gluconobacter oxydans*) u Petrijevim zdjelicama. Bakterijska suspenzija se ravnomjerno razmaže po čitavoj površini podloge štapićem po Drigalskom i ostavi na 37 °C (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* i *S. aureus*) odnosno na 28 °C (*G. oxydans*) u termostatu tijekom 30 minuta. Zatim se sterilnom pincetom postavljaju diskovi od filter papira na površinu podloge na koje je nanoseno po 10 μL (u paraleli) otopine citrinina u koncentracijama 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 μL etanola kao negativna kontrola te disk s antibiotikom širokog spektra djelovanja, ciprofloksacin, kao pozitivna kontrola (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz postavljanja testa disk difuzijske metode za određivanje antimikrobne aktivnosti (vlastita fotografija)

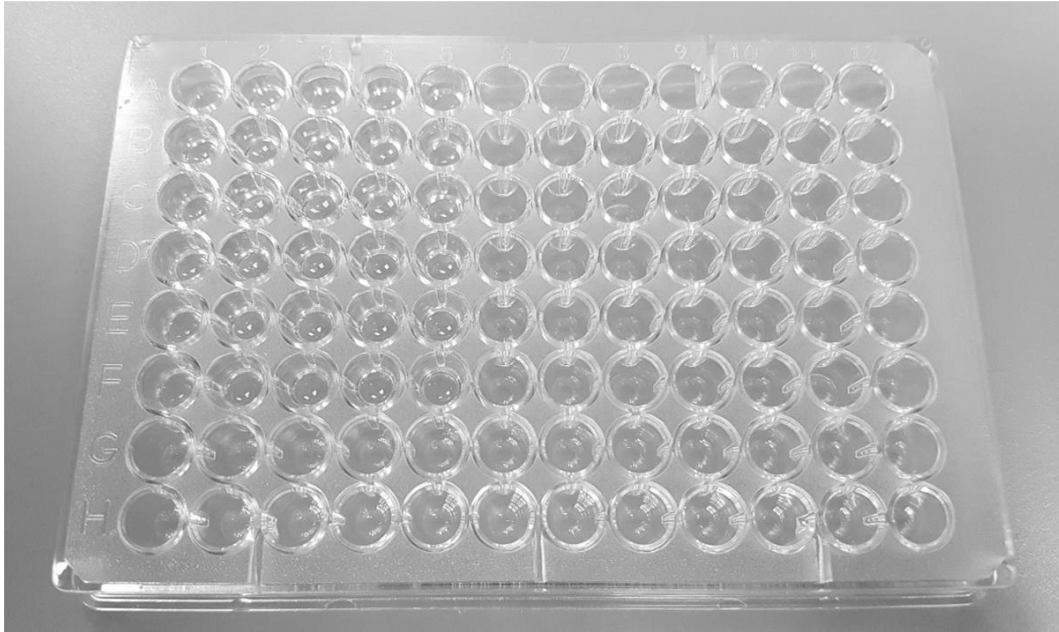
Tako pripremljene Petrijeve zdjelice se ostave u termostatu na odgovarajućim temperaturama tijekom 24 sata. Ovisno o osjetljivosti bakterija na citrinin, nakon 24 h inkubacije, jasno su vidljive manje ili veće zone inhibicije te su ravnalom izmjereni njihovi promjeri u milimetrima.

3.2.3. Određivanje antibakterijske aktivnosti citrinina turbidimetrijskom metodom

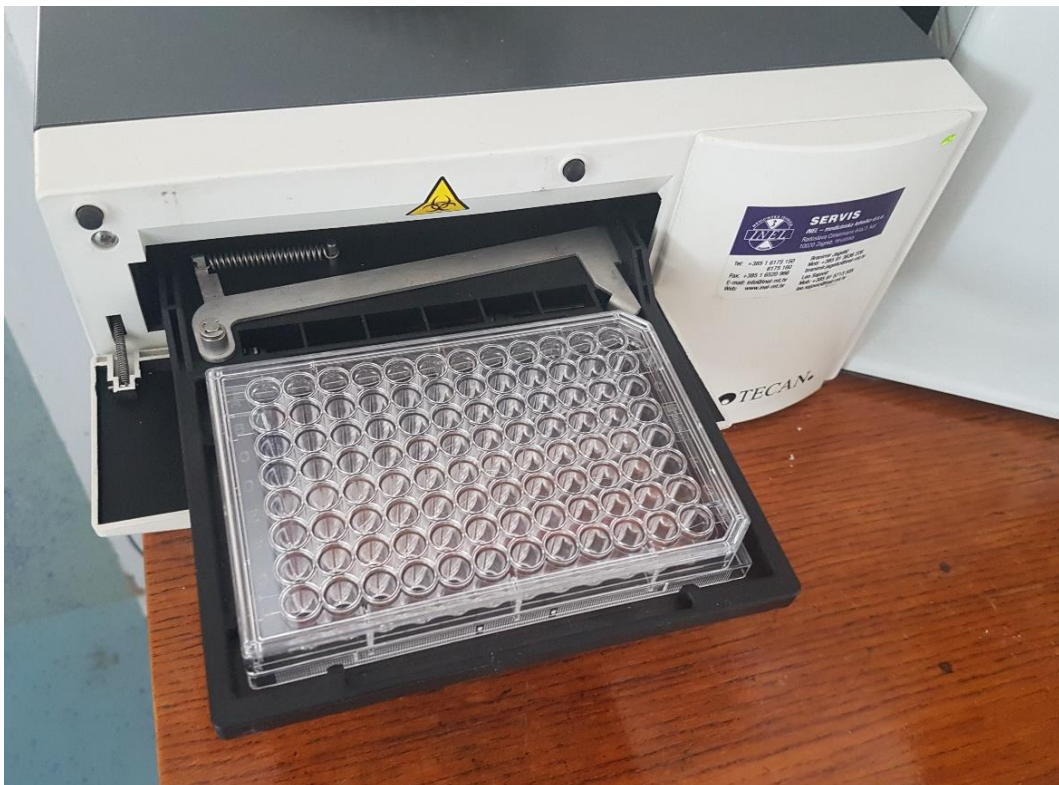
Turbidimetrijskom metodom ispitano je antibakterijsko djelovanje otopine citrinina u etanolu u koncentracijama $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ prema test-mikroorganizmima. Određivanja antibakterijskog djelovanja provedena su u paraleli. Kontrolni uzorak sadrži osim suspenzije kulture test-mikroorganizma samo otapalo, etanol.

U jažice mikrotitarske pločice dodaje se po $240 \mu\text{L}$ otopine citrinina koncentracija $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ odnosno $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ i po $10 \mu\text{L}$ suspenzije prekoćne kulture test-mikroorganizma prethodno uzgojenog u hranjivim bujonu odnosno YPM bujonu. Kontrolu čine $240 \mu\text{L}$ etanola sa $10 \mu\text{L}$ suspenzije test-mikroorganizama.

Antibakterijsko djelovanje citrinina na odabраних 6 bakterijskih kultura praćeno je tijekom 72 h (2, 4, 6, 24, 48 i 72 h) uzgoja na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ za bakterije *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*, odnosno na $28 \text{ }^\circ\text{C}$ za *Gluconobacter oxydans*. Djelovanje se određuje spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije na valnoj duljini 620 nm pomoću čitaća mikrotitarskih pločica (slika 4 i slika 5). Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole i uzoraka suspenzije test-mikroorganizama s otopinama citrinina razlićitih koncentracija, mjera je inhibicije rasta test-mikroorganizama. Mjerenja su provedena u 0., 2., 4., 6., 24., 48. i 72. satu.



Slika 4. Mikrotitarska pločica s nacijepljenim uzorcima (vlastita fotografija)



Slika 5. Čitač mikrotitarskih pločica (vlastita fotografija)

3.2.4. Određivanje broja živih stanica

Temelj praćenja broja živih stanica tijekom uzgoja jest porast kolonija mikroorganizama koje porastu iz svake pojedinačne stanice (stanice koje tvore kolonije; eng. CFU, *Colony Forming Units*). To je neizravna metoda određivanja i praćenja broja živih stanica. Na čvrstu podlogu u Petrijevim zdjelicama naciepljuje se poznati volumen odgovarajućeg decimalnog razrjeđenja mikrobne kulture, zatim slijedi inkubacija na odgovarajućoj temperaturi tijekom 72 h nakon čega su na podlozi vidljive pojedinačne kolonije koje je moguće prebrojati. Dobivene vrijednosti izražavaju se kao jedinice CFU mL⁻¹.

Praćenje broja živih stanica provedeno je kroz 72 h uzgoja (0., 24., 48. i 72. h). Za svaku bakterijsku kulturu pratio se broj živih stanica u suspenziji bez dodanog citrinina te sa dodanom otopinom citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹. Iz pripremljenih uzoraka nakon 0., 24., 48. i 72. sata pokusa načinjene su serije decimalnih razrjeđenja u umjeru 1:10. Pripremljeno je 6 decimalnih razrjeđenja za svaki uzorak, a na hranjivi agar i YPM agar naciepljeno je po 10 µL određenog decimalnog razrjeđenja. Na opisani način, naciepljene hranjive podloge s uzorcima *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* i *S. aureus* su inkubirane na 37 °C odnosno s uzorcima *G. oxydans* na 28 °C kroz 72 h. Porasle kolonije prebrojane su na brojaču kolonija, a CFU je određen pomoću formule 1:

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen naciepljenog uzorka}} * \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja (jed mL}^{-1}\text{)} [1]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Citrinin je mikotoksin koji je značajno manje istraživani od primjerice okratoksina A, aflatoksina B₁ ili patulina. Podaci o pojavnosti tog mikotoksina, a posebice podaci o njegovoj antimikrobnoj aktivnosti u dosadašnjoj su literaturi vrlo ograničeni. Iako je poznata široka antibakterijska aktivnost citrinina još od njegova otkrića, citrinin se nikada nije koristio kao lijek zbog, prvenstveno nefrotoksičnosti, ali i negativnog utjecaja na jetru i druge organe. Kako su u literaturi najzastupljeniji podaci upravo o toksičnosti citrinina, cilj je ovog rada bio ispitati antibakterijsku aktivnost na: *Escherichia coli* (3014), *Salmonella typhimurium* (3064), *Pseudomonas aeruginosa* (3024), *Listeria monocytogenes* (3112), *Staphylococcus aureus* (3048) i *Gluconobacter oxydans* (6160). Od 6 odabranih bakterija, 4 su gram-negativne i 2 gram-pozitivne kako bi se mogao ustvrditi upravo široki spektar aktivnosti citrinina i osjetljivost navedenih test-mikroorganizama.

Za određivanje antibakterijske aktivnosti korištene su disk difuzijska metoda te turbidimetrijska metoda, a pratio se i broj živih stanica. Disk difuzijskom metodom određen je promjer zona inhibicije nakon 24 sata, turbidimetrijskom metodom određivana je apsorbancija pri 620 nm nakon 0., 2., 4., 6., 24., 48., i 72. sata pokusa, a broj živih stanica određen je na samom početku, dakle 0. sat te nakon 24., 48., i 72. sata.

Ispitivana je antibakterijska aktivnost citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹. Navedene koncentracije odabrane su prema dostupnoj literaturi, prema kojoj je antimikrobna aktivnost citrinina određivana u rasponu koncentracija od 3 do 400 µg mL⁻¹ pri čemu za većinu bakterijskih sojeva uopće nije detektirana aktivnost citrinina ispod koncentracija od 50 µg mL⁻¹, bez aktivnosti ili vrlo slaba aktivnost detektirana je oko koncentracije od 50 µg mL⁻¹ citrinina, a koncentracije veće od 250 µg mL⁻¹ uglavnom su za korištene bakterijske sojeve pokazivale znatnu aktivnost primjenjujući iste navedene metode. Iz tog razloga su odabrane koncentracije od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ citrinina kako bi razlike u osjetljivosti pojedinih bakterijskih vrsta bile što uočljivije.

4.1. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE CITRININA ODREĐENO DISK DIFUZIJSKOM METODOM

Kako bi utvrdili antibakterijsku aktivnost citrinina na rast test-mikroorganizama, primijenjena je disk difuzijska metoda, koja se je pokazala kao jednostavna, brza i jeftina. Metoda omogućuje utvrđivanje osjetljivosti mikroorganizma na više agensa ili na više različitih koncentracija nekog agensa istovremeno, ali disk difuzijskom metodom nije moguće odrediti djeluje li spoj mikrobiocidno ili mikrobiostatički. Disk difuzijskom metodom, mjerenjem promjera zona inhibicije na čvrstim podlogama u Petrijevim zdjelicama određeno je antibakterijsko djelovanje citrinina u koncentracijama od 100 i 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Pokusi su provedeni u paralelama, a kao konačni rezultat izračunata je srednja vrijednost zona inhibicije.

Rezultati istraživanja izraženi su kao srednje vrijednosti izmjerenih promjera zona inhibicije rasta svih test-mikroorganizama i prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Zone inhibicije (mm) rasta odabranih bakterija u prisutnosti citrinina

Koncentracija citrinina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Promjeri zona inhibicije za test-mikroorganizme (mm)					
	<i>E. coli</i> (3014)	<i>S. typhimurium</i> (3064)	<i>P. aeruginosa</i> (3024)	<i>G. oxydans</i> (6160)	<i>L. monocytogenes</i> (3112)	<i>S. aureus</i> (3048)
100	0	0	17	2	25,5	22
200	20	17,5	22,5	11	16,5	13

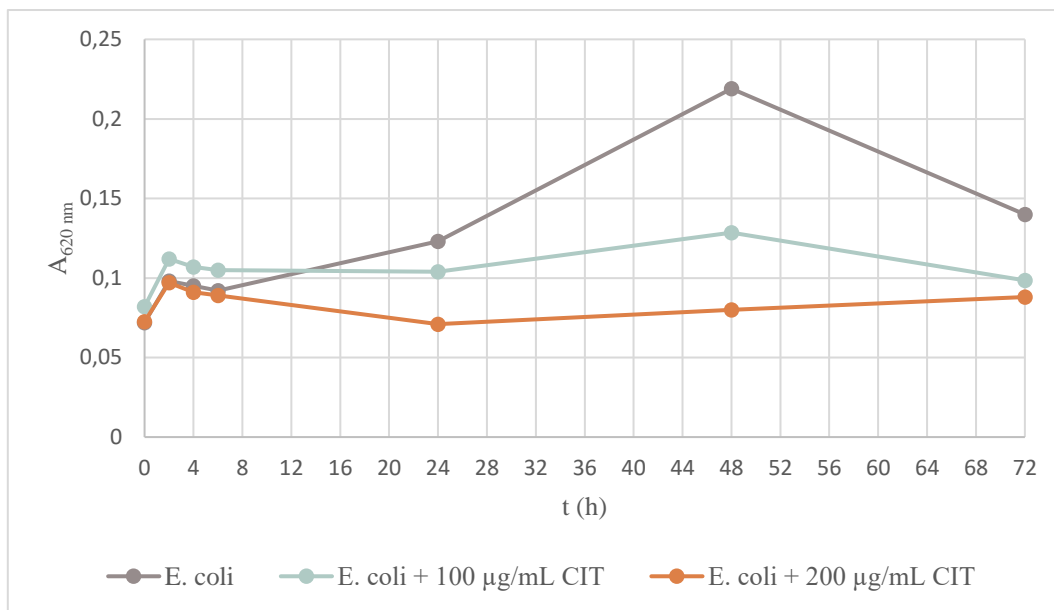
Rezultati dobiveni disk difuzijskom metodom ukazuju da citrinin u koncentraciji od 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazuje antibakterijsko djelovanje prema *Pseudomonas aeruginosa* (3024), *Gluconobacter oxydans* (6160), *Listeria monocytogenes* (3112) i *Staphylococcus aureus* (3048) dok ne djeluje na *Escherichia coli* (3014) i *Salmonella typhimurium* (3064). Koncentracija citrinina od 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazala je antimikrobnu djelotvornost prema svim test-mikroorganizmima.

Pri 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina najveći promjer zone inhibicije rasta zabilježen je kod *Listeria monocytogenes* (3112) i iznosi 25,5 mm. Promjer zone inhibicije rasta kod *Staphylococcus aureus* (3048) je 22 mm. S koncentracijom citrinina od 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ promjer zone inhibicije za *Listeria monocytogenes* (3112) iznosi 16,5 mm, a za *Staphylococcus aureus* (3048) 13 mm. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da su manje koncentracije citrinina izazvale veću inhibiciju rasta (tablica 1). Mazumder i sur. (2002) s istim koncentracijama citrinina iznose slične rezultate

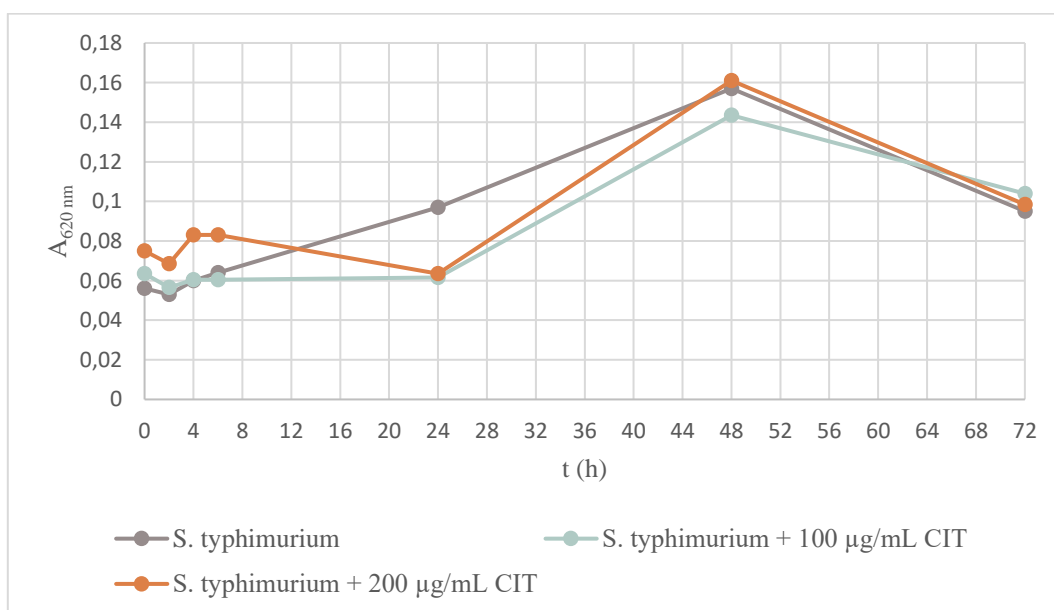
antibakterijskog djelovanja prema odabranom soju *Staphylococcus aureus* gdje koncentracija citrinina od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ izaziva veću inhibiciju rasta od koncentracije $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Iako u tom istraživanju autori ne ispituju djelovanje citrinina prema niti jednom soju iz roda *Listeria* ili *Gluconobacter*, ispitano je djelovanje na različite sojeve *E. coli*, *S. typhimurium* te na jedan soj iz roda *Pseudomonas* i ti rezultati su u skladu s dobivenim rezultatima ovog istraživanja. Za navedene test-mikroorganizme dokazano je da citrinin uzrokuje sve veću inhibiciju rasta s povećanjem koncentracije citrinina. Kao što je prikazano u tablici 1, razlika u promjerima zona inhibicije za *Pseudomonas aeruginosa* (3024) za ispitivane koncentracije citrinina u ovom se istraživanju najmanje razlikuju. Promjer zone inhibicije s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ svega je 1,3 puta veći od promjera zone inhibicije s $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina. Rezultati disk difuzijske metode upućuju na značajnu razliku u osjetljivosti *Gluconobacter oxydans* na različite primijenjene koncentracije citrinina. Razlika je 5,5 puta veći promjer zone inhibicije kad je primijenjena koncentracija $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2. KRIVULJA RASTA BAKTERIJA U PRISUTNOSTI CITRININA

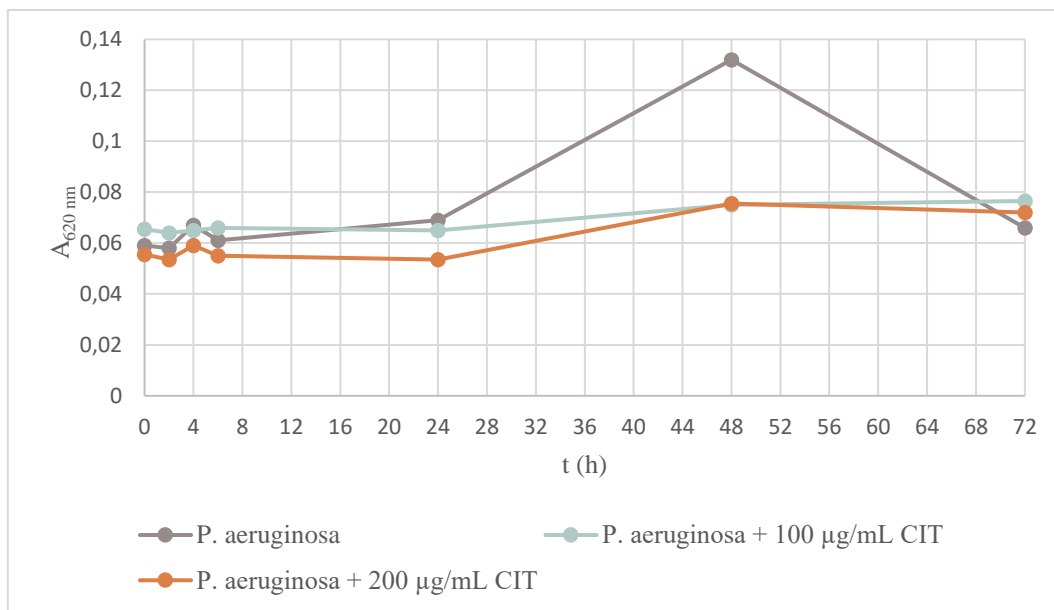
Rezultati antibakterijskog djelovanja citrinina na ispitivane test-mikroorganizme: *Escherichia coli* (3014), *Salmonella typhimurium* (3064), *Pseudomonas aeruginosa* (3024), *Gluconobacter oxydans* (6160) te *Listeria monocytogenes* (3112) i *Staphylococcus aureus* (3048) dobiveni turbidimetrijskom metodom prikazani su kao krivulja rasta (slike 6–11).



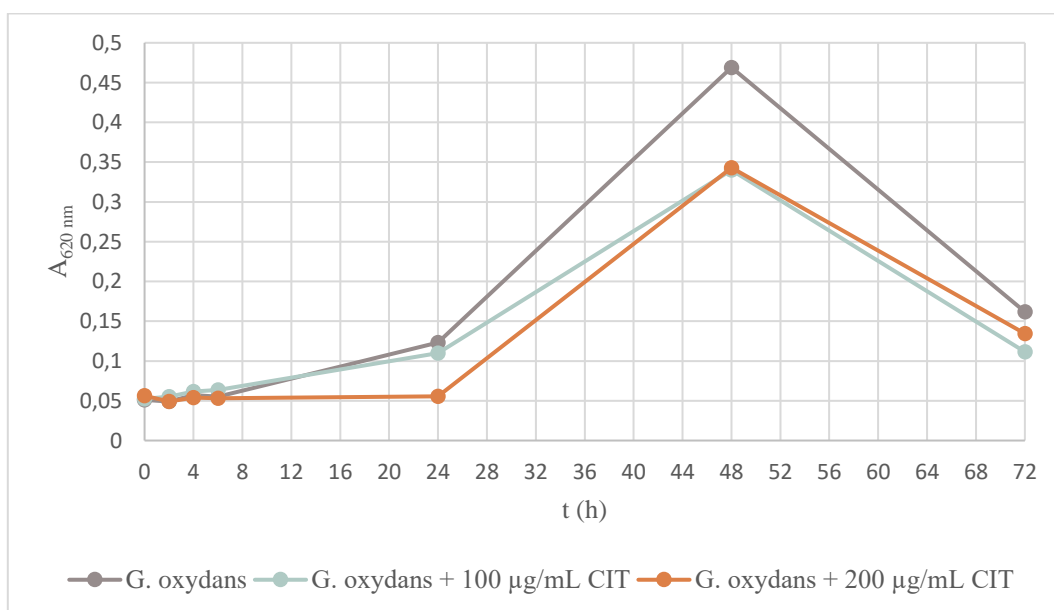
Slika 6. Krivulja rasta bakterije *Escherichia coli* (3014) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja



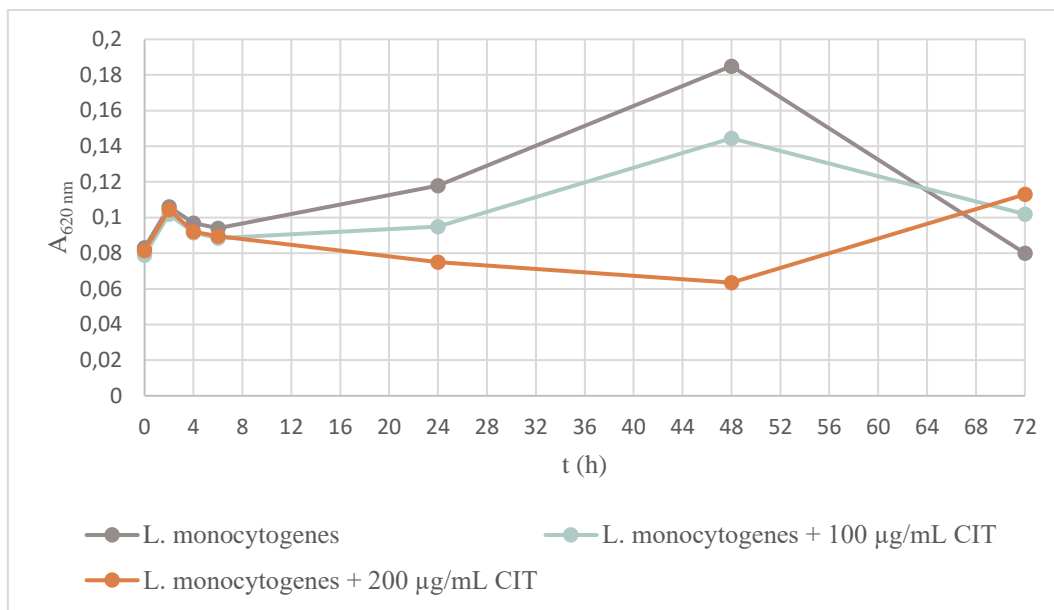
Slika 7. Krivulja rasta bakterije *Salmonella typhimurium* (3064) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja



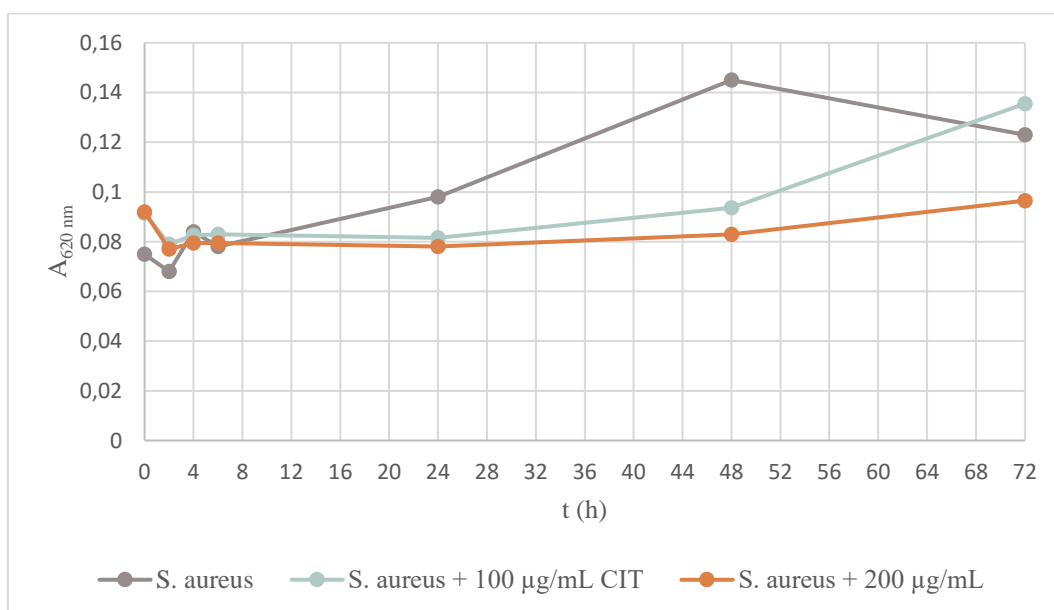
Slika 8. Krivulja rasta bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (3024) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja



Slika 9. Krivulja rasta bakterije *Gluconobacter oxydans* (6160) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja



Slika 10. Krivulja rasta bakterije *Listeria monocytogenes* (3112) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja



Slika 11. Krivulja rasta bakterije *Staphylococcus aureus* (3048) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja

Turbidimetrijskom metodom utvrđena je antibakterijska aktivnost citrinina na *Escherichia coli* (3014) u obje istraživane koncentracije ovog mikotoksina (slika 6). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da u kontrolnom uzorku *E. coli* u 6. satu uzgoja ulazi u eksponencijalnu fazu rasta koja traje do 48. sata nakon kojega se broj stanica smanjuje i krivulja ulazi u fazu odumiranja. U pokusima s koncentracijom citrinina od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ bakterija ulazi u eksponencijalnu fazu rasta tek u 24. satu, a faza odumiranja se uočava nakon 48. sata. U prisutnosti $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina eksponencijalna faza rasta je izostala, iako se nakon 24. sata uočava neznatni porast stanica koji se nastavlja do 72. sata. Nakon 24 sata uzgoja uočena je značajna inhibicija rasta, a najveća se postiže u 48. satu i nastavlja sve do 72. sata.

Salmonella typhimurium (3064) najosjetljivija je na djelovanje citrinina tijekom prvih 24 sata izloženosti. Kroz prva 24 h uzgoja *Salmonella typhimurium* (3064) u kontrolnom uzorku ulazi u eksponencijalnu fazu rasta, što se ne uočava u uzorcima u koje je dodan citrinin ni u jednoj od ispitivanih koncentracija pa je upravo u 24. satu određena najveća antibakterijska aktivnost obje koncentracije citrinina na ovu bakteriju. Prema izmjerenim apsorbancijama na 620 nm utvrđena je gotovo jednaka inhibicija rasta za obje ispitivane koncentracije citrinina. Kroz iduća 24 sata, što je vidljivo na slici 7, *Salmonella typhimurium* pokazuje vrlo brzu prilagodbu na djelovanje mikotoksina. U uzorku s $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ prisutnog citrinina, 48. sat je određena manja inhibicija rasta nego u 24. satu, a uopće nije određena inhibicija rasta *S. typhimurium* u uzorku s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tijekom prva 24 sata uzgoja uočeno je slabo djelovanje citrinina na rast *Pseudomonas aeruginosa* (3024) uz dodatak obje koncentracije citrinina (slika 8). Antibakterijsko djelovanje najjače je nakon 48 sati izloženosti, a postignuta inhibicija rasta u 48. satu gotovo je jednaka sa $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ i sa $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina.

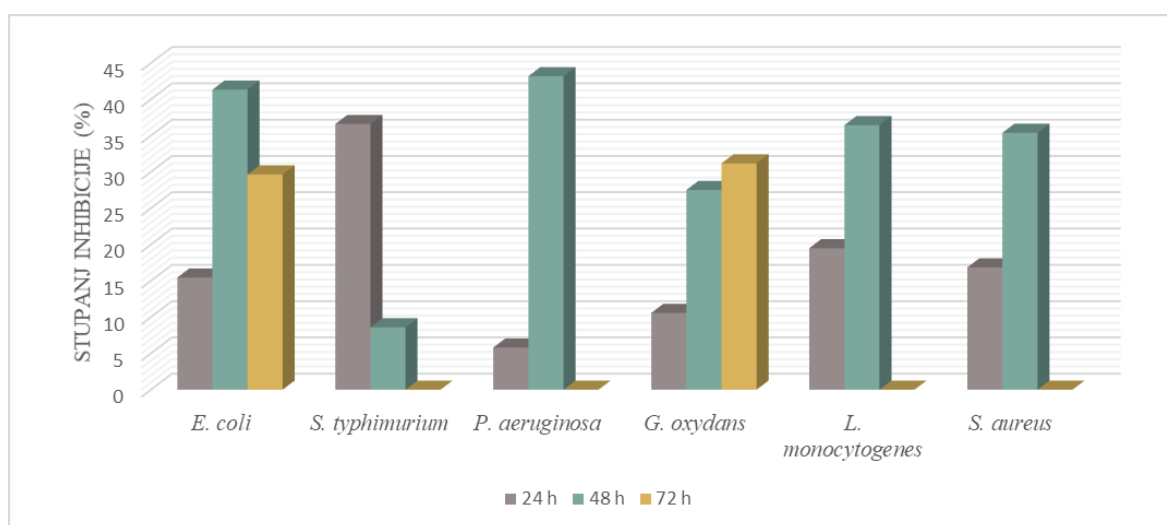
Krivulja rasta bakterije *G. oxydans* pokazuje iste faze rasta i u kontrolom uzorku i u uzorcima s obje koncentracije citrinina. Lag faza u kojoj se stanice prilagođavaju na okolišne uvjete je duga i traje do 24. sata kada bakterija ulazi u eksponencijalnu fazu rasta. Povećanje broja stanica traje do 48. sata nakon kojega se na slici 9 uočava faza odumiranja. Na *Gluconobacter oxydans* (6160) u koncentraciji od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinin kroz prva 24 sata ne pokazuje značajnije djelovanje. Veća inhibicija rasta postiže se s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon 48-satne izloženosti citrininu postiže se vrlo slična inhibicija rasta ove bakterije za obje koncentracije. U 72. satu vidljiva je veća inhibicija rasta sa manjom koncentracijom citrinina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), dok je s većom ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) inhibicija manja. Na slici 9 može se uočiti da se s manjom od odabranih koncentracija citrinina, s vremenom izlaganja, postiže u svakom slijedećem mjerenju

veća inhibicija rasta *G. oxydans*. Nasuprot tome, što je *G. oxydans* dulje izložen koncentraciji od $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ stanice se na tu veću koncentraciju uspjevaju djelomično prilagoditi pa se samim time s vremenom izlaganja inhibicija rasta smanjuje.

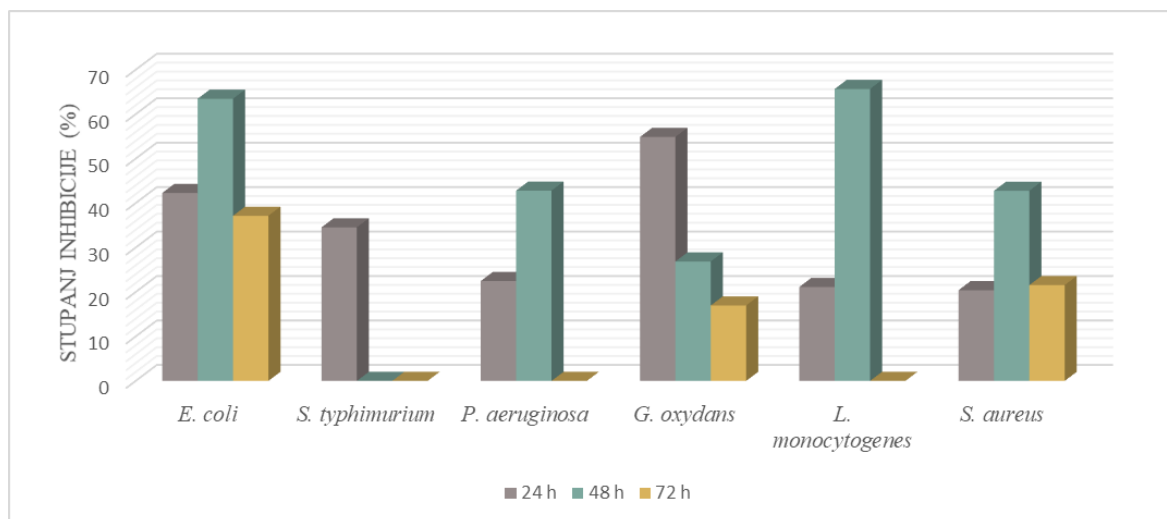
Turbidimetrijska metoda određivanja antibakterijskog djelovanja citrinina na *Listeria monocytogenes* (3112) pokazuje osjetljivost ove bakterije na obje koncentracije citrinina. Na slici 10 je vidljivo da krivulja rasta bakterije dobivena u prisutnosti $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina prati krivulju rasta bakterije u kontrolnom uzorku. Lag faza traje do 6. sata, a zatim nastupa eksponencijalna faza intenzivnog rasta do 48. sata kada se počinje smanjivati broj stanica i bakterija ulazi u fazu odumiranja. U prisutnosti $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, stanice su u lag fazi do 48. sata nakon kojega ulaze u log fazu rasta. Veća inhibicija je postignuta s većom koncentracijom citrinina i nakon 24 i 48 sata uzgoja, što proturječi rezultatima disk difuzijske metode. Najveća inhibicija rasta dobivena je u 48. satu uzgoja u prisutnosti obje koncentracije citrinina.

Rezultati turbidimetrijske metode i za *Staphylococcus aureus* (3048) oprečni su onima dobivenih disk difuzijskom metodom. Na slici 11 uočava se gotovo podjednak učinak obje koncentracije citrinina na *Staphylococcus aureus* nakon 24 h uzgoja. Nakon dužeg izlaganja (48 sati) stanica citrininu postiže se najveća inhibicija rasta, a nešto je veća u uzorku s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Iz dobivenih apsorbancija na 620 nm određen je i postotak inhibicije rasta nakon 24, 48 i 72 sata izloženosti citrininu u ispitivanim koncentracijama te su rezultati prikazani na slikama 12 i 13.



Slika 12. % inhibicije rasta bakterija tijekom 24, 48 i 72 sata izloženosti citrininu koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$



Slika 13. % inhibicije rasta bakterija tijekom 24, 48 i 72 sata izloženosti citrininu koncentracije $200 \mu\text{g mL}^{-1}$

U prisutnosti citrinina koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, postignuta inhibicija rasta *Escherichia coli* (3014) u 24. satu pokusa iznosi 15,45%, a uz dodatak $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina 42,28%. Nakon 48 sati izlaganja postiže se najveći antibakterijski učinak s obje ispitivane koncentracije. Dok je inhibicija sa $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina 41,32%, maksimalna inhibicija rasta od 63,47% postiže se s većom koncentracijom ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). Do 72. sata uzgoja stanice ulaze u fazu odumiranja pa je i inhibicija rasta u tom vremenu manja za obje koncentracije citrinina. U uzorcima gdje je uz *E. coli* prisutno $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina inhibicija rasta je 29,64%, a s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ 37,14%. Najveća aktivnost citrinina na rast *E. coli* postiže se nakon 48-satne izloženosti koncentraciji od $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slike 12 i 13).

Inhibicija rasta bakterije *S. typhimurium* nakon 24 h uzgoja sa $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina je 36,6% i ta je vrijednost gotovo ista postignutoj inhibiciji rasta s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina koja iznosi 34,54%. Od 24. do 48. sata *S. typhimurium* se prilagođava na prisutnost citrinina u mediju te se inhibicija od 36,6% u uzorku s $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ određena 24. sat smanjuje na svega 8,6% u 48. satu, dok u isto vrijeme u uzorku s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina uopće nije određena inhibicija rasta (slike 12 i 13). To upućuje na prilagodbu i jaču rezistenciju bakterija izloženih većim koncentracijama mikotoksina.

Za *Pseudomonas aeruginosa* (3024), nakon 24-satne izloženosti citrininu, određena je inhibicija od svega 5,8% uz dodatak $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina te 22,46% uz $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina.

Antibakterijsko djelovanje najjače je nakon 48 sati. U uzorku sa $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina postiže se inhibicija od 43,18% što je gotovo jednako vrijednostima (42,8%) dobivenih s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

U uzorcima *Gluconobacter oxydans* (6160) u koje je dodano $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina 24. sat određena je inhibicija od 10,57%, 48. sat 27,5%, a 72. sat određena je najveća inhibicija od 31,17%. Sa $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina, nakon 24 sata se postiže inhibicija rasta od 54,88% (slično rezultatima disk difuzijske metode, postiže se 5,2 puta veća inhibicija rasta s većom koncentracijom citrinina). Nakon 48 sati, određena inhibicija s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ je vrlo slična onoj postignutoj u uzorku sa manjom koncentracijom citrinina i iznosi 26,87% (slike 12 i 13), a nakon 72 sata 16,98%. Najznačajnije djelovanje citrinina na bakteriju *Gluconobacter oxydans* postiže se nakon 24-satne izloženosti koncentraciji od $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 13). Za to vrijeme postignuta je najveća inhibicija rasta dok se djelomično i stigne oporaviti nakon izlaganja idućih 24 sata pa je u idućem mjerenju postotak inhibicije manji, a najmanji u posljednjem mjerenju 72. sat. Za razliku od toga, s citrininom u koncentraciji od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ postotak inhibicije se povećava u svakom idućem mjerenju.

Nakon 24. sata izloženosti bakterije *Listeria monocytogenes* (3112) inhibicija s $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ iznosi 19,49%, a s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, 21,13%. Do 48. sata postiže se 36,44% s nižom koncentracijom te 65,68% s višom koncentracijom citrinina.

Prema izmjerenim apsorbancijama u 24. satu preračunate inhibicije rasta *Staphylococcus aureus* (3048) su 16,84% (koncentracija citrinina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) i 20,41% (koncentracija citrinina $200 \mu\text{g mL}^{-1}$). Nakon izlaganja stanica 48 sati postiže se najveća inhibicija od 42,76% s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nešto je manja s $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; 35,38%.

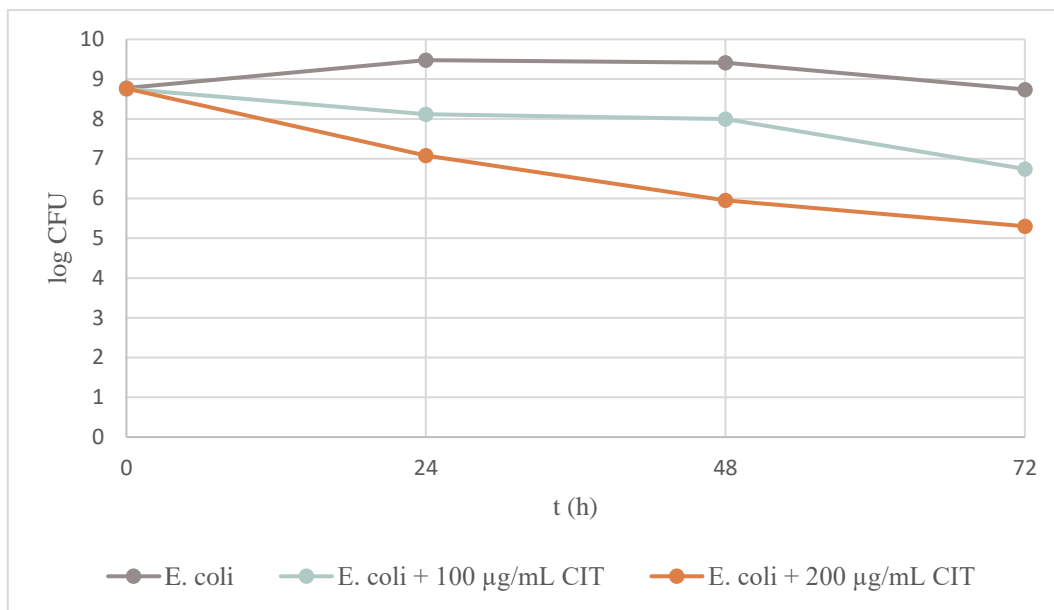
Turbidimetrijskom metodom dokazana je aktivnost citrinina u obje ispitivane koncentracije prema svim test-mikroorganizmima. Rezultati pokazuju da na četiri od šest odabranih test-mikroorganizama citrinin pokazuje najjači antibakterijski učinak kroz 48 sati izlaganja bakterija tom mikotoksinu. Za *Escherichia coli* (3014), *Listeria monocytogenes* (3112) i *Staphylococcus aureus* (3048) je kroz 48 sati izloženosti $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentraciji citrinina postignuta najveća inhibicija, dok je za *Pseudomonas aeruginosa* (3024) najveća postignuta inhibicija s $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ vrlo slična onoj postignutoj s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ te je u ovom slučaju kroz 48-satnu izloženost najmanja razlika među korištenim koncentracijama. *Salmonella typhimurium* (3064) pokazuje vrlo brzu prilagodbu, te je najveća inhibicija rasta postignuta već nakon 24 sata izlaganja citrininu, kao i u slučaju *P. aeruginosa*, uz razmjerno malu razliku u postocima inhibicije za primijenjene koncentracije. *Gluconobacter oxydans*

(6160) također pokazuje sposobnost prilagodbe i to ponajprije prema višoj koncentraciji citrinina. S $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ inhibicija rasta *G. oxydans* se smanjuje od 24. do 48. i konačno do 72. sata, dok se nasuprot tome ne uspijeva prilagoditi u prisutnosti $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri čemu se od 24. sata do 72. sata stupanj inhibicije u ovom slučaju samo povećava. Za razliku od *Salmonella typhimurium*, osim o samom vremenu izlaganja, na prilagodbu *Gluconobacter oxydans* utječe i sama primijenjena koncentracija citrinina.

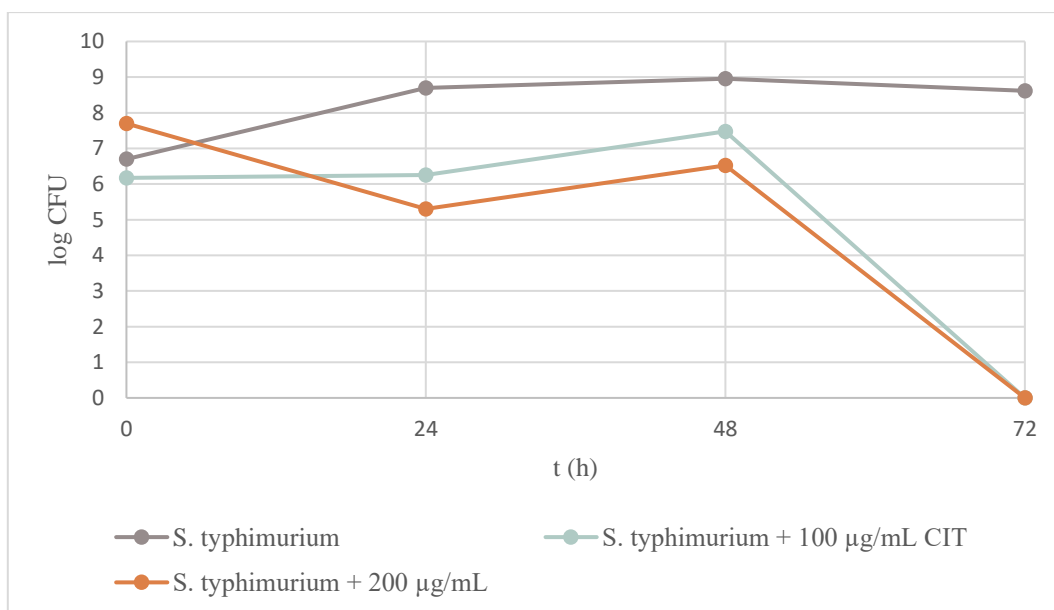
Rezultati dobiveni disk difuzijskom metodom i turbidimetrijskom metodom podudarni su za *Pseudomonas aeruginosa* i *Gluconobacter oxydans*, s druge strane, oprečni su za *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*. Za *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* vrlo je teško uopće uspoređivati rezultate. Pri nižoj koncentraciji citrinina uopće nije došlo do inhibicije rasta odnosno pojave zona inhibicije kod bakterija *Escherichia coli* (3014) i *Salmonella typhimurium* (3064) što se podudara s istraživanjem Devija i suradnika (2009) koji za *E. coli* i *S. typhimurium* uočavaju zonu inhibicije rasta manju od 1 mm, dok se u jednakim uvjetima jasno vidi zona inhibicije za *P. aeruginosa* i *S. aureus*.

4.3. PREŽIVLJAVANJE ODABRANIH BAKTERIJA U PRISUTNOSTI CITRININA

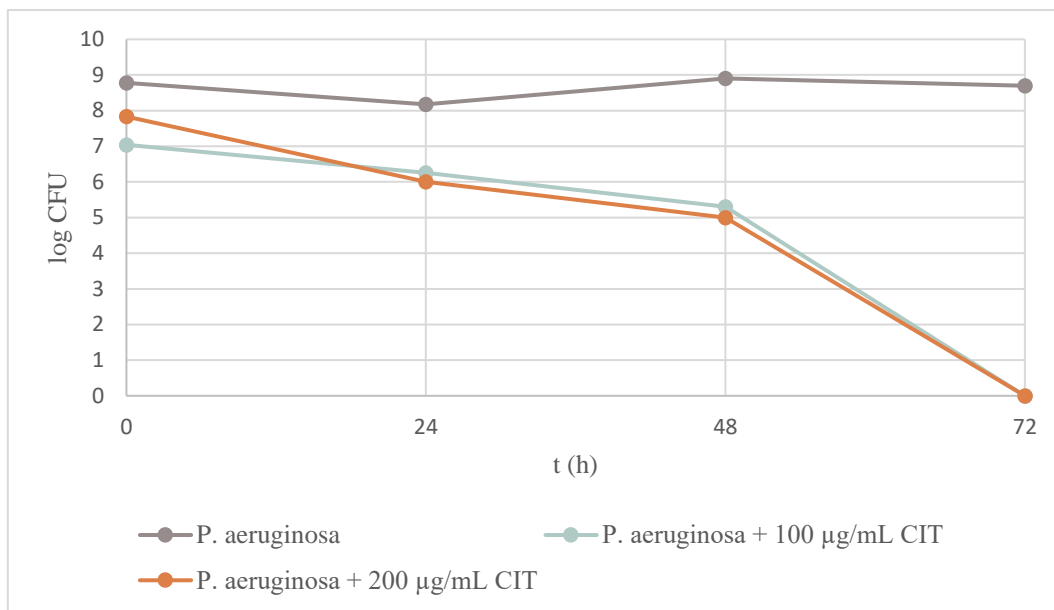
Neizravnom (posrednom) metodom određivanja broja živih stanica praćeno je preživljavanje odabranih bakterija u prisutnosti citrinina tijekom 72 sata uzgoja, a rezultati istraživanja prikazani su na slikama 14 – 19.



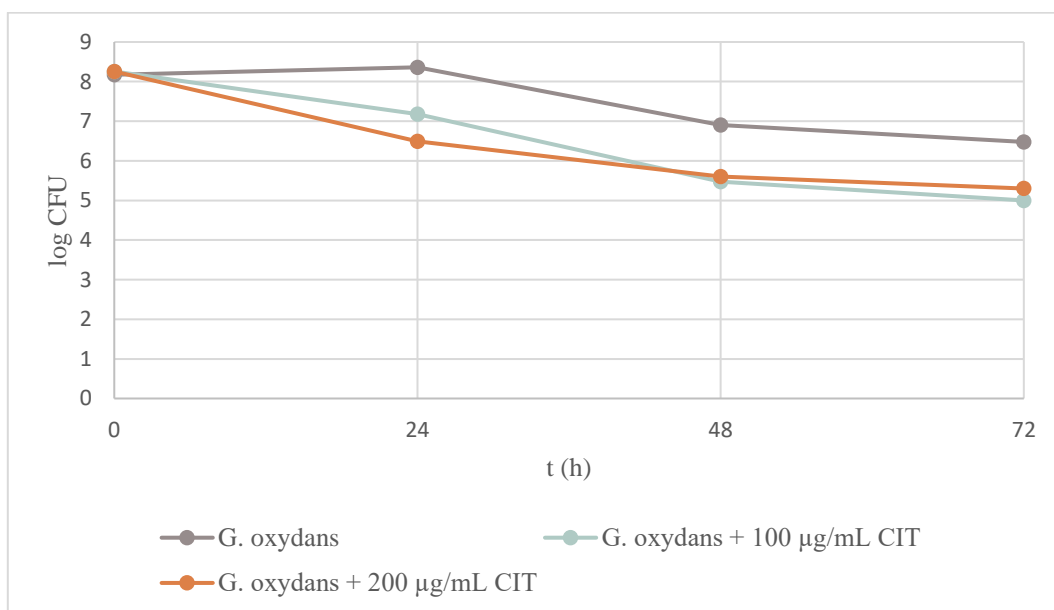
Slika 14. Broj živih stanica bakterije *Escherichia coli* (3014) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja



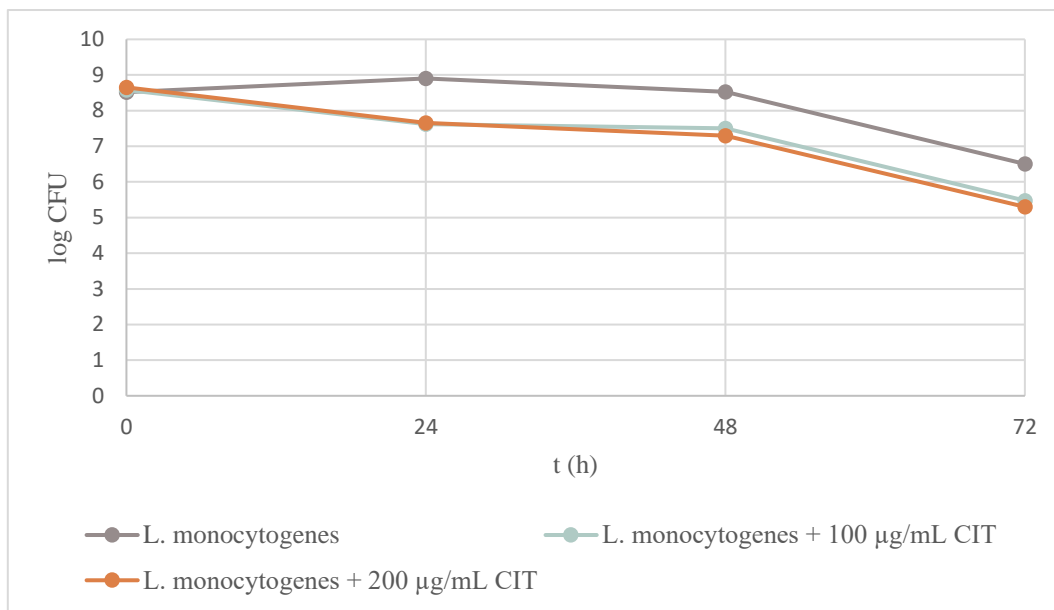
Slika 15. Broj živih stanica bakterije *Salmonella typhimurium* (3064) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja



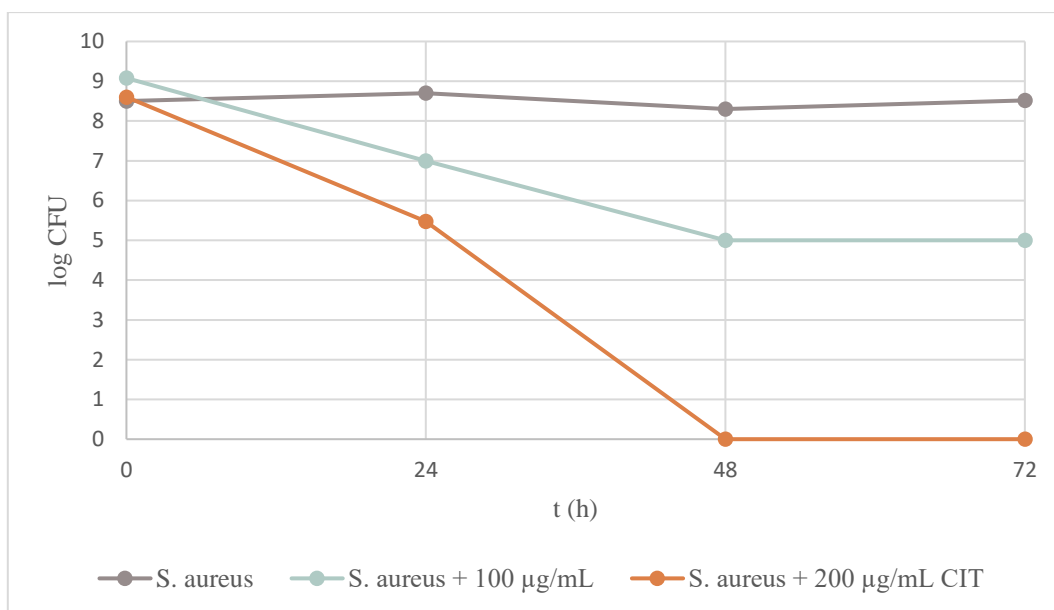
Slika 16. Broj živih stanica bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (3024) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja



Slika 17. Broj živih stanica bakterije *Gluconobacter oxydans* (6160) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja



Slika 18. Broj živih stanica bakterije *Listeria monocytogenes* (3112) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja



Slika 19. Broj živih stanica bakterije *Staphylococcus aureus* (3048) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 µg mL⁻¹ i 200 µg mL⁻¹ tijekom 72 sata uzgoja

Tablica 2. Preživljavanje (%) bakterija u prisutnosti citrinina

vrijeme konc. citrinina test-mikroorganizam		Preživljavanje (%)							
		0 h		24 h		48 h		72 h	
		100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>E. coli</i>		99,75	99,83	85,62	74,7	84,97	63,24	77,12	60,65
<i>S. typhimurium</i>		92,19	100	71,91	60,94	83,5	72,8	0	0
<i>P. aeruginosa</i>		80,21	89,23	76,51	73,84	59,54	56,16	0	0
<i>G. oxydans</i>		100	100	85,82	77,63	79,34	81,15	77,19	81,84
<i>L. monocytogenes</i>		100	100	85,62	85,96	87,97	85,58	84,2	81,5
<i>S. aureus</i>		100	100	80,7	62,96	60,23	0	58,69	0

Broj živih stanica *Escherichia coli* (3014) u prisutnosti citrinina u koncentraciji $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do 24. sata je u padu te se značajnije ne mijenja do 48. sata (slika 14). U 24. satu ukupan postotak preživljavanja iznosi 85,62%, u 48. satu 84,97%. Do 72. sata ukupan broj živih stanica *E. coli* sa $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ smanji se s početnog broja (log CFU je 8,76) za 2 logaritamske jedinice (log CFU 6,74). U uzorku s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina broj živih stanica u konstantnom je padu od početka pokusa do 72. sata. Do 24. sata uočen je najveći pad broja stanica. Ukupan postotak preživljavanja je 74,7% stanica. Nakon 48. sati 63,24%, a nakon 72 sata 60,65% (tablica 2). Od početnog broja, kroz 72 h, broj se živih stanica smanji za 3 log jedinice.

Salmonella typhimurium (3064) u kontrolnom uzorku prvih 24 h ulazi u eksponencijalnu fazu rasta. U uzorku sa $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina broj živih stanica se značajnije ne mijenja, a u uzorku s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ uočljiv je značajan pad od 2 log jedinice. Od 24. do 48. sata *S. typhimurium* se uspjeva prilagoditi na djelovanje citrinina i na slici 15 je vidljiv porast broja živih stanica u obje ispitivane koncentracije i veći u oba slučaja za 1 log jedinicu. Preživljavanje *S. typhimurium* sa $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ povećava se s 71,91% u 24. h na 83,5% u 48. h, a s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ povećava se s 60,94% u prvih 24 sata na 72,8% nakon 48 sati. Do 72. sata dolazi do naglog odumiranja stanica u uzorcima s citrininom (tablica 2).

Kao što je prikazano na slici 16, broj živih stanica *Pseudomonas aeruginosa* (3024) je u prisutnosti citrinina u stalnom padu od početka do kraja pokusa. Vrijednosti su vrlo slične za obje koncentracije i kroz 24 sata dolazi do smanjenja broja živih stanica za 1 log jedinicu ($76,51\%$ preživjelih stanica sa $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $73,84\%$ preživjelih stanica sa $200 \mu\text{g mL}^{-1}$), a do 48 sata broj se s početnog smanjuje za 2 log jedinice ($59,54\%$ preživjelih sa manjom i $56,16\%$ preživjelih stanica s većom koncentracijom citrinina) (slika 16 i tablica 2). Kao i u uzorcima sa *S. typhimurium*, u 72. satu u uzorcima s citrininom nisu dokazane žive stanice *P. aeruginosa*.

Broj živih stanica *Gluconobacter oxydans* (6160) u uzorcima s citrininom u obje koncentracije do 24. sata je u padu, a nešto veći pad uočava se u uzorku s 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 17). Kroz prva 24 sata broj živih stanica se s početnog smanjio za 1 log jedinicu sa manjom koncentracijom, a čak za 2 log jedinice s većom odabranom koncentracijom citrinina. U uzorku s 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ određeno je 85,82% preživjelih bakterija, s 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 77,63% (tablica 2). Od 24. do 48. sata broj živih stanica s citrininom nastavlja opadati, ali je uočeno da je taj pad nešto manji za stanice s 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina i razlika u broju živih stanica sada je 1 log jedinica, a za uzorak sa 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ broj pada za 2 log jedinice. Iako se do 72. sata broj stanica više značajnije ne mijenja, određeno je nešto veće preživljavanje stanica u uzorku s 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina od 81,84%, dok je sa 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 77,19%.

Broj živih stanica bakterije *Listeria monocytogenes* (3112) u prisutnosti citrinina u koncentracijama od 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gotovo da se i ne razlikuje kroz 72 sata pokusa (slika 18). U prvih 24 sata broj živih stanica smanjuje se za 1 log jedinicu i ostaje otprilike isti tijekom idućih 24 sata. Tek 72. sat je broj manji za još dvije log jedinice. Preživljavanje stanica u ovom je slučaju za svako određivanje veće od 81,5%.

100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina tijekom 24 sata izloženosti uzrokuje smanjenje broja živih stanica *Staphylococcus aureus* (3048) za 2 log jedinice (početni log CFU je 9,08, nakon 24 h log CFU pada na 7) uz 80,7% preživjelih stanica. 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za isto vrijeme uzrokuje pad broja živih stanica za čak 3 log jedinice uz preživljavanje 62,96% (tablica 2). U 48. satu dolazi do daljnjeg smanjenja za 2 log jedinice u uzorku sa 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i taj broj se ne mijenja do 72. sata (60,23% i 58,69% živih stanica). 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina je do 48. sata uzrokovalo odumiranje stanica (slika 19 i tablica 2).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Citrinin u koncentracijama od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazuje određeno antibakterijsko djelovanje na sve odabrane bakterije, iako postoje odstupanja u rezultatima u ovisnosti o primijenjenoj metodi.
2. Disk difuzijska metoda se pokazala kao dobra preliminarna metoda za određivanje antibakterijskog djelovanja citrinina.
3. Najjače antibakterijsko djelovanje citrinina dokazano turbidimetrijskom metodom je nakon 48 sati uzgoja za sve odabrane patogene bakterije, osim za *Salmonella typhimurium*.
4. Iz rezultata turbidimetrijske metode može se zaključiti da se bakterija *Salmonella typhimurium* nakon 24. sata uzgoja prilagodila nepovoljnim uvjetima, jer je zabilježena neznatna inhibicija rasta s koncentracijom citrinina od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 48. satu uzgoja, dok s $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ citrinina inhibicija nije dokazana.
5. *Pseudomonas aeruginosa* i *Listeria monocytogenes* također pokazuju prilagodbu na djelovanje citrinina, ali tek nakon dužeg vremena izlaganja stanica citrininu.
6. Broj živih stanica bakterija dokazan neizravnom metodom kretao se od 8,11 do 5 log CFU mL^{-1} , a preživljavanje odabranih bakterija od oko 59 do 86% u ovisnosti o koncentraciji citrinina i vremenu trajanja uzgoja.
7. Najbolje preživljavanje stanica u prisutnosti citrinina pokazale su bakterije *Gluconobacter oxydans* i *Listeria monocytogenes*.

6. LITERATURA

Aleo, M.D., Wyatt, R.D., Schnellmann, R.G., (1991) The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions. *ToxicolApplPharm.* **109**, 455-463.

Ambrose, A.M., DeEds, F. (1946) Some toxicological and pharmacological properties of citrinin. *JPharmacolExpTher.* **88**, 173-186.

Arai, M., Hibino, T. (1983) Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *CancerLett.* **17**, 281-287.

Bevardi, M. (2013) *In vitro* i *in vivo* modeli vezanja patulina i citrinina bioprotektivnim kulturama. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Boulimi, A., Bouaziz, C., Ayed-Boussema, I., Hassen, W., Bacha, H. (2008) Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. *Toxicology.* **251**, 1-7.

Carlton, W.W., Sansing, G., Szczech, G.M., Tuite, J. (1974) Citrinin mycotoxicosis in beagle dogs. *FoodCosmetToxicol.* **12**, 479-490.

Carlton, W.W., Szczech, G.M. (1978) Citrinin. U: *Mycotoxicoses in Laboratory Animals*. Volume 2. *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses: An encyclopaedic Handbook*, (Wyllie, T.D. i Morehouse, L.G. ured.), Marcel Dekker, New York, str. 371.

Chagas, G.M., Wambier Klüppel, M.L., de Paiva Campello, A., de Freitas Buchi, D., Benigna Martinelli de Oliveira, M. (1994) Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. *CellStructFunct.* **19**, 103-108.

Chang, C-H., Yu, F-Y., Wu, T-S., Wang, L-T., Liu, B-H. (2011) Mycotoxin Citrinin Induced Cell Cycle G2/M Arrest and Numerical Chromosomal Aberration Associated with Disruption of Microtubule Formation in Human Cells. *ToxicolSci.* **119(1)**, 84-92.

Chess, B. (2009) *Laboratory Applications in Microbiology: A case Study Approach*, McGraw-Hill, New York, str. 163-164.

De Ley, J. (1961) Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria. *JGenMicrobiol.* **24**, 31-50.

de Oliveria Filho, J.W.G., Islam, M.T., Ali, E.S., Uddin, S.J., Santos, J.V.d.O., de Alencar, M.V.O.B., Júnior, A.L.G., Paz, M.F.C.J., de Brito, M.d.R.M., Sousa, J.M.d.C., Shaw, S., de Medeiros, M.d.G.F., Dantas, S.M.M.d.M., Rolim, H.M.L., Ferreira, P.M.P., Kamal, M.A., Pieczynska, M.D., Das, N., Gupta, V.K., Mocan, A., dos Santos Andrade, T.d.J.A., Singh, B.N., Mishra, S.K., Atanasov, A.G., Melo-Cavalcante, A.G. (2017) A comprehensive review on biological properties of citrinin. *FoodChemToxicol.* <rad u postupku objave>

Deshpande, S.S. (2002) *Handbook of Food Toxicology*, Marcel Dekker, New York, str. 424.

Devi, P., D'Souza, L., Kamat, T., Rodrigues, C., Naik, C.G. (2009) Batch culture fermentation of *Penicillium chrysogenum* and a report on the isolation, purification, identification and antibiotic activity of citrinin. *IndianJMarSci.* **38(1)**, 38-44.

Dömnez-Altuntas, H., Dumlupinar, G., Imamoglu, N., Hamurcu, Z., Liman, B.C. (2007) Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. *JApplToxicol.* **27**, 337-341.

Drenjačević, D., Vraneš, J. (2013) *Pseudomonas, acinetobacter i srodne bakterije*. U: *Medicinska mikrobiologija*, (Kalenić S., ured.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 214-220.

Duraković, S. (1996) *Primijenjena mikrobiologija*, Durieux, Zagreb, str. 149-164.

Duraković, S., Duraković, L. (2000) *Specijalna mikrobiologija*, Durieux, Zagreb, str. 3-56.

Duraković, S., Duraković, L. (2003) *Mikologija u biotehnologiji*, Kugler, Zagreb, str. 19-97.

European Food Safety Authority (2012) Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA J.* **10(3)**, Parma.

Flajs, D., Peraica, M. (2009) Toxicological properties of citrinin. *Arh Hig Rada Toksikol.* **60**, 457-464.

Franco, C.M., Fente, C.A., Vazquez, B., Cepeda, A., Lallaoui, L., Prognon, P., Mahuzier, G. (1996) Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. *J Chromatogr A.* **721**, 69-75.

Frank, H.K. (1992) Citrinin. *Z Ernährungswiss.* **31**, 164-177.

Giovati, L., Magliani, W., Ciociola, T., Santinoli, C., Conti, S., Polonelli, L. (2015) AFM₁ in Milk: Physical, Biological and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. *Toxins.* **7**, 4330-4349.

Gupta, M., Sasmal, D., Bandyopadhyay, S., Bagchi, G., Chatterjee, T., Dey, S. (1983) Hematological changes produced in mice by ochratoxin A and citrinin. *Toxicology.* **26**, 55-62.

Gužvinec, M., Butić, I., Jelić, M., Bukovski, S., Lucić, S., Tambić Andrašević, A. (2012) Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki glasnik.* **32(2)**, 71-80.

HAH (2013) Što su mikotoksini?, Hrvatska agencija za hranu, Hrvatska, <<https://www.hah.hr/stosu-mikotoksini/>>. Pristupljeno 20. srpnja 2019.

Hajjaj, H., Kláčb, A., Loret, M.O., Goma, G., Blanc, P.J., François, J. (1999) Biosynthetic Pathway of Citrinin in the Filamentous Fungus *Monascus ruber* as Revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance. *Appl Environ Microbiol.* **65(1)**, 311-314.

Hanika, C., Carlton, W.W., Tuite, J. (1983) Citrinin mycotoxicosis in the rabbit. *Food Chem Toxicol.* **21**, 487-493.

Hetherington, A.C., Raistrick, H. (1931) Studies in the biochemistry of microorganisms. Part XIV. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Philos Roy Soc B.* **220**, 269-295.

International Agency for Research on Cancer (1986) Citrinin. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. *IARC MonogEvalCarc.* **40**, 67.

Jeswal, P., Kumar, D. (2015) Mycobiota and Natural Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Citrinin in Indian Spices Confirmed by LC-MS/MS. *IntJMicrobiol.* **2015**, 1-8.

Ji, X., Xu, J., Wang, X., Qi, P., Wei, W., Chen, X., Li, R., Zhou, Y. (2015) Citrinin Determination in Red Fermented Rice Products by Optimized Extraction Method Coupled to Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *JFoodSci.* **80**, 1438-1444.

Johannessen, L.N., Nilsen, A.M., Lovik, M. (2007) Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. *ToxicolLett.* **168**, 103-112.

Jordan, W.H., Carlton, W.W., Sansing, G.A. (1977) Citrinin mycotoxicosis in the mouse. *FoodCosmetToxicol.* **15**, 29-32.

Kanisawa, M. (1984) Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. *DevFoodSci.* **7**, 245-254.

Knasmüller, S., Cavin, C., Chakraborty, A., Darroudi, F., Majer, B.J., Huber, W.W., Ehrlich, V.A. (2004) Structurally Related Mycotoxins Ochratoxin A, Ochratoxin B, and Citrinin Differ in Their Genotoxic Activities and in Their Mode of Action in Human-Derived Liver (HepG2) Cells: Implications for Risk Assessment. *NutrCancer.* **50**, 190-197.

Kováč, S., Nemeč, P., Betina, V., Balan, J. (1961) Chemical Structure of Citrinin. *Nature.* **190**, 1104-1105.

Krejci, M.E., Bretz, N.S., Koechel, D.A. (1996) Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]_{plasma}. *Toxicology.* **106**, 167-177.

Lee, C-H., Lee, C-L., Pan, T-M. (2010) A 90-d Toxicity Study of Monascus-Fermented Products Including High Citrinin Level. *JFoodSci.* **75**, T91-T97.

Liu, B-H., Yu, F-Y., Wu, T-S., Li, S-Y., Su, M-C., Wang, M-C., Shih, S-M. (2003) Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *ToxicolApplPharm.* **191**, 255-263.

Lorkowski, G., Creppy, E-E., Beck, G., Dirheimer, G., Rösenthaller, R. (1980) Inhibitory action of citrinin on cultured hepatoma cells. *FoodCosmetToxicol.* **18**, 489-491.

Malaveille, C., Brun, G., Bartsch, H. (1991) Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related compounds in *Escherichia coli* strains: studies on their mode of action. *IARC SciPubl.* **115**, 261-266.

Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Lovrić, N., Delaš, F. (2010) Aflatoksin M₁ 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. *FoodControl.* **34**, 312-317.

Markov, K., Frece, J., Pleadin, J., Bevardi, M., Barišić, L., Gajdoš Kljusurić, J., Vulić, A., Jakopović, Ž., Mrvčić, J. (2019) *Gluconobacter oxydans* – potential biological agent for binding or biotransformation of mycotoxins. *WorldMycotoxinJ.* **12(2)**, 153-161.

Martin, W., Lorkowski, G., Creppy, E.E., Dirheimer, G., Rosenthaller, R. (1986) Action of citrinin on bacterial chromosomal and plasmid DNA in vivo and in vitro. *ApplEnvironMicrob.* **52**, 1273-1279.

Matić, J. (2009, 5. studeni) Patogene bakterije u hrani. Tehnologija hrane, <<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/patogene-bakterije-u-hrani-12#toc>>.

Pristupljeno 24. lipnja 2019.

- Mazumder, P.M., Mazumder, R., Mazumder, A., Sasmal, D.S. (2002) Antimicrobial activity of the mycotoxin citrinin obtained from the fungus *Penicillium citrinum*. *Anc. Sci. Life.* **21**, 191-197.
- Oancea, S., Stoia, M. (2008) Mycotoxins: A review of toxicology, analytical methods and health risks. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology.* **12**, 19–31.
- Ostry, V., Malir, F., Ruprich, J. (2013) Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. *Toxins.* **5**, 1574-1586.
- Peraica, M., Rašić, D. (2012) Akutne i kronične mikotoksikoze u ljudi. *Krmiva.* **54**, 81-87.
- Pfeiffer, E., Gross, K., Metzler, M. (1998) Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis.* **19**, 1313-1318.
- Phillips, R.D., Hayes, A.W. (1978) Effect of the mycotoxin citrinin on composition of mouse liver and kidney. *Toxicon.* **16**, 351-359.
- Pleadin, J., Kudamija, N., Frece, J., Petrović, D., Markov, K. (2015a) Citrinin u hrani i hrani za životinje. *Hrvat. čas. prehrambenu tehnol. biotehnol. nutr.* **11(3-4)**, 84-90.
- Pleadin, J., Frece, J., Vasilj, V., Markov, K. (2015b) Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje. *Hrvat. čas. prehrambenu tehnol. biotehnol. nutr.* **10**, 6-13.
- Raistrick, H., Smith, G. (1941) Anti-bacterial substances from moulds. Part I. Citrinin, a metabolic product of *Penicillium citrinum* Thom. *Chem.Ind.* **60**, 828-830.
- Ribeiro, S.M., Chagas, G.M., Campello, A.P., Klüppel, L.W. (1997) Mechanism of Citrinin-Induced Dysfunction of Mitochondria. V. Effect on the Homeostasis of the Reactive Oxygen Species. *CellBiochemFunct.* **15**, 203-209.
- Rumora, L., Domijan, A-M., Žanić Grubišić, T., Šegvić Klarić, M. (2014) Differential activation of MAPKs by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments in porcine kidney PK15 cells. *Toxicon.* **90**, 174-183.

Ryser, E.T., Marth, E.H. (2007) *Listeria*, listeriosis, and food safety, 3. izd., Taylor & Francis, London, str. 9-11.

Sabater-Vilar, M., Maas, R.F.M., Fink-Gremmels, J. (1999) Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *MutatRes-GenToxEn.* **444**, 7-16.

Sakai, M., Abe, K-I., Okumura, H., Kawamura, O., Sugiura, Y., Horie, Y., Ueno, Y. (1992) Genotoxicity of fungi evaluated by SOS microplate assay. *NatToxins.* **1**, 27-34.

Shinohara, Y., Arai, M., Hirao, K., Sugihara, S., Nakanishi, K., Tsunoda, H., Ito, N. (1976) Combination effect of citrinin and other chemicals on rat kidney tumourigenesis. *Gann.* **67**, 147-155.

Šarkanj, B., Kipčić, D., Vasić-Rački, Đ., Delaš, F., Galić, K., Katalenić, M., Dimitrov, N., Klapac, T. (2010) *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani* [online], Hrvatska agencija za hranu, Osijek, <https://www.hah.hr/pdf/Knjiga_kemijske_i_fizikalne_opasnosti.pdf>. Pristupljeno 30. srpnja 2019.

Šegvić Klarić, M., Želježić, D., Domijan, A-M., Peraica, M., Pepeljnjak, S. (2007) Cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis induced by ochratoxin A and citrinin in porcine kidney PK15 cells: Effects of single and combined mycotoxins. *ToxicolLett.* **172**, 56-61.

Šegvić Klarić, M., Želježić, D., Rumora, L., Peraica, L., Pepeljnjak, S., Domijan, A-M. (2012) A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin. *ArchToxicol.* **86**, 97-107.

Šegvić Klarić, M., Medić, N., Hulina, A., Žanić Grubišić, T., Rumora, L. (2014) Disturbed Hsp70 and Hsp27 expression and thiol redox status in porcine kidney PK15 cells provoked by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments. *FoodChemToxicol.* **71**, 97-105.

Thacker, H.L., Carlton, W.W., Sansing, G.A. (1977) Citrinin mycotoxicosis in the guinea-pig. *FoodCosmetToxicol.* **15**, 553-561.

Trivedi, A.B., Hirota, M., Doi, E., Kitabatake, N. (1993) Formation of a New Toxic Compound, Citrinin H1, from Citrinin on Mild Heating in Water. *JChemSocPerkT1*. **18**, 2167-2171.

Wang, M.L., Lu, C.H., Xu, Q.Y., Song, S.Y., Hu, Z.Y., Zheng, Z.H. (2013) Four New Citrinin Derivatives from a Marine-Derived *Penicillium* sp. Fungal Strain. *Molecules*. **18**, 5723-5735.

Wasternack, C., Weisser, J. (1992) Inhibition of RNA- and DNA-synthesis by citrinin and its effects on DNA precursor-metabolism in V79-E cells. *CompBiochemPhysB*. **101**, 225-230.

Wehner, F.C., Thiel, P.G., van Rensburg, S.J., Demasius, I.P.C. (1978) Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some Aspergillus and Penicillium mycotoxins. *MutatRes*. **58**, 193-203.

Xu, B.-j., Jia, X.-q., Gu, L.-j., Sung, C.-k. (2006) Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *FoodControl*. **17**, 271-285.

Yoneyama, M., Sharma, R.P. (1987) Biochemical alterations induced by citrinin in cultured kidney epithelial cell systems. *ArchEnvironConTox*. **16**, 765-770.

Yu, F.-Y., Liao, Y.-C., Chang, C.-H., Liu, B.-H. (2006) Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *ToxicolLett*. **161**, 143-151.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Đobrić Nina