Utjecaj aflatoksina B1 i okratoksina A na morfološke osobine bakterija mliječne kiseline

Šunjić, Romano

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:970544

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

Romano Šunjić

6802/BT

UTJECAJ AFLATOKSINA B_1 I OKRATOKSINA A NA MORFOLOŠKE OSOBINE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

ZAVRŠNI RAD

Modul: Mikrobiologija

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

Utjecaj aflatoksina B_1 i okratoksina A na morfološke osobine bakterija mliječne kiseline

Romano Šunjić 6802/BT

Sažetak: Cilj rada je istražiti utjecaj aflatoksina B_1 (AFB_1) i okratoksina A (OTA) na preživljavanje i morfološke osobine bakterije *Lactobacillus plantarum* 1K. Toksično djelovanje mikotoksina, osim na čovjeka, životinje i biljke, dokazano je i u mikroba (bakterije, kvasci, plijesni, protozoe), a najčešće kroz inhibiciju rasta. Mikrobni rast ovisi o uvjetima okoline u kojoj se mikrobi nalaze kao i izloženosti kemijskim agensima, a prikazuje se najčešće u obliku krivulje rasta. Krivulja rasta bakterije *Lactobacillus plantarum* 1K određivana je u prisutnosti AFB_1 i OTA tijekom 48 sati uzgoja metodom neizravnog određivanja broja živih stanica, brojanjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi izraženih kao $\log_{10}$ CFU/mL. Morfološke osobine stanica, kao što su dužina i širina, određene su metodom mikrometrije upotrebom objektnog i okularnog mikrometra. Iz dobivenih rezultata uočeno je da oba istraživana mikotoksina utječu i na bakterijski rast i na dimenzije stanica bakterije *L. plantarum* 1K u ovisnosti o vremenu.

Ključne riječi: aflatoksin B1, okratoksin A, *Lactobacillus plantarum*, krivulja rasta, morfološke osobine bakterija

Rad sadrži: 24 stranice, 8 slika, 1 tablicu, 46 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv.prof.dr.sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: Željko Jakopović, mag. ing.

Rad predan: lipanj 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

The effects of aflatoxin B_1 and ochratoxin A on the morphological characteristics of lactic acid bacteria

Romano Šunjić 6802/BT

Summary: The aim of this study was to investigate the impact of aflatoxin B_1 (AFB_1) and ochratoxin A (OTA) on survival and morphological characteristics of *Lactobacillus plantarum* 1K. Toxic effects of mycotoxins, in addition to man, animals and plants have been proven on microbes (bacteria, yeasts, molds, protozoa), but mostly trough the inhibition of growth. Microbial growth is dependent on the environmental conditions in which the microbes are as well as exposure to chemical agents, and most often is shown in form of growth curves. The growth curve of *Lactobacillus plantarum* 1K was determined in the presence of AFB_1 and OTA during 48 hours of cultivation by method of indirect determination of the number of living cells, by counting the colonies grown on the solid culture medium, expressed as $\log_{10}$ CFU/mL. Morphological characteristics of cells, such as length and width, were determined by using micrometry object and ocular micrometer. From the results it was observed that both mycotoxins affect the growth of bacterial cells and the dimensions of L. plantarum 1K versus time.

Keywords: aflatoxin B1, ochratoxin A, *Lactobacillus plantarum*, growth curve, morphological characteristics of bacteria

Thesis contains: 24 pages, 8 figures, 1 table, 46 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph.D. Ksenija Markov, Associate professor

Technical support and assistance: Željko Jakopović, Research associate

Thesis delivered: June 2016.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. MIKOTOKSINI 2
2.1.1. Aflatoksin B_1 3
2.1.2. Okratoksin A 4
2.2. MIKROBNI RAST 6
2.2.1. Krivulja rasta bakterija 7
2.3. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE 9
2.3.1. *Lactobacillus plantarum* 9
3. MATERIJALI I METODE 10
3.1. MATERIJALI 10
3.1.1. Mikroorganizam 10
3.1.2. Podloga za uzgoj *L. plantarum* 1K 10
3.1.3. Mikotoksini 11
3.1.4. Aparatura 11
3.1.5. Pribor 11
3.2. METODE RADA 12
3.2.1. Priprema uzorka 12
3.2.2. Određivanje krivulje rasta 12
3.2.3. Mikrometrija 13
4. REZULTATI I RASPRAVA 14
4.1. Utjecaj mikotoksina na krivulju rasta *L. plantarum* 1K 14
4.2. Utjecaj mikotoksina na morfološke osobine stanica *L. plantarum* 1K 15
5. ZAKLJUČCI 19
6. LITERATURA 20

UTJECAJ AFLATOKSINA B_1 I OKRATOKSINA A NA MORFOLOŠKE OSOBINE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

1. UVOD

Iako su glavni izvor mikotoksina za ljude žitarice i proizvodi na bazi žitarica, postoji zabrinutost oko ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka, kroz meso, jaja, mlijeko i mliječne proizvode ako su životinje bile hranjene krmom kontaminiranom plijesnima koje sintetiziraju mikotoksine, ili samim mikotoksinima zbog faktora prijenosa ili tzv. „carry over" efekta (Markov i sur., 2013; Giovati i sur., 2015). Mikotoksini su stabilni spojevi tako da se često nalaze i u gotovom proizvodu koji je prošao tehnološku obradu, a posebno su opasni zbog visoke toksičnosti u malim količinama i odsutnosti bilo kakvog senzorskog upozorenja pri konzumaciji hrane koja sadrži mikotoksine. Mnogi mikroorganizmi, uključujući bakterije, kvasce, plijesni, aktinomicete i alge mogu ukloniti ili smanjiti količine mikotoksina u hrani i krmi (Pleadin i sur., 2014; Giovati i sur., 2015; Ehrlich i sur., 2015). Među tim potencijalnim mikroorganizmima, bakterije mliječne kiseline (BMK) predstavljaju jedinstvenu skupinu koja se naširoko koristi u proizvodnji i očuvanju fermentiranih proizvoda, a za koje se od davnina zna da imaju pozitivan učinak na crijevnu mikrofloru čovjeka, te da imaju GRAS (Generally Recognized As Safe) status. Bakterije mliječne kiseline su prirodno prisutne u raznoj hrani, gdje produžuju trajnost proizvoda, što je doprinijelo da budu prihvaćene kao bezopasne za ljudsko zdravlje. Za proizvodnju fermentiranih namirnica broj i aktivnost stanica BMK je stvar od velike važnosti, a može biti narušeno prisustvom određenih spojeva, kao što su mikotoksini. Budući da rast i razvoj bakterijskih stanica ovisi o okolišnim čimbenicima te izloženosti kemijskim tvarima, u ovom radu je istražen utjecaj aflatoksina B_1 i okratoksina A na rast i morfološke osobine bakterije *Lactobacillus plantarum* 1K tijekom 48 sati uzgoja.

.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKOTOKSINI

Još od davnina ljudima je poznato da gljive (uključujući kvasce i plijesni) uzrokuju kvarenja namirnica, krme te ostalog organskog materijala. O toksičnom djelovanju gljiva na više organizme nije se ništa pouzdano znalo do 1960. godine kada je otkriven aflatoksin iz plijesni *Aspergillus flavus* („X" – bolest purana). Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti određenih filamentoznih gljiva, prvenstveno plijesni. Kemijski su vrlo različite strukture s različitim biološkim učincima. Dosad je poznato više od 400 različitih sekundarnih metabolita plijesni, a među njima su najznačajniji aflatoksini, okratoksin A, fumonizin B_1, zearalenon, T-2 toksin, deoksinivalenol i dr. (Duraković i Duraković, 2003).

Mikotoksini su važni okolišni onečišćivači koji se sintetiziraju na zrnju, orasima i drugom biljnom materijalu, a gutanje, udisanje ili dodir s malim količinama tih kemijskih spojeva može izazvati čitav niz po domaćina opasnih bolesti koje se nazivaju mikotoksikoze (Duraković i Duraković, 2003). Neke plijesni mogu proizvoditi više od jednog mikotoksina te neke mikotoksine može proizvoditi više vrsta plijesni (Duraković, 1991).

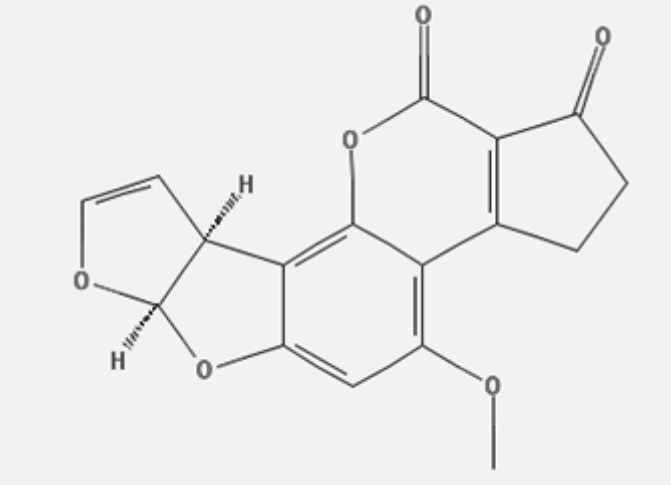
Mikotoksini se češće javljaju u područjima s toplim i vlažnim klimama, pogodnima za rast plijesni. Takvi se uvjeti često stvaraju i u silosima i objektima u kojima se pohranjuju žitarice. U ljudski organizam mogu dospjeti preko hrane te dišnim putevima. Mikotoksikoze su mnogo učestalije u domaćim životinjama nego među ljudima, jer životinje mnogo češće nego ljudi uzimaju kontaminiranu hranu (Zain, 2011). Mikotoksini imaju različite akutne i kronične učinke na ljude i životinje, ovisno o vrsti i osjetljivosti samog organizma. Preživači su uglavnom otporniji na negativne učinke mikotoksina jer mikrobi u buragu imaju sposobnost razgrađivanja mikotoksina.

Negativni gospodarski učinci mikotoksina uključuju velike ekonomske gubitke, povećanje troškova zdravstvene i veterinarske zaštite, smanjenje proizvodnje u stočarstvu, zbrinjavanje kontaminiranih namirnica i stočne hrane te dodatne troškove za istraživanja kako bi se smanjila njihova prisutnost (Duraković, 1991).

2.1.1. Aflatoksin B_1

Skupinu aflatoksina čine aflatoksin B_1, B_2, G_1 i G_2 a sintetiziraju ih plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* te druge vrste iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium i Rhizopus*. Aflatoksini su mutageni, karcinogeni i teratogeni spojevi i njihova prisutnost u organizmu tijekom dužeg vremenskog razdoblja i u ekstremno malim količinama, može biti opasna za ljudsko zdravlje. Svi aflatoksini nisu jednako toksični, od navedenih najtoksičniji je AFB_1 (slika 1) koji ima snažno kancerogeno i mutageno djelovanje, a najmanje toksičan AFG_2.

Aflatoksini, posebno aflatoksin B_1 su prvenstveno hepatotoksični, uzrokovajući oštećenja jetre u čovjeka i životinja, odgovorni su za smanjenu proizvodnju mlijeka, jaja, itd. te su imunosupresivni.



Slika 1. Kemijska struktura aflatoksina B_1 (National Center for Biotechnology Information, 2004)

Međunarodna agencija za istraživanje raka IARC (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans) još je 1987. godine na temelju epidemioloških i laboratorijskih rezultata utvrdila da postoji dovoljno dokaza da aflatoksini uzrokuju kancerogenost kod ljudi, te su stoga klasificirani kao Grupa 1 kancerogeni, osim aflatoksina M_1, za kojeg se pretpostavlja da je kancerogen pa je svrstan u Grupu 2B (1987).

Toksični metaboliti aflatoksina mogu se naći i u proizvodima životinjskog podrijetla,

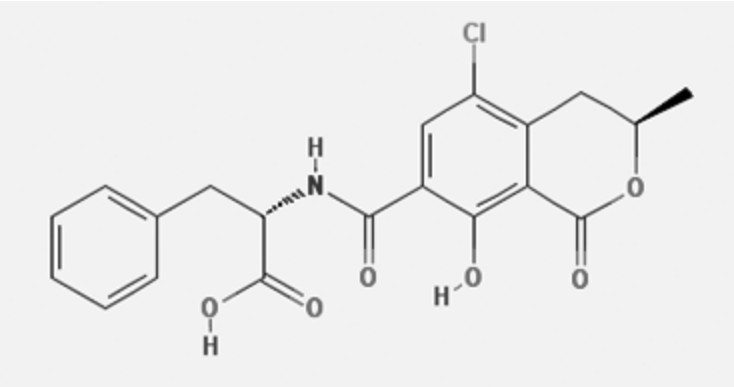
mlijeku i mesu, ukoliko je prethodno hrana za životinje bila onečišćena plijesnima, a onečišćenje ovisi o geografskom području, klimatskim uvjetima, vlazi i temperaturi (Markov i sur, 2010).

Nekoliko epidemija aflatoksikoza dogodilo se u tropskim zemljama, uglavnom među odraslom populacijom, u ruralnim područjima s lošom ishranom gdje je kukuruz služio kao glavni izvor hrane (Peraica i sur., 1999). Stopa smrti u akutnoj fazi iznosila je 10±60 % , a pacijenti koju su preživjeli nakon godinu dana više nisu imali žuticu te se većina klinički oporavila. Aflatoksini su otkriveni u krvotoku trudnica, u neonatalnoj krvi pupkovine, te u majčinom mlijeku u afričkim zemljama sa značajnim sezonskim varijacijama (Coulter, 1984; Lamplugh, 1988; Maxwell, 1989). Hrana za kućne ljubimce kontaminirana sa aflatoksinima povezana je sa raznim bolestima i smrću životinja (Richard, 2007). U Velikoj Britaniji i Nizozemskoj jedno istraživanje je pokazalo da su ovisnici o heroinu izloženiji aflatoksinu B_1. Analizom 121 uzorka urina ovisnika o heroinu utvrđeno je da je 20% uzoraka bilo kontaminirano sa aflatoksinima B_1, B_2, M_1 i M_2 u odnosu na 2% kontaminacije kod normalnih odraslih dobrovoljaca (Hendrickse i Maxwell, 1989).

Osim navedenih, zanimljiv je i aflatoksin M_1, hidroksilirani metabolit koji se prvenstveno nalazi u životinjskim tkivima i tekućinama poput mlijeka i urina kao metabolički proizvod aflatoksina B_1 (Richard, 2007). AFM_1 je produkt biološke pretvorbe u mikrosomima jetre te se izlučuje u mlijeko kroz mliječne žlijezde sisavaca hranjenih hranom koja je sadržavala aflatoksin B skupine. Koncentracija AFM_1 ovisi o samom proizvodnom procesu pripreme mliječnih proizvoda, o vrsti proizvoda, udjelu vode i konačnom proizvodu (Markov i sur., 2010).

2.1.2. Okratoksin A

Okratoksini su skupina mikotoksina koju proizvode neki predstavnici vrsta *Aspergillus* i *Penicillium*. Najpoznatiji, najučestaliji i najtoksičniji iz skupine okratoksina je okratoksin A (OTA) (slika 2), a manje prisutni i toksični su okratoksin B i okratoksin C koji je etil ester OTA, te OTα (Størmer, 1992).



Slika 2. Kemijska struktura okratoksina A (National Center for Biotechnology Information, 2004)

Okratoksin A prvi put je izoliran 1965. u Južnoj Africi iz *Aspergillus ochraceus* po kojoj je i dobio ime (Merwe i sur., 1965). Danas je poznato da i mnogo industrijskih sojeva vrste *Aspergillus niger* proizvodi OTA što je zabrinjavajuće jer se ovi sojevi koriste u fermentaciji za proizvodnju hrane i enzima (Bayman i Baker, 2006).

Kako se popis OTA-producirajućih vrsta s vremenom proširio, tako se otkrilo sve više namirnica koje mogu biti kontaminirane ovim mikotoksinom. OTA je pronađen u ječmu, pšenici, raži, kukuruzu i riži (Shotwell i sur., 1969). U novije vrijeme, OTA je pronađen i u mahunarkama, grožđu, grožđicama, vinu (Abarca i sur., 2001; Zimmerli i Dick, 1996), pivu, kakau, kavi i začinima (Aziz i sur., 1998) te u proizvodima životinjskog podrijetla uključujući kravlje mlijeko, svinjetinu, posebno svinjske bubrege, jetru i kobasice (Jorgensen, 1998; Kuiper-Goodman i Scott, 1989).

Okratoksin prvenstveno oštećuje bubrege, ali u dovoljno visokim koncentracijama može djelovati i na jetru. Eliminacija OTA iz ljudskog tijela je sporija nego kod svih ostalih testiranih vrsta omogućavajući tako duže kontaktno vrijeme i veću moguću štetu. Ovaj toksin je kancerogen kod štakora i miševa, a za čovjeka je klasificiran u grupu 2B, kao mogući kancerogen (Richard, 2007). Odgovoran je za nefropatiju u svinja i ptica i Balkansku endemsku nefropatiju, kroničnu obostranu bolest bubrega u ljudi (Delaš, 2010).

Kao i kod aflatoksina, često nije jasno u kojoj su mjeri studije nad životinjama primjenjive na toksičnost kod ljudi. OTA djeluje nefrotoksično, imunosupresivno, kancerogeno i teratogeno na životinje, a eksperimentalnim izlaganjem njegovim koncentracijama, kod životinja su uočene razne bubrežne lezije te ozbiljne bolesti bubrega kod skandinavskih svinja i peradi (Størmer, 1992; O'Brien i Dietrich, 2005).

Većina ljudi ima mjerljive razine OTA u krvotoku (barem u nekim zemljama) iako

obično u vrlo niskim razinama. U Norveškoj su tako u jednom istraživanju svi uzorci ljudske krvi te 58% uzoraka ljudskog mlijeka sadržavali određenu koncentraciju OTA. Neki uzorci majčinog mlijeka su sadržavali visoke razine OTA, do 6,6 μg/L. Takva koncentracija je alarmantna jer ukazuje da su djeca izložena razinama iznad preporučene maksimalne doze od 5 ng/kg tjelesne težine dnevno (Skaug i sur., 2001). Ključna pitanja koja se odnose na biosintezu OTA, njegovu kontaminaciju usjeva, toksičnost i epidemiologiju još nisu potpuno odgovorena te je stoga moguće da će za desetak godina okratoksini zasjeniti aflatoksine u smislu javnog interesa i rasprave.

2.2. MIKROBNI RAST

Rast mikroorganizma definiramo kao povećanje njegovih dimenzija prije nego što se u populaciji poveća broj individualnih stanica. Kod bakterija postoje razni načini razmnožavanja pomoću filamenata gdje se duge vlaknaste stanice cijepaju u fragmente, razmnožavanje pomoću konidiospora karakteristično za zrakaste bakterije no najveći broj bakterija se razmnožava binarnim cijepanjem (diobom) pri kojem se stanica duplicira i na taj način dijeli u dvije identične stanične jedinke.

Vrijeme potrebno za udvostručavanje broja u populacije naziva se vrijeme udvostručenja ili generacijsko vrijeme (g) i ono je u pravilu konstantno za pojedini organizam ako se fizikalni i kemijski uvjeti u okolišu ne mijenjaju. Generacijsko vrijeme ovisi o mikroorganizmu i okolišnim uvjetima. Tako primjerice bakterija *Escherichia coli* ima generacijsko vrijeme manje od 30 minuta u optimalnim uvjetima rasta u laboratoriju međutim u probavnom traktu gdje uvjeti nisu optimalni i vladaju konkurentski odnosi među različitim mikroorganizmima ono može biti duže od 12 sati. Kratko generacijsko vrijeme ima kao posljedicu brzu tvorbu kolonija mikroorganizma, koje se sastoji od milijardi stanica, u manje od jednoga dana nakon nacjepljivanja na čvrstu podlogu za uzgoj. Usprkos njihovom kapacitetu reprodukcije, većina mikrobnog rasta prirodno je limitirana (Duraković, 1991). Generacijsko vrijeme *Lactobacillus plantarum* iznosi 5,9 sati (Smelt i sur., 2002). Ovisnost logaritma broja živih stanica i vremena služi za izravno određivanje generacijskog vremena bakterije. Mikrobni rast je ujedno i eksponencijalni (logaritamski) rast koji matematički opisuje povećanje broja bakterijske populacije sa svakom novom generacijom. Uravnoteženi rast nastupa kada je dioba svih staničnih sastojaka biomase na istom stupnju (Hardy, 2002).

Svaki mikrobni rast ovisi o uvjetima okoliša ili uzgoja koji su osnovni faktor ograničavanja samoga rasta. Bakterije se mogu razmnožavati na različite načine koristeći pritom različite mehanizme iako je svako takvo razmnožavanje nespolno.

2.2.1. Krivulja rasta bakterija

Nakon nacjepljivanja bakterijske kulture u hranjivu podlogu započinje rast i razmnožavanje koji se odvijaju slijedeći krivulju kakva je prikazana na slici 3. Krivulja rasta prikazuje ovisnost broja živih stanica o vremenu u pojedinim fazama rasta. Budući bakterije rastu eksponencijalno, često je korisno prikazivati ovisnost logaritamske vrijednosti broja stanica o vremenu (Zwietering i sur., 1990). Vrijeme i oblik krivulje kao i broj živih stanica različiti su za različite bakterije te ovise i o upotrijebljenoj hranjivoj podlozi i okolišnim uvjetima (Duraković, 1991). Također, na njezin oblik utječu i brojni drugi faktori i uvjeti pod kojima se vodio eksperimentalni rad (temperatura, pH, izloženost UV zračenju, djelovanje kemikalija, mikotoksini itd.).

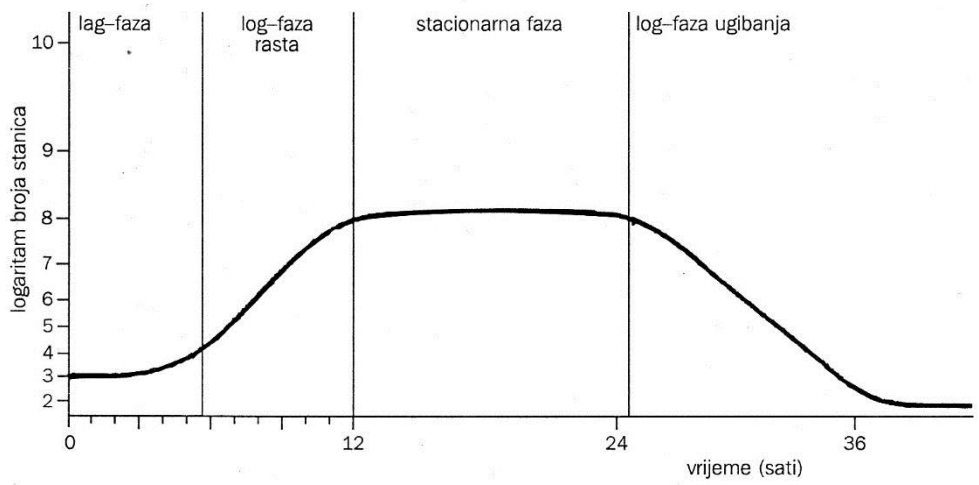
Rast se može opisati pomoću četiri faze; lag faza (faza suzdržanog rasta), log faza rasta (logaritamska ili eksponencijalna faza), stacionarna faza i faza odumiranja.

1. lag-faza odnosno faza prilagodbe ili suzdržanog rasta

Inokulacijom bakterijske kulture u novi medij ne dovodi do trenutnog rasta i razmnožavanja stanica već je potrebna prilagodba mikroorganizma na nove okolišne uvjete. Karakteristično za tu fazu je sinteza potrebnih enzima za rast u novoj sredini, a zbog prilagodbe ne dolazi do povećanja broja stanica. Stvarna dužina lag-faze ovisi o samom stanju inokuliranih stanica, uvjetima okoliša u kojem su se stanice prije nalazile i broju stanica u inokulumu.

2. logaritamska ili eksponencijalna faza

Kada su se stanice prilagodile okolišnim uvjetima, dolazi do njihovog dijeljenja te ubrzanog rasta. Tijekom ove faze rasta, kada se stanice podijele binarnim cijepanjem, stvara se nova generacija stanica. Svaka stanica u novoj generaciji kadra je dijeliti se na jednak način. Dijeljenje se zbiva stalno i u maksimalnim iznosima u postojećim uvjetima, a broj stanica se povećava geometrijskom progresijom.



Slika 3. Krivulja rasta bakterija

Budući da se u tijeku rasta hranjive tvari u podlozi troše te se nagomilavaju otpadni produkti metabolizma potrebno je određivati broj stanica u odabranim razmacima kako bi se mogao odrediti kraj logaritamske faze rasta.

3. stacionarna faza

S vremenom dolazi do sve većeg pada brzine rasta i ugibanja bakterija zbog sve većeg iscrpljivanja hranjivih sastojaka i ostalih materijala potrebnih za respiraciju stanica te nakupljanja ugljikova dioksida, kiselina i drugih otpadnih metabolita i produkata. Tada započinje stacionarna faza u kojoj je gotovo podjednak broj živih i mrtvih stanica. Tijekom ove faze najčešće se sintetiziraju sekundarni metaboliti poput enzima i antibiotika koji imaju i komercijalnu uporabu. Ugibanjem određenog broja stanica istodobno dolazi do oslobađanja hranjivih sastojaka koje mogu koristiti druge stanice za rast i razmnožavanje pa stoga krivulja rasta u stacionarnoj fazi i nakon nje ne opada naglo.

4. logaritamska faza odumiranja

Daljnjim koncentriranjem toksičnih produkata postiže se logaritamska faza odumiranja u kojoj se broj živih stanica smanjuje geometrijskom progresijom koja je obrnuta onoj u logaritamskoj fazi rasta odnosno broj ugibajućih stanica je puno veći od broja novonastalih. Mrtve stanice se liziraju pomoću autolitičkih enzima koji oslobađaju sadržaj stanice. Nakon određenog vremena, pri jako teškim uvjetima za preostale žive stanice (primjerice nakon što se hranjiva podloga osuši) dolazi i do njihovog nestajanja (Duraković, 1991).

2.3. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline su relativno različita grupa bakterija, ali međusobno povezana mnogim zajedničkim metaboličkim i fiziološkim karakteristikama. To su gram-pozitivne i nesporogene bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu kao glavni produkt tijekom fermentacije ugljikohidrata. Glavna grupa BMK sadržava rodove *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* i *Streptococcus*, no u BMK važne u prehrambenoj tehnologiji uključeni su i rodovi *Aerococcus, Carnobacterium, Lactococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* i *Weisella* (Axelsson, 2004; Stiles i Holzapfel, 1997). Mnoga od poželjnih svojstava intestinalne mikroflore pripisuju se BMK, tj. pojedinim bakterijskim sojevima koji uglavnom pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

Poželjno djelovanje BMK na zdravlje domaćina u prvom redu obuhvaća: antimikrobno djelovanje prema patogenim mikroorganizmima, poboljšanje metabolizma laktoze, stimulaciju imunološkog sustava, antikancerogeno djelovanje i snižavanje koncentracije kolesterola u serumu. Zbog svih navedenih svojstava, poželjno je primijeniti BMK u prehrani i terapeutici kao probiotike, posebno u slučajevima poremećaja ravnoteže crijevne mikroflore (Šušković, 1996; Šušković i Kos., 2001).

2.3.1. *Lactobacillus plantarum*

Vrste roda *Lactobacillus* jedni su od najvažnijih čimbenika uključenih u mikrobiologiju namirnica i ljudsku prehranu. Koriste se u proizvodnji fermentirane hrane, kao starter kulture i konzervansi. Osim što doprinosi očuvanju hrane i probavnog trakta, pokazalo se da je *L. plantarum* učinkovit i za liječenje sindroma iritabilnog crijeva (IBS – Irritable Bowel Syndrome), Crohnove bolesti te upalne bolesti crijeva (Ducrotté i sur., 2012). Ima sposobnost djelovanja na patogene te čuvanja ključnih hranjivih tvari, vitamina i antioksidansa. Bakterija također pokazuje rijetku sposobnost proizvodnje L-lizina. Jedno od novijih područja istraživanja i primjene ovog organizma je za unos terapijskih spojeva i proteina u ljudsko tijelo.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizam

Za određivanje utjecaja AFB_1 i OTA na preživljavanje i morfološke osobine kao test mikroorganizam u ovom radu upotrijebljena je bakterijska kultura *Lactobacillus plantarum* 1K, 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 *L. plantarum* 1K

Za uzgoj i određivanje ukupnog broja bakterija u uzorcima korišten je MRS (Man-Rogosa-Sharpe)–bujon i agar (Biolife, Italija). Uzgoj bakterije *L. plantarum* 1K proveden je u laboratorijskim uvjetima pri 37°C tijekom 72 sata.

a) MRS (Man-Rogosa-Sharpe) – agar sastava: (g x L-1)

- pepton 10
- mesni ekstrakt 10
- kvaščev ekstrakt 5
- glukoza 20
- Tween 80 1
- MgSO4· 7 H2O 0,1
- MnSO4·7H2O 0,05
- natrijev-acetat 5
- agar 20

- u destiliranoj vodi pH vrijednost podloge je 6,5
- sterilizacija pri 121˚C/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 OTA

3.1.3. Mikotoksini

Standardi mikotoksina:

- AFB_1 „Sigma“ – Chemical
- OTA „Sigma“ – Chemical

3.1.4. Aparatura

- čitač mikrotitarskih pločica"Tecan"
- 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
- pipete 1 i 10 mL
- epruvete mikrobiološke 18 × 180 mm
- mikropipete 10 i 100 μL JUSTOR 1100G
- okularni mikrometar
- objektni mikrometar

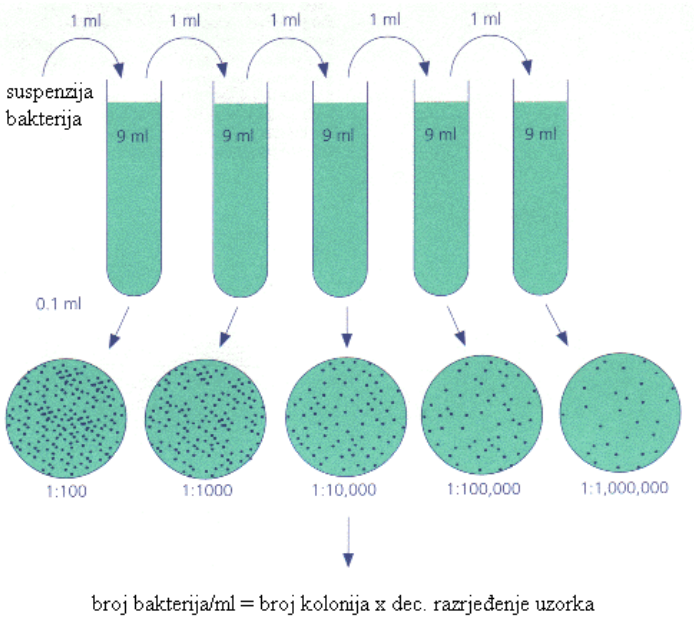
3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema uzorka

Lactobacillus plantarum 1K čuvan je u u MRS-bujonu pri 4 °C, u hladnjaku. Kulture su precjepljivane svakih 14 dana i inkubirane pri 37 °C, te korištene za određivanje utjecaja AFB_1 i OTA na preživljavanje i morfološke karakteristike bakterija u tekućoj podlozi. Nakon 24h inkubacije pri 37°C, po 5 ml MRS bujona s nacijepljenom bakterijskom kulturom dodano je u tri Erlenmayerove tikvice sa 20 mL MRS bujona. Jedna tikvica je bila kontrolna (samo bujon i bakterija), u drugu je dodano 30 µL OTA, a u treću je dodano 30 µL AFB_1.

3.2.2. Određivanje krivulje rasta

U ovom radu ispitivao se utjecaj toksina (OTA i AFB_1) na krivulju rasta bakterije *Lactobacillus plantarum* 1K tijekom 48 sati. Prvih 10 sati, svaka 2 sata, a zatim nakon 24 i 48 sati načinjena je serija decimalnih razrijeđenja i po 10µL suspenzije nacijepljeno je na MRS podlogu u Petrijevim zdjelicama te stavljeno na inkubaciju 48h na 37°C. Svi pokusi su provedeni u paraleli. Nakon 48 sati inkubiranja u kontrolnom uzorku i u uzorcima s dodanim AFB_1 i OTA prebrojane su porasle kolonije uz pomoć brojača kolonija te je određen broj živih bakterija izražen kao log CFU/mL. Kod praćenja rasta mikroorganizma korištena je metoda neizravnog (posrednog) određivanja broja živih mikrobnih stanica (slika 4).



Slika 4. Priprava serije decimalnih razrjeđenja (Anonymus)

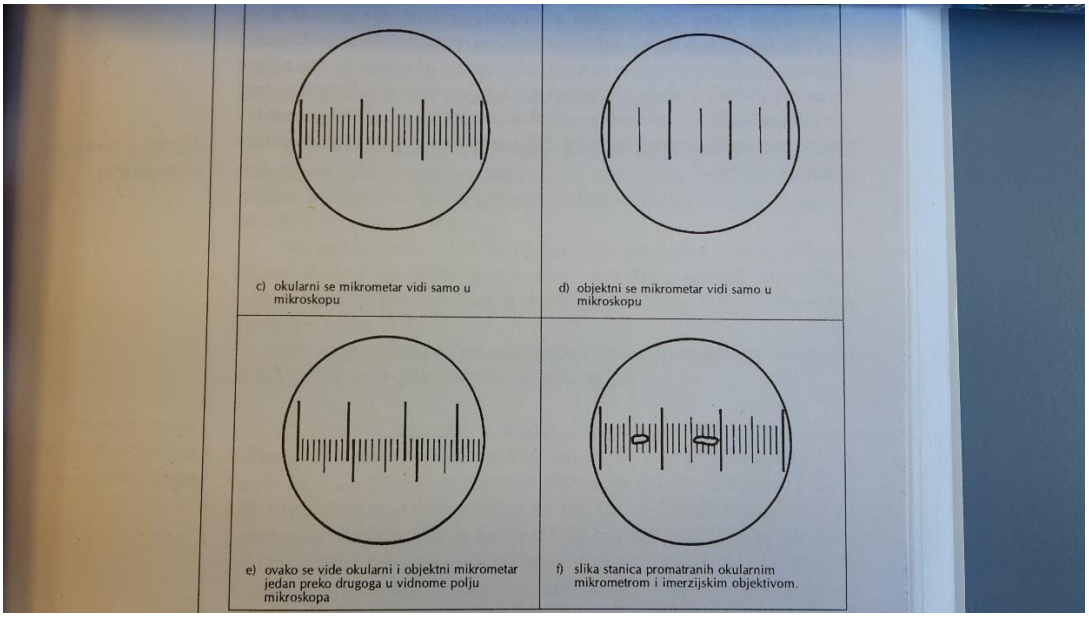
3.2.3. Mikrometrija

Utjecaj AFB_1 i OTA na dimenzije, dužinu i širinu, bakterije *Lactobacillus plantarum* 1K obojanu metilenskim modrilom, praćeno je tijekom 48 sati inkubacije uz pomoć okularnog i objektnog mikrometra. Tijekom prvih deset sati dimenzija bakterijskih stanica mjerile su se svaka dva sata, a zatim nakon 24. i 48. sata. Mjerenja su provedena u paralelama po 25 stanica.

Prije mjerenja potrebno je izbaždariti okularni mikrometar. Okularni mikrometar se stavi 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 se dobije tako da se broj podjeljaka objektne skale podjeli sa 100 podjeljaka okularne skale i pomnoži sa 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 na taj način dobije veličina određenog mikroba.

Uzorci su mikroskopirani imerzijskim objektivom uz upotrebu imerzijskog ulja.



Slika 5. Prikaz okularnog i objektnog mikrometra i ugraviranih skala (Duraković i Duraković, 2001)

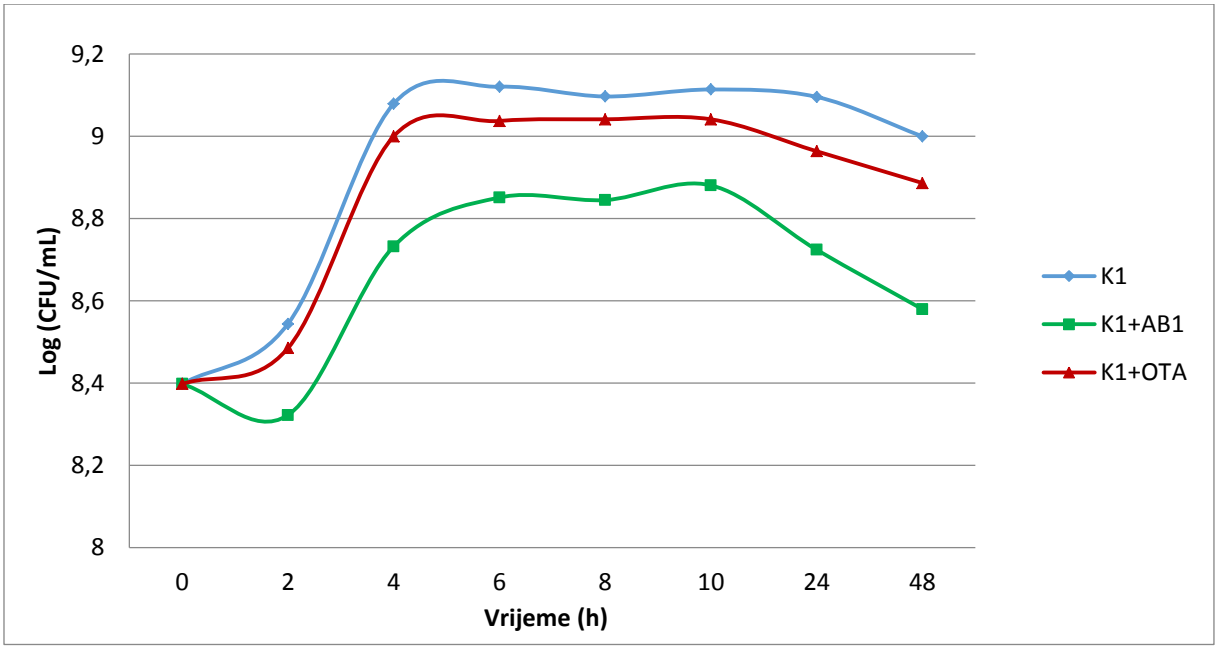
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu određen je utjecaj mikotoksina AFB_1 i OTA na preživljavanje i morfološke promjene bakterije *L. plantarum* 1K tijekom 48 sati u tekućoj podlozi. Preživljavanje bakterija je prikazano kao krivulja rasta, a morfološke promjene praćene su mjerenjem dužine i širine bakterija.

Rezultati istraživanja prikazani su na slikama 6, 7 i 8 i u tablici 1.

4.1. Utjecaj mikotoksina na krivulju rasta *L. plantarum* 1K

Neizravnim određivanjem broja živih stanica bakterija, brojenjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi (MRS) u Petrijevoj zdjelici praćen je rast bakterije *L. plantarum* tijekom 48 sati sa i bez AFB_1 i OTA.



Slika 6. Krivulja rasta *Lactobacillus plantarum* 1K u prisutnosti i bez AFB_1 i OTA pri 37°C tijekom 48 sati uzgoja

Dobiveni rezultati oblikuju krivulje rasta bakterija (slika 6) te se mogu jasno uočiti pojedine faze rasta. Lag-faza odnosno faza suzdržanog rasta kod sva tri uzorka trajala je do 2. sata, nakon koje bakterija ulazi u eksponencijalnu (logaritamsku) fazu koja je trajala do 4. sata uzgoja. Bakterijske stanice su potom ušle u stacionarnu fazu koja je kod kontrolnog uzorka trajala do 24. sata, nakon čega je uslijedila faza odumiranja stanica. Kod uzorka s dodanim

AFB_1 i OTA primjećuje se raniji početak faze odumiranja i to u 10. satu. U uzorcima s AFB_1 broj stanica se smanjuje za 0,1 i 0,3 log jedinica nakon 24 odnosno 48 sati, dok se s dodatkom OTA broj laktobacila smanjuje samo za 0,08 i 0,1 log jedinica nakon 24 i 48 sati.

Dobiveni rezultati utjecaja AFB_1 i OTA na krivulju rasta *L. plantarum* su u suglasju s istraživanjima provedenim s drugim mikroorganizmima i utjecajem mikotoksina na njihov rast. Ispitivanje toksičnog utjecaja AFB_1 na streptokoke inkubirane u mlijeku, pokazuje da broj živih stanica opada povećanjem koncentracije toksina. Smanjenje broja stanica pod utjecajem AFB_1 utječe na sporije stvaranje mliječne kiseline, što produžava vrijeme zgrušavanja mlijeka (Banina i Šutić, 1985). Vrlo mali broj studija je proveden s ciljem utjecaja mikotoksina na BMK. Istraživanja Rašića i sur. (1991) i su pokazale da AFM_1 ima negativan učinak na starter kulturu jogurta, kao što su sposobnost fermentacije starter kulture i utjecaj na dužinu lanca bakterija u jogurtu.

Tablica 1. % preživjavanja *L. plantarum* 1K u prisutnosti AFB_1 i OTA tijekom 48 sati

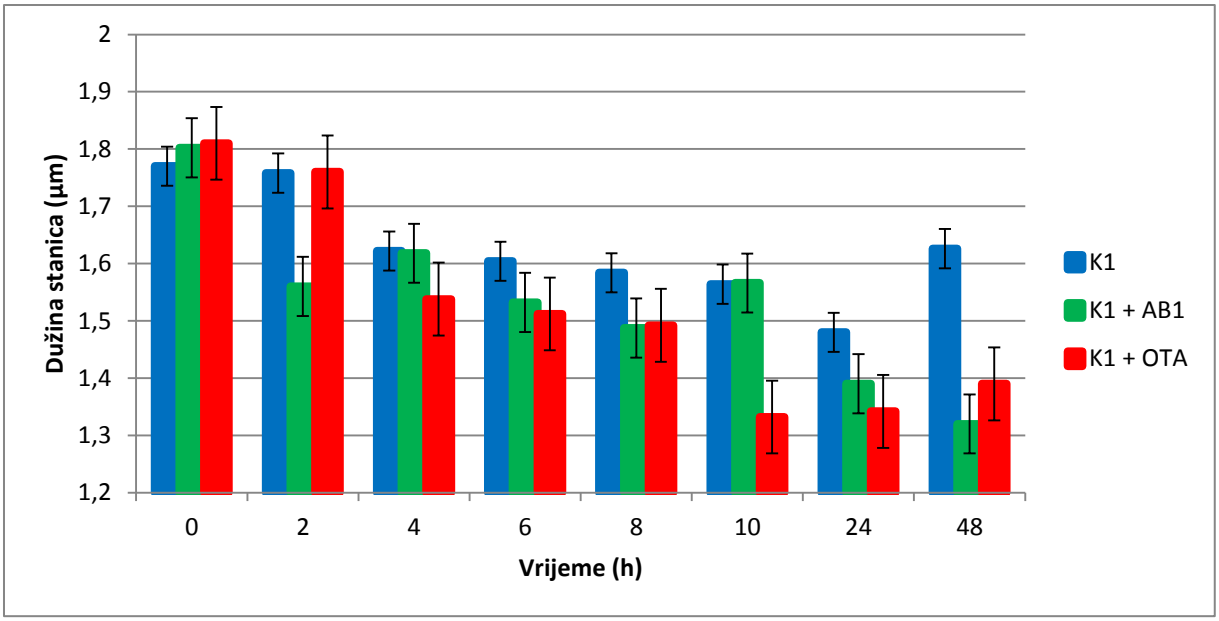
% preživjavanja *L. plantarum* 1K								
	0h	**2h**	**4h**	**6h**	**8h**	**10h**	**24h**	**48h**
1K +AB_1	100	97,4	96,2	97,1	97,2	97,4	96,0	95,3
1K+OTA	100	99,3	99,1	99,1	99,4	99,2	98,5	98,7

Rezultati prikazani u tablici 1 prikazuju da AFB_1 i OTA nisu imali značajan negativan učinak na preživljavanje *L. plantarum* 1K, jer je populacija ispitivanih bakterija nakon 48 sati 95,3% u prisutnosti AFB_1, odnosno 98,7% u prisutnosti OTA, što može voditi zaključku da su se bakterije prilagodile sredini u kojoj su prisutni mikotoksini.

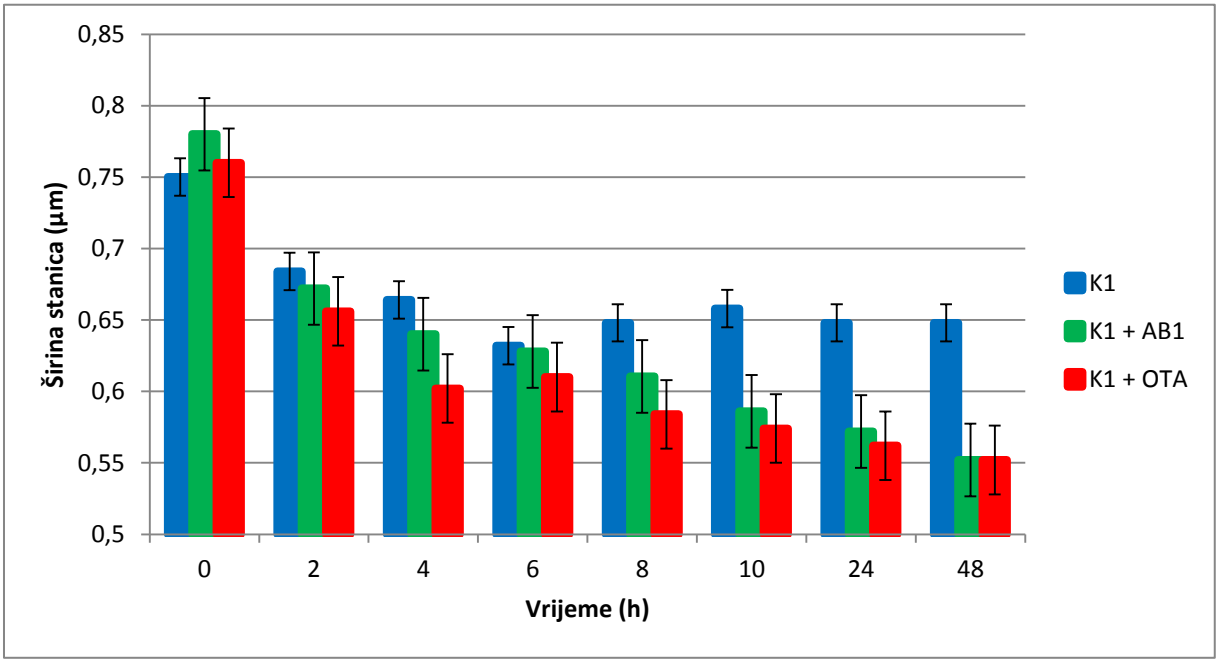
4.2. Utjecaj mikotoksina na morfološke osobine stanica *L. plantarum* 1K

U mikroskopskim preparatima iz kontrolnog uzorka i uzoraka s AFB_1 i OTA vidljiva je promjena u dužini i širini stanica u ovisnosti o vremenu kontakta između bakterije i mikotoksina. Pokusi su provedeni u paralelama tijekom 48 sati.

Rezultati istraživanja su prikazani na slikama 7 i 8.



Slika 7. Utjecaj AFB_1 i OTA na dužinu bakterijskih stanica tijekom 48 sati



Slika 8. Utjecaj AFB_1 i OTA na širinu bakterijskih stanica tijekom 48 sati

Mjerenje stanica je provedeno mikroskopiranjem pod povećanjem od 1000x uz upotrebu imerzijskog ulja s pomoću okularnog i objektnog mikrometra kako bi se odredila dužina i širina obojanih bakterijskih stanica, a za svako mjerenje odabrano je po 25 nasumičnih stanica. Iz dobivenih podataka prikazanih na slikama 7 i 8 vidljivo je da su bakterijske stanice u uzorcima s mikotoksinima u prosjeku bile manjih dimenzija u odnosu na kontrolni uzorak koji je u svim točkama mjerenja imao najveće vrijednosti. Veća razlika u dužini bakterijskih stanica između kontrolnog uzorka i uzoraka s toksinima uočava se nakon 24. sata te je u konačnici dužina stanica smanjena u prosjeku za 22% u prisutnosti s AFB_1 odnosno 16% u prisutnosti s OTA.

I kod praćenja širine bakterijskih stanica uočava se blago opadanje u svim uzorcima s vremenom uzgoja, a do značajnije razlike među uzorcima dolazi nakon 8 sati uzgoja. U svim mjernim točkama, OTA je imao malo veće inhibicijsko djelovanje u odnosu na AFB_1 da bi nakon 48. sata širina stanica u oba uzorka iznosila 14% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku za oba istraživana mikotoksina.

Postoji malo istraživanja o djelovanju mikotoksina na bakterije mliječne kiseline. U nekim prijašnjim istraživanjima dokazano je da aflatoksin djeluje i na morfološka i na fiziološka svojstva ovih bakterija (Banina i Šutić, 1978, 1979; Banina i sur., 1978). Promjene stanica bakterija mliječne kiseline ovise o koncentracijama toksina te dužini izlaganja, a takve su promjene uglavnom nepovoljne za industrijsku preradu mlijeka u različite mliječne proizvode. U prisustvu aflatoksina produžava se vrijeme zgrušavanja mlijeka i dolazi do izdvajanja seruma u proizvodnji jogurta (Banina i Šutić, 1978), zatim, homofermentativne bakterije mliječne kiseline izdvajaju plin te tako postaju heterofermentativne, što ima velikog značaja u proizvodnji sireva, jer na ovaj način može doći do nadimanja sireva (Banina i Šutić, 1979). Galesloot (1956) je utvrdio slične promjene kod bakterija mliječne kiseline pod djelovanjem penicilina; *L. bulgaricus* stvara dugačke niti koje su jako granulirane, a stanice *S. thermophilus* zadebljavaju i stvaraju dugačke lance. Ovakve promjene zapažene su i kod stanica *S. lactis* pod djelovanjem penicilina (Baughman, Nelson, 1958). Morfološke promjene bakterija mliječne kiseline mogu izazvati i male koncentracije drugih spojeva, kao što su preparati za pranje vimena, sredstva za dezinfekciju, klorni preparati i neki deterdženti (Rašić i sur., 1991).

Poznato je da bakterije iz roda *Lactobacillus* mogu vezati aflatoksin B_1 u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Iako većina podataka o učinkovitosti BMK u akumulaciji mikotoksina govori o aflatoksinima, provedena su i istraživanja o interakcijama između BMK i okratoksina A

(Dalié i sur., 2010). Razvijen je model koji predlaže da se mehanizam vezanja aflatoksina B_1 odvija u dva procesa,vezanje (adsorpcija) i otpuštanje (desorpcija) za/od mjesta vezanja na površini stanice mikroorganizma. Odmah nakon početnog kontakta (0-to vrijeme) između stanica BMK *L. plantarum* 1K i oba mikotoksina (slika 7 i 8) vidljivo je povećanje i dužine i širine stanica što se može objasniti vezanjem toksina na površinu stanice, a zatim se dužim vremenom kontakta bakterija-mikotoksin uočava smanjenje veličine stanice zbog otpuštanja mikotoksina. Ovi rezultati ukazuju da promjene na stanicama laktobacila ovise o sposobnosti AFB_1 i OTA da se vežu na funkcionalne skupine na površini stanične stijenke ili da prodru kroz staničnu stijenku ali i o trajanju njihovog učinka.

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti:

1. Aflatoksin B_1 i okratoksin A imaju slabi učinak na rast i morfološke osobine bakterije *Lactobacillus plantarum* 1K.

2. *Lactobacillus plantarum* 1K prilagodio se sredini u kojoj su prisutni mikotoksini, jer je preživljavanje bakterije tijekom 48 sati više od 95% u prisutnosti i AFB_1 i OTA.

3. Iako još nije u potpunosti objašnjen mehanizam vezanja mikotoksina, povećanje dužine i širine stanica u 0-tom satu može se objasniti vezanjem toksina na površinu stanice, a smanjenje veličine stanica dužim vremenom izlaganja mikotoksinima zbog otpuštanja mikotoksina od mjesta vezanja.

4. Iako oba mikotoksina imaju vrlo slabo utjecaj na rast i razvoj stanica *Lactobacillus plantarum* 1K za posljedicu može imati smanjenu aktivnost BMK, a u proizvodnji fermentiranih namirnica može dovesti i do ekonomskih gubitaka.

6. LITERATURA

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabanes F.J. (2001) Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection* **64**, 903–906.

Anonymus (2011) Priprema decimalnih razrjeđenja, <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/microbiology/learning-center/theory/introduction.html>. Pristupljeno 21. svibnja 2016.

Axelsson, L. (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology. U: Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects, (Salminen, A.V. i Wright, A.O., ured.), Marcel Dekker, New York, str: 1-66.

Aziz, N.H., Youssef, Y.A., El-Fouly, M.Z., Moussa, L.A. (1998) Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Botanical Bulletin - Academia Sinica Taipei* **39**, 279–285.

Banina, A., Šutić, M. (1979) Uticaj aflatoksina B_1 na morfološku promenljivost bakterija mlečne kiseline. *Mikrobiologija* **16**(2), 113–120.

Banina, A., Šutić, M., Stojanović, M. (1978) Uticaj aflatoksina B_1 na acido-genu sposobnost nekih bakterija mlečne kiseline. *Mikrobiologija* **15**(1), 31–37.

Banina, A., Šutić, M. (1985) Toksičnost aflatoksina B_1 prema sojevima *Streptococcus lactis*. *Mljekarstvo* **35**(2), 35–42.

Baughman, R. W., Nelson, F. E. (1958) Effect of penicillin upon the morphology and gram staining characteristics of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science* **41**(4), 706.

Bayman, P., Baker, J.L. (2006) Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia* **162**, 215–223.

Coulter, J.B.S. (1984) Aflatoxins in human breast milk. *Annals of Tropical Paediatrics* **4**, 61–66.

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.

Delaš, F. (2010) Mikrobni toksini. U: Hrvatska agencija za hranu: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Grafika, Osijek, str. 31–49.

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**(30), 4012–4018.

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

Duraković, S., Duraković, L. (2001) Mikrobiologija namirnica - osnove i dostignuća, knjiga prva. Kugler, Zagreb.

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

Ehrlich, K.C., Moore, G.G., Mellon, J.E., Bhatnagar, D. (2015) Challenges facing the biological control strategy for eliminating aflatoxin contamination. *World Mycotoxin Journal* **8**,225–233.

Galesloot, T. E. (1956) Lactic acid bacteria which destroy the antibioticum (nisin) of *S.lactis*. *Ned Melk Zuiveltijdschr* **10**, 143–154.

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.

Hardy, S. P. (2002) Human Microbiology, 2. izd., CRC Press, Boca Raton.

Hendrickse, R.G., Maxwell, S.M. (1989) Heroin addicts, AIDS, and aflatoxins. *British Medical Journal* **296**, 1257.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1987) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluation of carcinogenicity. An updating of IARC monographs volumes 1 to Supplement 7, <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/Suppl7.pdf>. Pristupljeno 19. svibnja 2016.

Jorgensen, K. (1998) Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin. *Food Additives & Contaminants* **15**, 550–554.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M. (1989) Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences* **2**, 179–248.

Lamplugh, S.M. (1988) Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood, and serum of pregnant women. *British Medical Journal* **296**, 968.

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**(4), 244–251.

Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D., Frece, J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B_1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control* **34**, 312-317.

Maxwell, S.M. (1989) Aflatoxin in breast milk, neonatal cord blood and sera of pregnant women. *Toxicology* **8**, 19–29.

Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L. (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus Wilh*. *Nature* **205**, 1112–1113.

National Center for Biotechnology Information (2004) PubChem Compound Database; CID=186907, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/186907>. Pristupljeno 18. svibnja 2016.

National Center for Biotechnology Information (2004) PubChem Compound Database; CID=20966, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/20966>. Pristupljeno 18. svibnja 2016.

O'Brien, E., Dietrich, D.R. (2005) Ochratoxin A: The continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology* **35**(1), 33–60.

Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M. (1999) Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* **77**(9), 754–766.

Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2014) Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **9** (3-4), 75–82.

Rašić, J.Lj., Škrinjar, M., Markov, S. (1991) Decrease of aflatoxin B_1 in yoghurt and acidified milks. *Mycopathologia* **113**, 117-119.

Richard, J.L. (2007) Some major mycotoxins and their mycotoxicoses. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 3–10.

Shotwell, L.L., Hesseltine, C.W., Goulden, M.L. (1969) Ochratoxin A occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Journal of Applied Microbiology* **17**, 765–766.

Skaug, M.A., Helland, I., Solvoll, K., Saugstad, O.D. (2001) Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Additives & Contaminants* **18**, 321–327.

Smelt, J., Otten, G.D., Bos, A.P. (2002) Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum. International Journal of Food Microbiology* **73**, 207–212.

Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36**(1), 1-29.

Størmer, F.C. (1992) Ochratoxin A – a mycotoxin of concern. U: Handbook of Applied Mycology, 5. izdanje (Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B., Arora, D.K., ured.), Marcel Dekker, Inc., New York, str. 403–432.

Šušković, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

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

Zain, M.E. (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* **15**, 129–144.

Zimmerli, B., Dick, R. (1996) Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Additives & Contaminants* **13**, 655–668.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van 'T Riet, K. (1990) Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(6), 1875–1881.