Antifungalni učinak ekstrakata morskih organizama

Zorčec, Ana-Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:213918

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

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

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTETOSIJEK

Ana-Marija Zorčec

ANTIFUNGALNI UČINAK EKSTRAKATA MORSKIH ORGANIZAMA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Nutricionizma i znanosti o hrani
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam
Nastavni predmet: Opasnosti vezane uz hranu
Tema rada je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018. održanoj 28. rujna 2018.
Mentor: prof. dr. sc. Stela Jokić
Komentor: izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj
Pomoć pri izradi: Biljana Crevar, dipl. ing.

Antifungalni učinak ekstrakata morskih organizama

Ana-Marija Zorčec, 411-DI

Sažetak: Cilj diplomskog rada je odrediti antifungalni učinak ekstrakata morskih organizama, plaštenjaka *Aplydium conicum*, zelene makroalge *Codium bursa*, smeđe makroalge *Cystoseira compressa* te koralja *Eunicella cavolinii*. Ekstrakti su pripremljeni u vodi za polarne i dimetilsulfoksidu za nepolarne komponente kako bi se usporedilo njihovo djelovanje. Antifungalno ispitivanje je provedeno na najznačajnijim mikotoksikogenim plijesnima: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraces*, *Fusarium gramniearum*, *Fusarium verticillioides*, te *Penicillium expansum* standardiziranom mikrodilucijskom metodom prema CLSI M38-A vodiču. Prema dobivenim rezultatima, uočeno je da su ekstrakti svih morskih organizama imali inhibitorni učinak na pojedine vrste plijesni u određenim koncentracijama. Izvrsne učinke inhibicije - MIC_{50} 5 µg/mL, pokazao je vodeni ekstrakt alge *Cystoseira compressa* za plijesan *Aspergilus flavus* te DMSO ekstrakt koralja *Eunicella cavolinii* na plijesan *Alternaria alternata*. Općenito, najbolje antifungalno djelovanje pokazali su ekstrakti alge *Codium bursa* koji su inhibirali sve primjenjene vrste plijesni. Istražen je i utjecaj ekstrakata na rast plijesni – GIC_{50}, gdje je uočeno da su na rast plijesni *Aspergillus flavus* poticajan učinak imali 4 ekstrakata već pri koncentraciji od 5 µg/mL – ekstrakti alge *Codium bursa* i DMSO ekstrakti alge *Cystoseira compressa* i koralja *Eucinella cavolinii*.

Ključne riječi: plijesni, antifungalni učinak, morski organizmi

Rad sadrži: 39 stranica
22 slike
2 tablice
0 priloga
53 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	izv. prof. dr. sc. Maja Molnar	predsjednik
2.	prof. dr. sc. Stela Jokić	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj	član-komentor
4.	doc. dr. sc. Lidija Dujmović	zamjena člana

Datum obrane: 30. rujna 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD
GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Biochemistry and Toxycology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia
Graduate program Food Science and Nutrition
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Nutrition science
Course title: Food biochemistry
Thesis subject: was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session held on September 28, 2018.
Mentor: Stela Jokić, prof
Co-mentor: Bojan Šarkanj, Asoc. prof.
Technical assistance: Biljana Crevar, dipl. ing.

Antifungal effects of marine organisms extracts

Ana-Marija Zorčec, 411-DI

Summary: The aim of the thesis is to determine the antifungal effect of extracts of marine organisms, the mantle *Aplydium conicum*, the green macroalgae *Codium bursa*, the brown macroalgae *Cystoseira compressa* and coral *Eunicella cavolinii*. The extracts were prepared in water for polar and dimethylsulfoxide for non- polar components to compare their action. Antifungal testing was performed on the most important mycotoxicogenic molds: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium gramniearum*, *Fusarium verticillioides*, and *Penicillium expansum* by a standardized microdilution method according to the CLSI M38-A guide. According to the results obtained, it was observed that extracts of all marine organisms had an inhibitory effect on certain mold species at certain concentrations. Excellent inhibition effects - MIC_{50} 5 µg/mL, were shown by the aqueous extract of *Cystoseira compressa* for *Aspergilus flavus* mold and the DMSO *Eucinella* extract for *Alternaria alternate* mold. In general, the best antifungal activity was demonstrated by *Codium bursa* algae extracts, which inhibited all the mold species used. The influence of extracts on the growth of molds - GIC_{50} was also investigated, where it was observed that 4 extracts had a stimulating effect on the growth of *Aspergillus flavus* already at concentration of 5 µg/mL - *Codium bursa* algae extract and DMSO extracts of macroalgae *Cystoseira compressa* and coral *Eucinella cavolinii*.

Key words: molds, antifungal activity, sea organisms

Thesis contains:
39 pages
22 figures
2 tables
0 supplements
53 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	Maja Molnar, PhD, asociated prof.	chair person
2.	Stela Jokić, PhD, full professor	supervisor
3.	Bojan Šarkanj, PhD, asociated prof.	member
4.	Lidija Dujmović, PhD, assistant prof.	stand-in

Defense date: September 30, 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se komentoru, doc. dr. sc. Šarkanj na velikoj pomoći, stručnom vodstvu i strpljenju pri radu u laboratoriju i izradi diplomskog rada. Zahvaljujem se Projektu: Bioprospecting Jadranskog mora (Europski fond za regionalni razvoj, Operativni program "Konkurentnost i kohezija 2014-2020) koji je osigurao ekstrakte morskih organizama. Hvala prijateljima i kolegama koji su mi zajedničkim trenucima uljepšali studentske dane. Posebnu zahvalnost iskazujem roditeljima na beskonačnom strpljenju i razumjevanju tijekom cijelog perioda studiranja. Hvala vam što ste bili uz mene u dobru i zlu.

Ovaj rad sufinancira Europski fond za regionalni razvoj, Operativni program "Konkurentnost i kohezija 2014-2020 projektom: „BioProspecting Jadranskog mora“.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. PLIJESNI 4

2.1.1. Alternaria alternata 5

2.1.2. Aspergillus flavus 6

2.1.3. Aspergillus ochraceus 9

2.1.4. Fusarium graminearum 10

2.1.5. Fusarium verticillioides 11

2.1.6. Penicillium expansum 11

2.2. MIKOTOKSINI 13

2.3. MORSKI ORGANIZMI I NJIHOV ANTIFUNGALNI UČINAK 14

2.3.1. Aplidium conicum 17

2.3.2. Codium bursa 19

2.3.3. Cystoseira compressa 20

2.3.4. Eunicella cavolinii 21

3. EKSPERIMENTALNI DIO 25

3.1. ZADATAK 26

3.2. MATERIJAL I METODE 26

3.2.1. Priprema ekstrakata: 26

3.2.2. Priprema spora plijesni 27

3.2.3. Antifungalna analiza 27

4. REZULTATI I RASPRAVA 29

4.1. ANTIFUNGALNA AKTIVNOST 30

5. ZAKLJUČCI 33

6. LITERATURA 35

Popis oznaka, kratica i simbola

HAH	Hrvatska agencija za hranu
FAO	Food and Agriculture Organisation - Organizacija za prehranu i poljoprivredu
GAP	Good Agricultural Practices - dobra poljoprivredna praksa
GMP	Good manufacturing practice - dobra proizvođačka praksa
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point - analiza opasnosti i kritične kontrolne točke
MIC	Minimal inhibitory concentration – minimalna koncentracija inhibitora
MLC	Minimal lethal concentration – minimalna letalna koncentracija
LC/MS-MS	Tekućinska kromatografija tandem masena spektrometrija
AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFG1	Aflatoksin G1
AFG2	Aflatoksin G2
AFM1	Aflatoksin M1
OTA	Okratoksin A
ZEN	Zearalenon
FB1	Fumonizin B1
FB2	Fumonizin B2
DON	Deoksinivalenol
CIT	Citrinin
PAT	Patulin
MAA	Mikosporinske aminokiseline
HS-SPME	Mikroekstrakcija
HD	Hidrodestilacija
SC-CO2	Superkritična ekstrakcija s CO2
GC-FID	Plinska kromatografija
GC-MS	Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom

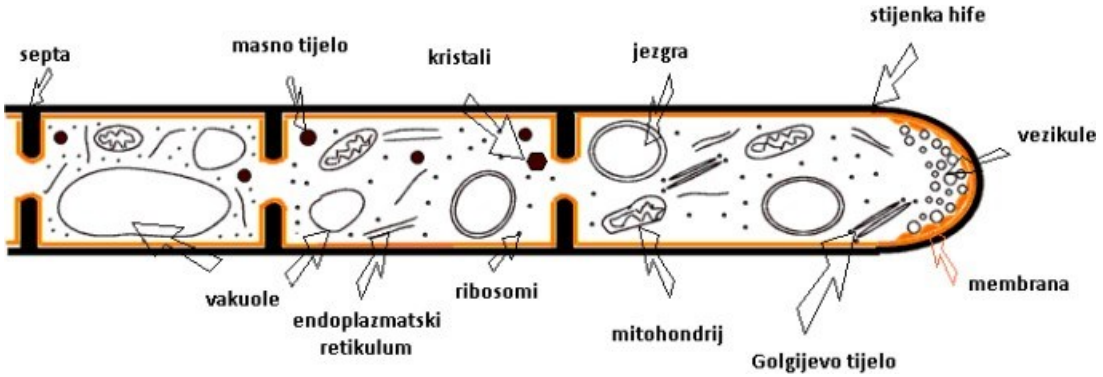
1. UVOD

Plijesni su neizbježni kontaminanti žitarica, voća i povrća a mikotoksini su njihovi toksični sekundarni metaboliti koji mogu uzrokovati različite bolesti. Prema procjeni FAO-a, više od 25% proizvedene hrane u svijetu kontaminirano je mikotoksinima a novija istraživanja potvrđuju da je kontaminacija i viša od 90%. Njihova pojava ovisi o fizikalno-kemiskim čimbenicima (T= 5 do 60 °C, sadržaj vode ≥ 13%, a_w > 0,65, pH= 3-9, koncentraciji plinova u atmosferi, sastavu namirnice i dr.). Mikotoksini se kao sekundarni metaboliti plijesni mogu formirati u različitim usjevima i različitim fazama razvoja biljke – od faze rasta pa sve do skladištenja. Budući da dolazi do klimatskih promjena, posljedično dolazi i do promjene distribucije plijesni diljem svijeta. S ciljem sprječavanja kontaminacije hrane, provode se preventivne mjere temeljene na dobroj poljoprivrednoj praksi (GAP), dobroj proizvođačkoj praksi (GMP) i HACCP-u te ukoliko preventiva ne uspije provode se metode dekontaminacije. Dodatni problem predstavlja povećanje gljivičnih infekcija ali i sve veća otpornost plijesni na do sada primjenjivane antifungalne tvari, stoga raste potreba za pronalaskom novih antifungalnih sredstava. Potencijal su, između ostalog, pokazali morski organizmi, tj. njihovi ekstrakti koje su tek nedavno znanstvenici uzeli u obzir kao materijal bogat različitim bioaktivnim komponentama koje imaju i antifungalno djelovanje. U ovom radu napravljeno je istraživanje o antifungalnom učinku ekstrakata morskih organizama - plaštenjaka *Aplydium conicum*, zelene makroalge *Codium bursa*, smeđe makroalge *Cystoseira compressa* te koralja *Eunicella cavolinii* na najznačajnijim mikotoksikogenim plijesnima: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus, Fusarium gramniearum, Fusarium verticillioides*, te *Penicillium expansum* standardiziranom mikrodilucijskom metodom prema CLSI M38-A vodiču.

2. TEORIJSKI DIO

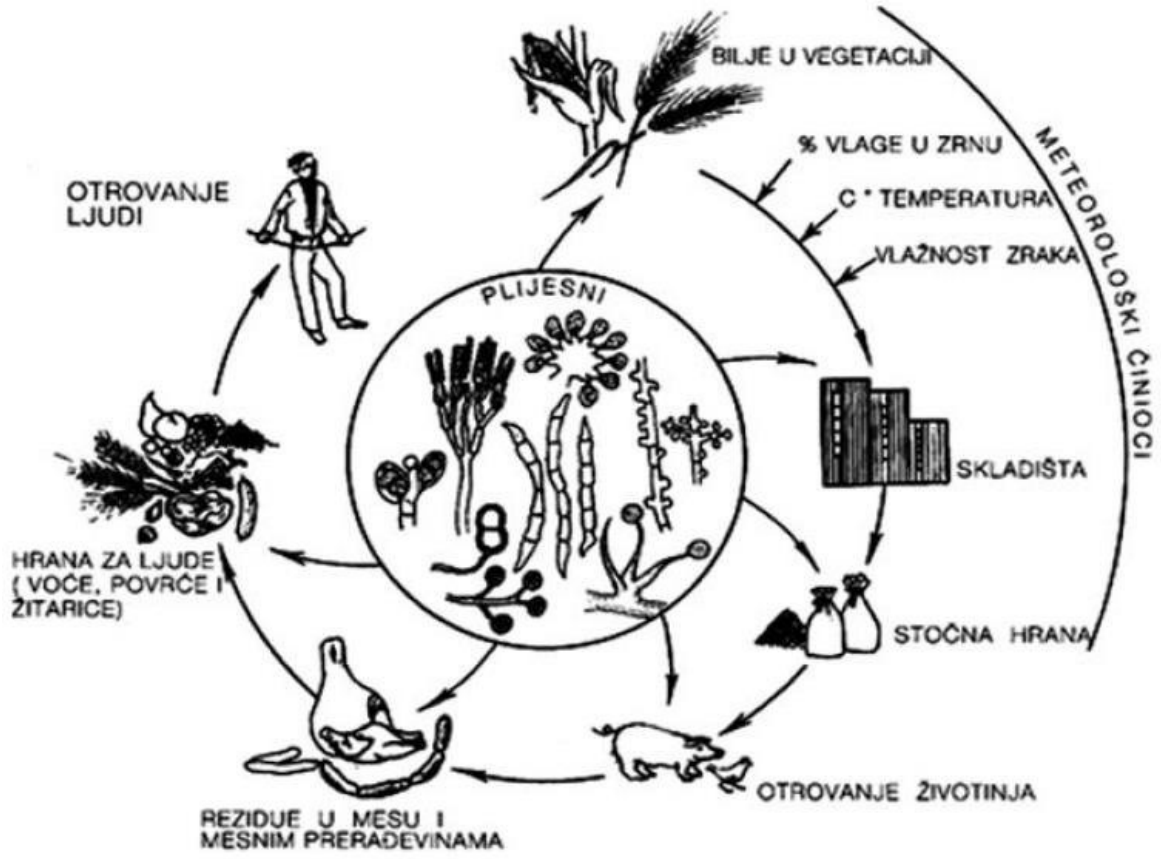
2.1. PLIJESNI

Plijesni su mikroskopske gljivice građene od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila. Široko su rasprostranjene u aktivnim, vegetativnim oblicima te u oblicima latentnih spora. (Pleadin i sur., 2018). Niti – hife, rastu u obliku isprepletene mase – micelij, koji se na podlozi uočava kao prašnjava/paučinasta prevlaka. Hife mogu biti vegetativne (aktivno rastu i oblikuju koloniju) te zračne koje nose strukture za razmnožavanje, tj. spore i tvore paučinasti oblik. Spore mogu biti spolne i nespolne, otporne su, nastaju u velikim količinama, lako se šire te svaka može stvoriti novu koloniju plijesni u povoljnim uvjetima.



Slika 1 Presjek hife plijesni (Šarkanj, 2014)

Plijesni su kemoheterotrofi – apsorbiraju nutrijente. Prilagođene su okolišu te mogu rasti u kiselom području (pH cca 5,0), na površini supstrata (aerobni), otporne su na osmotski tlak (rast u okolišu s visokom koncentracijom šećera ili soli), odgovara im niža koncentracija dušika te iskorištavaju složene ugljikohidrate (lignin). Bolesti koje plijesni mogu uzrokovati – mikotoksikoze, češće su kod domaćih životinja budući da životinje jedu kontaminiraniju i manje procesiranu hranu u odnosu na ljude. Fungalne infekcije – mikoze, klasificirane su kao sistemske (duboko unutar tijela), subkutane (potkožne), kutane (kožne), superficijalne (površinske) i oportunističke (uvjetne) (Duraković i Duraković, 2003).

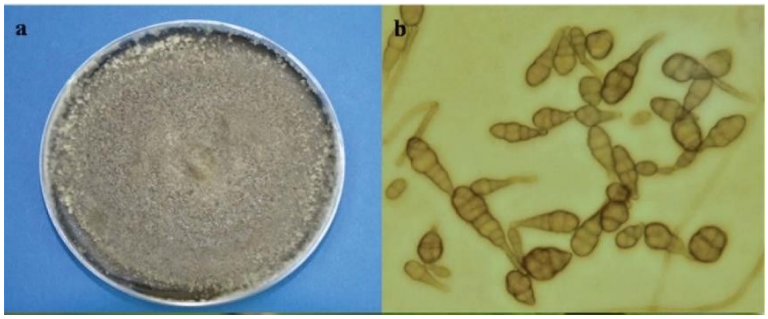


Slika 2 Izvori kontaminacije i unos mikotoksina u ljudski organizam (Ožegović i Pepeljnjak, 1995)

2.1.1. Alternaria alternata

Alternaria je rod plijesni s više od 250 poznatih, vrlo rasprostranjenih vrsta koje uzrokuju štete na usjevima te alergijske reakcije i infekcije kod ljudi i životinja. Najmanje 20% poljoprivrednih prinosa propadne upravo zbog ove plijesni – može zaraziti više od 4000 vrsta biljaka. Hrane se celulozom, otporne su i brzo rastu te se mogu kolonizirati i u zatvorenom okruženju (Pinto i Patriarca, 2017; Patriarca i sur., 2014). Plijesni roda *Alternaria* su saprofiti, rastu na tlu, mrtvom biljnom materijalu, žitaricama, drveću i travama, na svim visokoceluloznim supstratima i na mesu, uzrokujući truljenje stabljike i crno truljenje plodova (Duraković i Duraković, 2003). Rastu na vlažnim područjima a_w> 0,85, t = 1-35 °C, optimalno 20-25 °C, pH 2,5-10, ovisno o mediju u kojem se nalaze (Lee i sur., 2015).

Šire se sporama u suhim, vjetrovitim uvjetima. Spore su ovalnog oblika, duljine 20–50 µm, zelene do maslinasto-zelene boje, bijelih rubova. Izolati nakon 7-10 dana tvore kolonije promjera > 70 mm. Kruškolike spore mogu tvoriti lance koje sadrže 6-14 spora te naknadno mogu stvarati sekundarne i tercijarne lance sa 2-8 spora (Troncoso-Rojas i sur.,2014). Kolonije su sive do crne boje, vunaste teksture. Prema nekoliko studija, otežavajući faktor pri identifikaciji jest velika varijabilnost unutar vrste *Alternaria alternata* - na karakteristike i fiziološke promjene kolonije utječu i uvjeti rasta (Troncoso-Rojas i sur., 2014). Raširena je po cijelom svijetu i može se razmnožavati u različitim sredinama - smatra se slabim i oportunističkim patogenom. Inicijacija infekcijskog procesa je prijanjanje spora za kutikulu. U plodove ulazi preko otvora uzrokovanih oštećenjem ili prirodno prisutnih mikropukotina u epidermi, te se razvija kako plod zrije. Može se naći i u drugim tkivima (sjeme, lišće, stabljike, cvijet), uglavnom već oslabljenima uslijed stresnih utjecaja (mehanička oštećenja, oštećenja uzrokovana previsokom ili preniskom temperaturom, tijekom berbe) te tako utječe na redukciju poljoprivredne proizvodnje izravno - zarazom plodova ili neizravno – narušavanjem fiziologije fotosinteze biljaka. Osim u razdoblju vegetacije, razvija se i tijekom berbe, transporta i skladištenja te utječe na propadanje plodova nakon berbe (Troncoso-Rojas i sur.,2014). Smatra se najmoćnijim i najjačim izvorom alergena u zraku i uglavnom inducira respiratorne bolesti (Gabriel i sur., 2016).



Slika 3 *Alternaria alternata,* micelij na PDA (a), konidije (b) (Espinoza-Verduzco i sur., 2012)

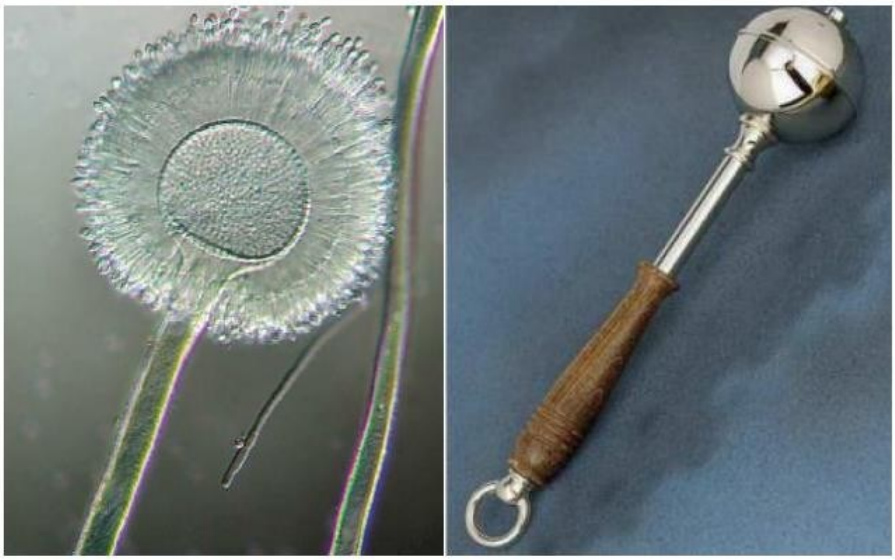
2.1.2. Aspergillus flavus

Aspergillus je široko rasprostranjen rod plijesni s više od 200 vrsta, izoliranih iz različitih supstrata s vrlo lakom disperzijom spora. Prvo izvješće o rodu *Aspergillus* objavljeno je 1729. godine – opisao ga je firentinski svećenik i mikolog P. A. Micheli i imenovao na temelju strukturne sličnosti konidiofora plijesni s aspergillumom, liturgijskim uređajem za prskanje

svete vode (Amaike i sur., 2011). Kolonije su bijele boje a dozrijevanjem postaju zelenkasto-plave (Durakovićі Duraković, 2003). Plijesni roda *Aspergillus* su osmofili, halofili i kserofili. Najčešće se nalaze na uskladištenim proizvodima, uključujući žitarice, voće, orašasto voće, začini, mesni proizvodi i dr. (Pleadin i sur., 2018).

Aspergilus flavus je saprofitna plijesan i oportunistički patogen. Raste prvenstveno na toplim tlima i raspadljivom materijalu – uvenulim biljkama i tkivima uginulih životinja, no može se naći i u kući te na građevinskom materijalu kao i na ljudima gdje raste kao patogen. Rastu na temperaturi 10-48°C, optimalno cca 33°C, pri a_w od 0,78 te pH 2,1-11,2 (Gamaletsou i sur., 2017). Uzrokuje bolesti na važnim poljoprivrednim kulturama – kukuruz, pšenica, proso, kikiriki, riža, pamuk, usjev i sjemena žitarica, uljarica, orašastih plodova – prije i nakon žetve te propadanje (crno truljenje) agruma tijekom skladištenja. Razmnožava se sporama a sporulacija ovisi o okolišnim uvjetima – dostupnost hranjivih tvari (pogoduju mehanička oštećenja ploda) temperaturi, svijetlu i sl.

Uzrokuje alergijske reakcije, infekcije, plućne i moždane edeme, aspergiloze, aflatoksikoze, hepatotoksičnost. Proizvodi nekoliko mikotoksina od kojih su najpoznatiji aflatoksini B1 i B2 koji su imunosupresivni, kancerogeni i hepatotoksični. Kontaminirani mogu biti i proizvodi animalnog porjekla ukoliko je životinja hranjena kontaminiranom hranom gdje mogu zaostati nativni mikotoskini ili njihovi metaboliti (npr AFM1 koji nastaje iz AFB1) (Plascencia-Jatomea i sur., 2014).



Slika 4 Mikrofotografija konidiofore *A. Cretensis* i aspergiliuma (Šarkanj, 2014)



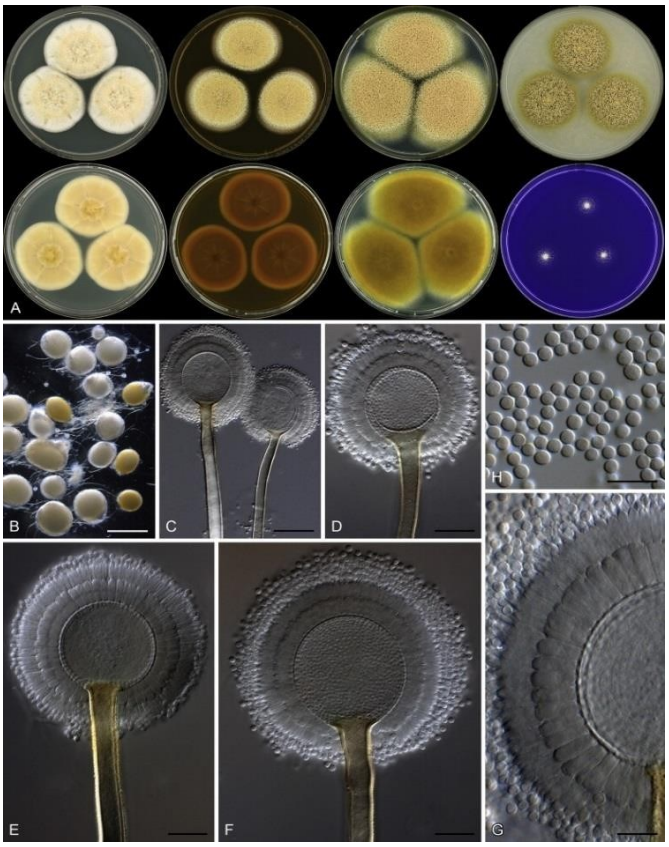
Slika 5 Kronična infekcija vrata glavića penisa uzrokovana s plijesni *A. flavus* i histološki snimak inficiranog tkiva (Šarkanj, 2014)



Slika 6 Infekcija silikonskog implantata dojki ispunjenog fiziološkom otopinom uzrokovana s plijesni *A. flavus* i histološki snimak inficiranog tkiva (Šarkanj, 2014)

2.1.3. Aspergillus ochraceus

Vrsta plijesni koja ima sposobnost rasta na različitim mjestima uključujući tlo te sva otvorena i zatvorena područja s visokim udjelom vlage. Raste na biljkama – grožđe, kukuruz, riža, kikiriki, voće i orašasti plodovi te konoplja. Od prehrambenih proizvoda najčešće se može naći na grožđu, grahoricama, orašastim plodovima, sjemenkama te sušenim proizvodima (meso i riba). Razmnožava se širenjem spora koje u pogodnom okruženju razvijaju nove kolonije, pri temperaturi 8-37°C i aw 0,95-0,99 (Pitt i Hocking, 2009). Uzrokuje aspergiloze, alergije i infekcije (Howard, 2003). Proizodi nekoliko mikotoksina od kojih je najpoznatiji ohratoksin A (OTA) koji je kancerogen, neurotoksičan, nefrotoksičan i imunosupresivan (Bui-Klimke i Wu, 2015).

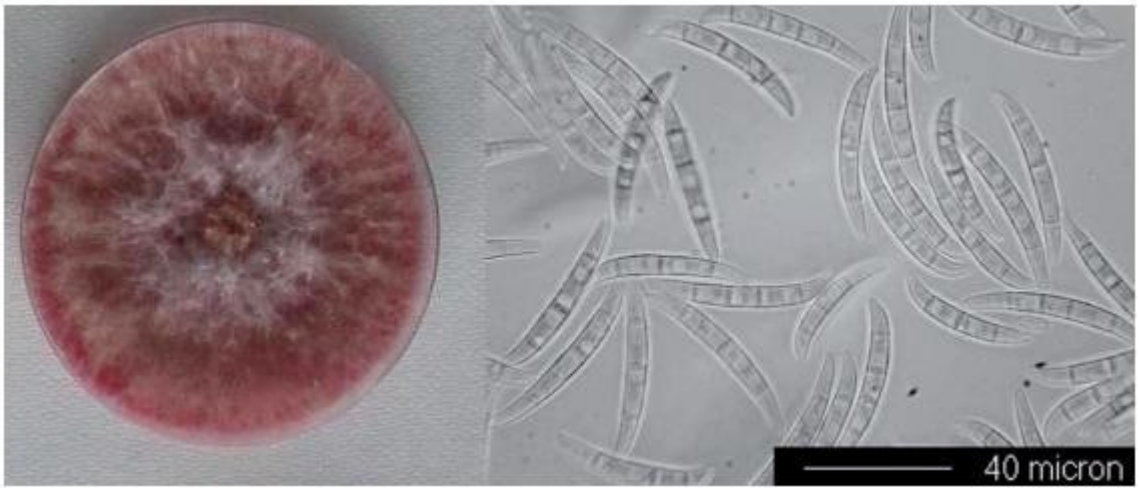


Slika 7 *Aspergillus ochraceus*. Kolonije (A), sklerot (B) konidiofori (C-G), konidije (H) (Visagie i sur., 2014)

2.1.4. *Fusarium graminearum*

Tehnikama DNK sekvencioniranja je sugerirano da postoji preko 300 vrsta roda *Fusarium* (Munkvold, 2017). Rastu na tlu, biljkama i žitaricama – na korjenju, listovima, sjemenkama i plodovima u vlažnim uvjetima te u unutrašnjem prostoru na vlažnim mjestima, a_w 0,86-0,91 (INSPQ). Razmnožavaju se raspršivanjem spora (konidije) koje su višestanične, jajolikog ili srpolikog oblika. Kolonije mogu biti ravne do vunaste teksture nalik na pamuk a boja od bijele, žute, preko boje lososa i cimeta do ljubičaste. Uzrokuju smeđe truljenje agruma i meko truljenje plodova smokava (Duraković i Duraković, 2003). Mogu rasti i na/u ljudskom organizmu te uzrokovati alergijske reakcije i infekcije koje mogu biti smrtoosne.

Fusarium graminearum – poznata i *kao Gibberella zeae*, jedna je od najraširenijih vrsta. Ima širok raspon domaćina na kojima raste. Nastanjuje pšenicu, ječam, zob i kukuruz te uzrokuje niz bolesti od kojih fruzijska palež klasova te infekcije riže, krumpira, mahunarki i kave predstavljaju veliku ekonomsku štetu i gubitke. Spore ulaze kroz postojeće otvore i kroz meko tkivo te se razvijaju na osjetljivijm dijelovima biljaka (Bushnell i Leonard, 2003). Bolest se uglavnom kasno primjeti, kada biljka požuti – infekcija blokira žile u korjenskom sustavu te na taj način biljka dehidrira. Proizvodi mikotoksine trihotecene (vomitoksin deoksinivalenol, DON) – inhibitore sinteze proteina, zearalenon (fitoestrogeni mikotoksin) i druge sekundarne metabolite. Uzrokuju toksikoze kod životinja i ljudi (Munkvold, 2016) a zanimljivo je da se upravo ova plijesan uzgaja u svrhu proizvodnje visoko proteinske hrane – mikoprotein sadrži cca 75% proteina, <50% masti, bez kolesterola (Duraković i Duraković, 2003).



Slika 8 *Fusarium graminearum* na PDA i makrokonidije (Pancaldi i sur., 2010)

2.1.5. *Fusarium verticillioides*

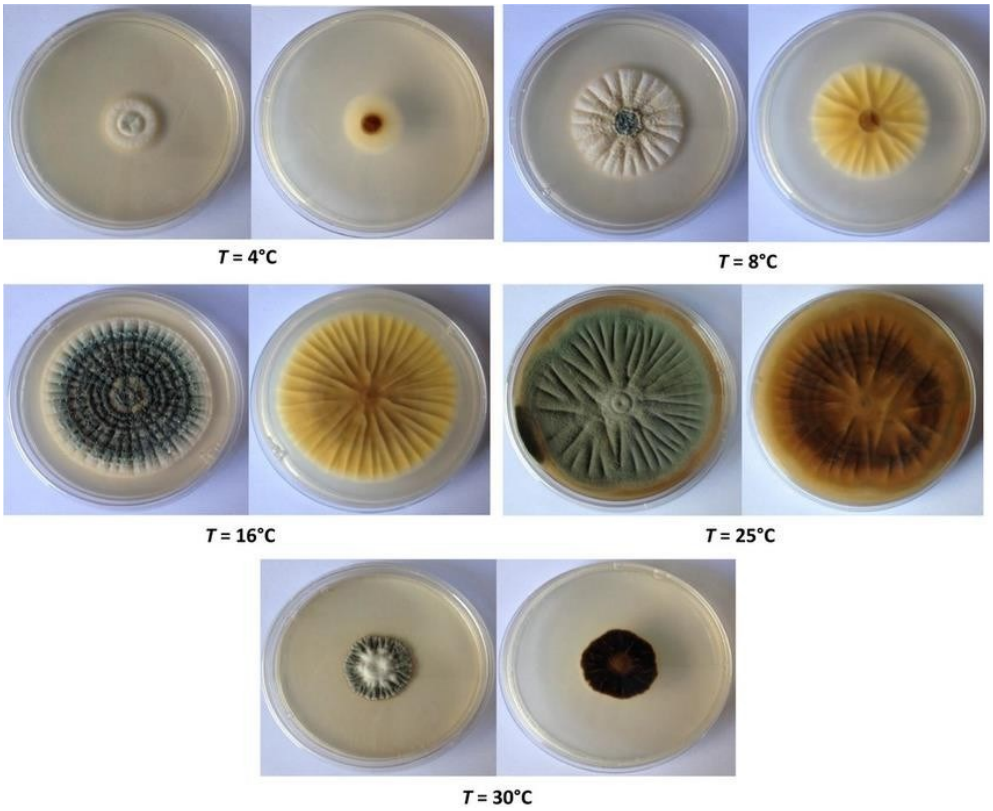
Najčešća toksična vrsta koja se nalazi u kukuruzu i pšenici (Munkvold, 2016). Ima širok raspon domaćina - čak 11 000 biljnih vrsta te može inficirati bilo koji dio biljke u bilo kojoj fazi razvoja. Uzrokuje trulež sjemena i stabljike, bolest sadnica te infekcije bez simptoma. Proizvodi mikotoksine fumonizine koji uzrokuju toksikoze, kao npr. leukoencefalomalaciju kopitara – ELEM i plućni edem kod svinja te rak jednjaka i defekte neuralne cijevi kod fetusa (Munkvold, 2016).

2.1.6. *Penicillium expansum*

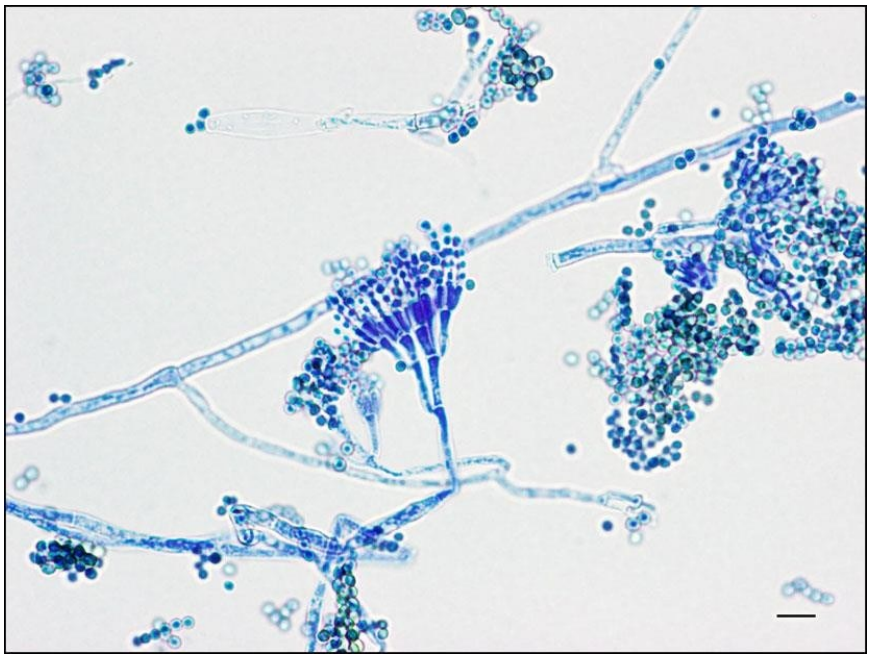
Penicillium je rod s više od 200 poznatih vrsta (Pleadin i sur., 2018). Rastu u tlu, kompostu, žitaricama, oštećenim plodovima te u zatvorenom prostoru na vlažnim površinama i prašini (Burge, 1985). Odgovarajući okolišni uvjeti rasta su temperature 5-37 °C (optimalna 20-30 °C), pH 3-4,5, a_w 0,78-0,88 (Centre d'expertise et de référence en santé publique). Spore su jednostanične - konidiospore a kolonije bijele boje, dozrijevanjem postaju zelenkasto-plave. Uzrokuju zeleno truljenje limuna i plavo pljesnjivo truljenje jabuka, krušaka i koštuničavog voća (Duraković i Duraković, 2003).

Penicillium expansum je psihrofilna plava plijesan. Za razliku od drugih plijesni, *Penicillium expansum* ne može prodrijeti u netaknutu epidermu voća i povrća te je stoga poznat i kao
„patogen rane“, budući da ulazi kroz oštećenu epidermu, često kod nepravilnog skladištenja. Uzrokuje bolest plave plijesni koja se razvija tijekom skladištenja voća i povrća te stvara neurotoksični mikotoksin patulin (Errampalli, 2014). Uporaba kontaminiranih plodova u pripravi proizvoda može rezultirati visokom koncentracijom mikotoksina patulina što posljedično može uzrokovati probavne smetnje te smetnje kod funkcioniranja živčanog sustava (Errampalli, 2014; Pleadin i sur., 2018).

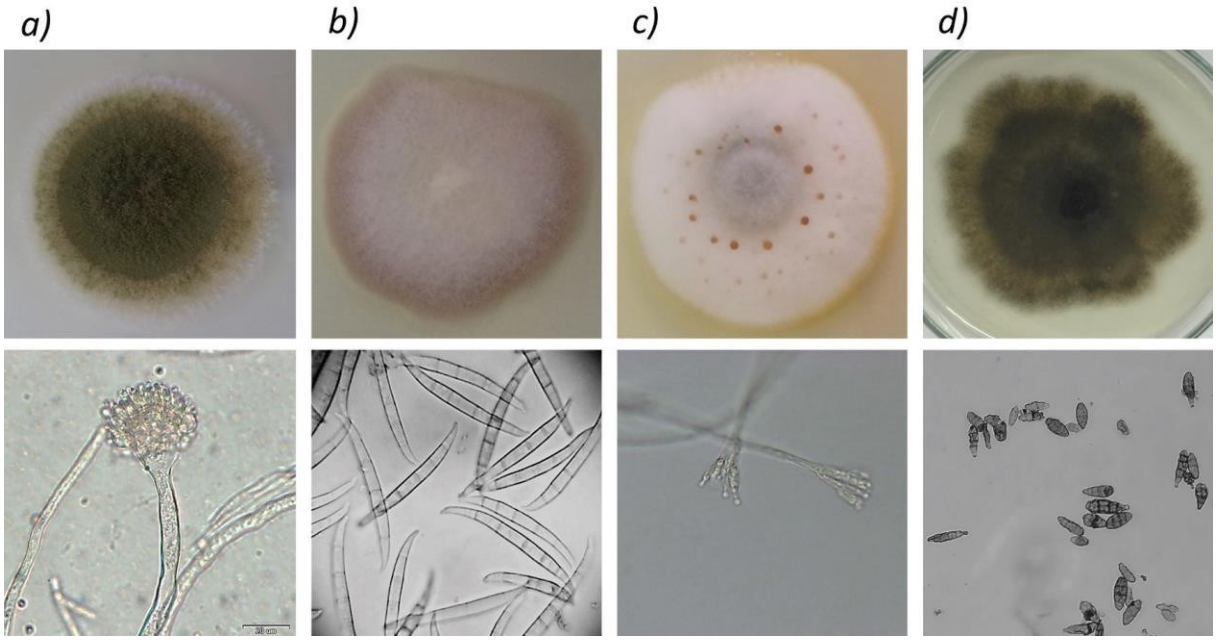
Raste na temperaturi 15-27°C, a_W 0,78-0.88, pH 3-4,5 (Larous i sur., 2007; Centre d'expertise et de référence en santé publique).



Slika 9 *Penicillium expansum* kolonije narasle nakon 14 dana pri različitim temperaturama, gornja i donja strana (Tannous i sur., 2015)



Slika 10 *Penicillium* spp. (INSPQ, 2016)



Slika 11 Plijesni a) *Aspergillus flavus*; b) *Fusarium verticilioides*; c) *Penicillium expansum*; i d)

Alternaria alternata narasle na PDA agaru, 7.dan (Kovač i sur., 2018)

2.2. MIKOTOKSINI

Mikotoksini (gr. mykos – gljiva, toxicum – otrov) su toksični sekundarni metaboliti plijesni koje predstavljaju dio prirodne mikroflore žitarica. Do rasta plijesni dolazi ne samo u polju već i tijekom rasta biljke, nepravilnog transporta, skladištenja i procesiranja te se njihovom proliferacijom na sirovinama mikotoksini mogu naći i u gotovim proizvodima (HAH, 2013).

Preduvjeti za biosintezu mikotoksina su postojanost toksikogene plijesni a faktori koji utječu na njihov razvoj su supstrat, temperatura i vlaga. U optimalnim uvjetima plijesan raste, hrani se organskom tvari i stvara energiju istovremeno proizvodeći mikotoksine.

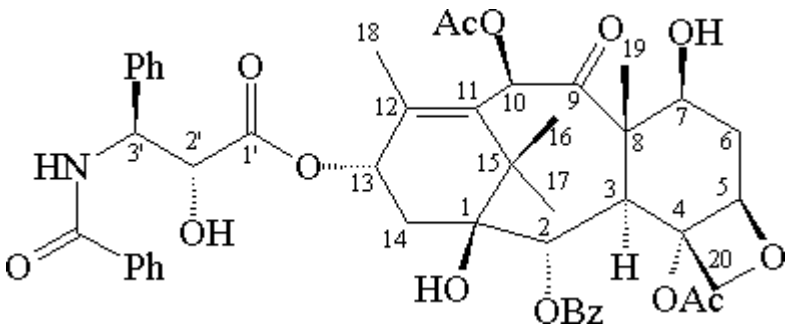
Do danas je poznato više stotina različitih mikotoksina, različitih struktura i bioloških učinaka. Postojanost i koncentracija mikotoksina su varijabilni te ovise o vrsti, vremenskim uvjetima i odgovoru stanice na stres (Waśkiewicz i Goliński, 2013). Važno je napomenuti kako prisustvo mikotoksina nije nužno ovisno o prisutnosti plijesni. Osim što su onečišćivači hrane, uzročnici su različitih bolesti – mikotoksikoze, koje mogu biti akutne (posljedica jednokratnog konzumiranja namirnica s visokom koncentracijom mikotoksina) ili kronične (konzumacija

namirnica s umjerenom koncentracijom mikotoksina kroz duži vremenski period) koje su

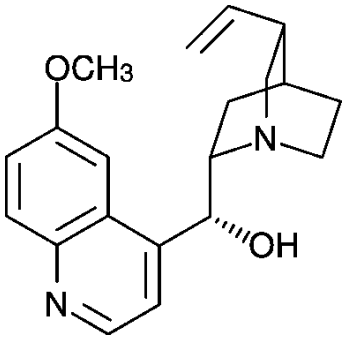
povezane s razvojem malignih bolesti (karcinogenost, mutagenost, imunotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, fenotoksičnost, dermatotoksičnost, hematotoksičnost, teratogenost). Simptomi ovise o čimbenicima – starosna dob, spol, vrsta i koncentracija mikotoksina, vrijeme izloženosti, distribucija u tkivu, metabolizam, poluvrijeme raspada i učinkovitost organizma u njegovom uklanjanju. Bolesti su sezonske prirode (klimatski uvjeti utječu na rast i razmnožavanje plijesni). Mikotoksini se mogu metabolizirati i modificirati a nakon ingestije prevesti u matični oblik (maskirani mikotoksini). Oni se ne mogu detektirati analitičkim metodama što predstavlja problem u procjeni rizika. Od novih metoda, za detekciju i kvantifikaciju se najperspektivnijom pokazala tekućinska kromatografija tandem masena spektrometrija (LC/MS-MS), ion trap, time of flight, visokorezlucijska orbitrap masena spektrometrija (M. Kovač i sur., 2018). Najznačajniji kontaminanti hrane su aflatoksini (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1), ohratoksin A (OTA), zearalenon (ZEN), fumonizini (FB1, FB2), trihoteceni (deoksinivalenol (DON), T-2, HT-2 toksini), citrinin (CIT) i patulin (PAT) a najčešći izvori mikotoksina u hrani su žitarice, brašno, kruh, mahunarke, riža, mlijeko i mliječni proizvodi, meso i suhomesnati proizvodi, masline i maslinovo ulje, kava, suho voće, vino, pivo, sokovi, začini, čajevi (Šarkanj i sur. 2010). Zbog ovisnosti pojavnosti mikotoksina o vremenskim uvjetima, moguća su odstupanja, tj. godišnje razlike u kontaminaciji sirovina te je prepručeno provoditi redoviti godišnji monitoring i procjenu rizika (Zorčec i sur., 2018). Najviše dopuštene količine mikotoksina u hrani propisane su Zakonom o kontaminantima (NN 39/13, 114/18).

2.3. MORSKI ORGANIZMI I NJIHOV ANTIFUNGALNI UČINAK

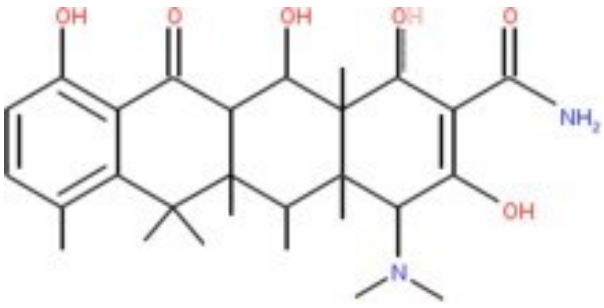
O ljekovitim svojstvima biljaka i životinja pisano je tisućama godina. Kao primjer, mogu poslužiti dokumenti Pedaniusa Dioscoridesa („De Materia Medica“) iz 75. godine i 3500 godina star Ebersov Papirus (Jacob i Walker, 2005). Većina lijekova dobivenih iz prirodnih izvora (biljke, morski organizmi i mikrobi) ima antikancerogena i antiinfektivna svojstva (budući da navedeni organizmi proizvode biološki aktivne spojeve u obrani od grabežljivaca). Neki od primjera su taksol, vinkristin, kamptotecin (antitumorsko djelovanje), kinin i artemisinin (antimalarijsko djelovanje), tetraciklini, makrolidi, cefalosporini (antibakterijsko djelovanje) te polieni, echinocandini, pneumocandini, aureobazidini, sordarini (antifungalno djelovanje). Mnogi od navedenih spojeva otkriveni su prije mehanizma njihovog djelovanja (Jacob i Walker, 2005).



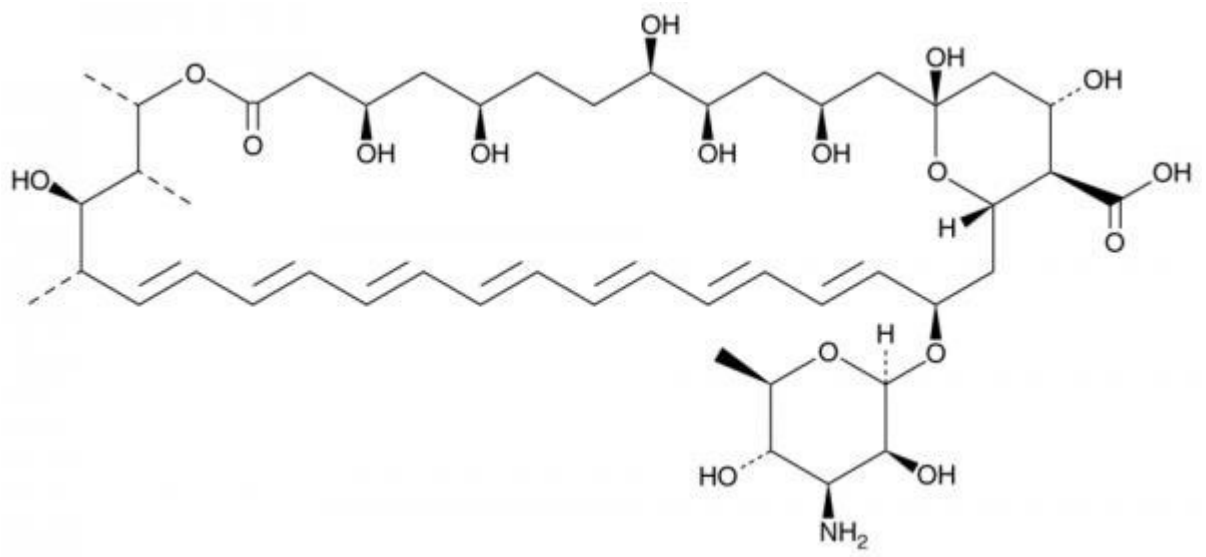
Slika 12 Kemijska struktura taksola



Slika 13 Kemijska struktura kinina



Slika 14 Kemijska struktura tetracklina



Slika 15 Kemijska struktura poliena

U prošlom desetljeću povećalo se zanimanje za morske organizme, plaštenjake, makroalge i mikroalge te koralje (posebno u zapadnom svijetu, gdje su prije bile zapostavljene i o njima se nije razmišljalo kao korisnom resursu bioaktivnih spojeva). Prvenstveno su istražene zbog toga što predstavljaju netaknut materijal za proizvodnju te zbog biomase koja je prepoznata kao izvor vrijednih komponenata koje se mogu primjeniti u proizvodnji različitih proizvoda – od poljoprivrednih do prehrambenih i kozmetičkih. Postignut je napredak u području identifikacije bioaktivnih spojeva koji imaju potencijal u razvoju novih lijekova i funkcionalne hrane. Neke od vrijednih komponenata morskih algi su pigmenti, lipidi, masne kiseline, steroli, polisaharidi, peptidi, proteini, i sekundarni metaboliti – mikosporinske aminokiseline (MAA), fenolni spojevi, terpeni, i ostali. Svi ovi spojevi specifični su za različite skupine i vrste algi (Stengel i Connan, 2015). Zanimljivo je da koncentracija bioaktivnih spojeva varira ovisno o godišnjem dobu, položaju, promjenama okoliša i uvjetima rasta te o načinu sušenja i metodi ekstrakcije (Jerković i sur., 2019). Bioaktivnost navedenih komponenata obuhvaća antioksidativno, protuupalno, antidijabetičko, antitumorsko, antivirusno, antimikrobno, antiparazitsko, antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Stoga i ne čudi da alge imaju vrlo važnu ulogu u budućnosti te se radi na učinkovitijim pouzdanim metodama ekstrakcije njihovih vrijednih spojeva (Stengel i Connan, 2015).

Alge su zastupljene u tri skupine - *Chlorophyta* (zelena), *Phaeophyta* (smeđa) i *Rhodophyta* (crvena) (Jerković i sur., 2019). Iako je važna bioaktivnost cjelokupnih ekstrakata algi dobivenih različitim otapalima, za sada, prema mišljenju autora Lopes i sur. (2015), smeđe alge imaju istaknuto mjesto u istraživanjima budući da su jedina skupina algi sposobnih za proizvodnju jedinstvenih metabolita, polifenola florotanina (polimeri floroglucinola-1,3,5- trihidroksibenzena, biosintetizirani putem acetat-malonat u golgijevom aparatu u perinuklearnom području stanice). Florotanini se u smeđim algama nalaze kao dio staničnih membrana te pohranjeni u fizodama. Glavna funkcija im je obrana organizma od oksidativnog stresa, patogena i biljojeda. Florotaninski ekstrakti su posebno zanimljivi zbog njihove antifungalne aktivnosti protiv nekoliko sojeva kvasaca i *Dermatophyte* a njihova biološka svojstva pripisuju se izoliranim spojevima ali i ekstraktima. U usporedbi s nekoliko lijekova, florotanini pokazuju smanjenje otpornosti mikroorganizama i smanjenje nepoželjnih nuspojava. Od svih bioloških aktivnosti florotanina (protuupalna, antioksidativna, antibakterijska i antifungalna), antifungalna aktivnost je najmanje istražena. Lopes i sur. (2015) navode da je provedeno istraživanje u kome su procjenili izolirani dieckol iz smeđe alge *Ecklonia cava Kjellman* i dokazali njegovu antifungalnu aktivnost protiv dermatofita *Trichophyton rubrum* (promovira gubitak integriteta citoplazmatske membrane). Procjenjena je i antifungalna aktivnost pročišćenih ekstrakata florotanina na kvascima, dermatofitima i plijesni roda *Aspergillus*. Uočeno je da su dermatofiti bili najosjetljiviji na djelovanje florotanina, dok su ekstrakti na kvasce djelovali fungistatično a na *Aspergillus* inaktivno, tj nisu imali utjecaja.

2.3.1. Aplidium conicum

Plaštenjak reda *Aplousobranchia*, obitelji *Polyclinidae*. Zaobljen, glatkog i čvrstog oblika, žuto- narančaste boje, mpže narasti do 15 cm. Obitava u Sredozemnom i Sjevernom moru te na području sjevernog Jadrana i Atlantskog oceana na osvjetljenim i blago zasjenjenim područjima na dubini 5-50 m. Može se razmnožavati spolno i nespolno (Données d'Observations pour la Reconnaissance et l'Identification de la faune et la flore Subaquatiques

).

Iz vrste *Aplidium* izolirani su bioaktivni metaboliti - dušični i nedušični spojevi, od kojih su najznačajniji linearni i ciklički prenil hidrokinoni i kinoni – meroterpeni s citotoksičnom aktivnošću. (Bertanha i sur., 2014) Neobična karakteristika je da vrsta i koncentracija meroterpena ovisi o zemljopisnom prostoru na kom se nalazi (Menna i sur., 2013).

Spojevi koji su izolirani u pojedinim istraživanjima su terpenski kinoni - konicakinoni A i B - pokazali snažno citotoksično djelovanje in vitro na C6 gliomalnim stanicama štakora (Aiello i sur., 2003), kromenoli i konitiakinoni koji su pokazali citotoksičnost kod stanica raka dojke (Menna i sur., 2013), 6-bromo-hipaforin, plakohipaforin-A i alkaloid konikamin, specifični antagonist histamina (Aiello i sur., 2003), benzokinoni tiaplidiakinoni koji induciraju proizvodnju reaktivnih vrsta kisika (ROS-ova) te posljedično mogu izazvati smrt stanice apoptozom (Aiello i sur., 2005) i aplidiasteroli koji imaju citotoksično djelovanje na gliomalnim stanicama štakora i tumorskih stanica makrofaga kod miševa (Aiello i sur., 2003).



Slika 16 *Aplydium conicum* - 04/2018, Zadar Kolovare II, geografska širina: 44° 07′ 00″, geografska dužina: 15° 14′ 00″

2.3.2. *Codium bursa*

Zelena alga, pripada redu *Codiaceae*. Obitava u umjerenim i suptropskim područjima na osvjetljenim mjestima, do 50 m dubine. Može narasti do 40 cm i često formira kolonije. Starije jedinke u sredini baršunastog spužvastog talusa imaju ulegnuće. (sealifebase.ca). Spororastuća je i nema veliku potrebu za hranjivim tvarima budući da ih može zadržati i reciklirati. Prema rezultatima istraživanja koje su objavili Jerković i sur. (2019) na algi *Codium bursa*, prikupljenoj iz Jadranskog mora, uočena je razlika u sastavu sušene i svježe alge - kao i ekstrakta zamrznute alge. Nakon mikroekstrakcije (HS-SPME), hidrodestilacije (HD) I superkritične ekstrakcije s CO_2 (SC-CO_2), urađena je plinska kromatografija i masena spektrometrija (GC-FID; GC-MS). U svježoj algi glavni sastojak je bio dimetil sulfide, dok je u sušenoj veći postotak imao heptadekan. Destilat svježe alge sadržavao je heptadekan I dokozan u većoj koncentraciji dok je nakon sušenja prevladavao (E)-fitol koji je glavni sastojak i u (SC-CO2) smrznutom ekstraktu, u kom su još određeni palmitinska (25,4%), oleinska (36,5%), linolna (11,6%) i stearinska (9,0%) masna kiselina te loliolid (3,51%). Istraženi su i antifungalni učinci te je uočeno da je ekstrakt zamrznute alge pokazao bolji antifungalni učinak kod *Fusarium* spp., dok je ekstrakt dimetil sulfoksida imao bolji učinak pri inhibiciji *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus* i *Rhizophus* spp. (Jerković i sur., 2019).



Slika 17 *Codium bursa* - 04/2018, otok Iški Mrtenjak, geografska širina: 44° 00′ 36″, geografska dužina: 15° 10′ 36″

2.3.3. Cystoseira compressa

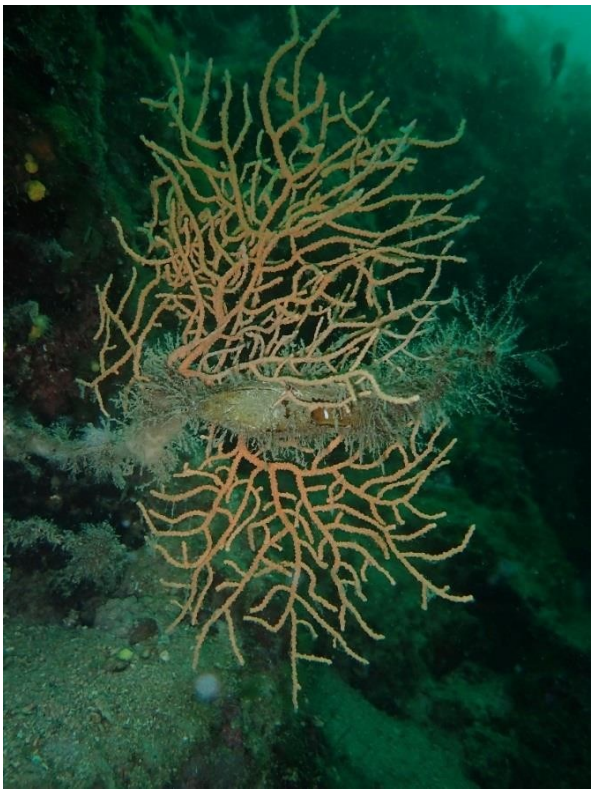
Smeđa alga, pripada redu *Fucales*. Obitava u umjerenim područjima sjeverne hemisfere (Mediteran, Indijski i Pacifički ocean). Alge ove vrste pripadaju najdominantnijim i ekološki najvažnijim vrstama na Sredozemnom i Jadranskom moru (čak 56 vrsta) koje postepeno nestaju zbog uništavanja staništa, eutrofikacije i prekomjerne ispaše. Ove alge uslijed prilagodbe ekološkim uvjetima mogu razviti morfološke varijacije što otežava razlikovanje od druge vrste alge. (Rožić i sur., 2012). Rastu pričvršćene za čvrstu podlogu (stjenovita područja) u obliku grma ili kao nepričvršćeni oblici na muljevitom i pjeskovitom dnu (zastitamora.net). Proizvodi oksidirani sterol katastaron koji može djelovati kao fitoekdisteroid, tj. zaštitni agens (Stengel i Connan (Eds.), 2015).



Slika 18 *Cystoseira compressa* - 04/2018, Zadar Kolovare I, geografska širina: 44° 06′ 26″, geografska dužina: 15° 13′ 54″

2.3.4. Eunicella cavolinii

Kolonijalni koralj, poznat i pod nazivima žuta/bradavičasta rožnjača. Stablo je rožnato, sa sluzavom ovojnicom žuto-narančaste boje (nije proizvod sklerita već živućeg tkiva). Može narasti do 50 cm. Hrani se zooplanktonima. Na pojedinim područjima (kamenim zidovima) polipi grade kolonije koje mogu stvoriti gusta naselja. Najčešće nastanjuje vertikalne stijene na 10-150 m dubine u Jadranskom i Sredozemnom moru (DORIS). Prema nekima od do sada urađenih istraživanja, izolirani 9-β-D-arabinosiladenin (araA) i njegov 3'-O-acetilni derivat imaju snažno antivirusno djelovanje (Cimino i sur., 1984) a 5α i 8α-epidioksisteroli i 9,11-sekosteroli su pokazali inhibitorni učinak na rast MCF-7 stanica karcinoma dojke i LNCaP stanica karcinoma prostate (Ioannou i sur., 2009).



Slika 19 *Eucinella cavolinii* - 04/2018, Ljubačka vrata (Rtina), geografska širina: 44° 19′ 14″, geografska dužina: 15° 55′ 42″

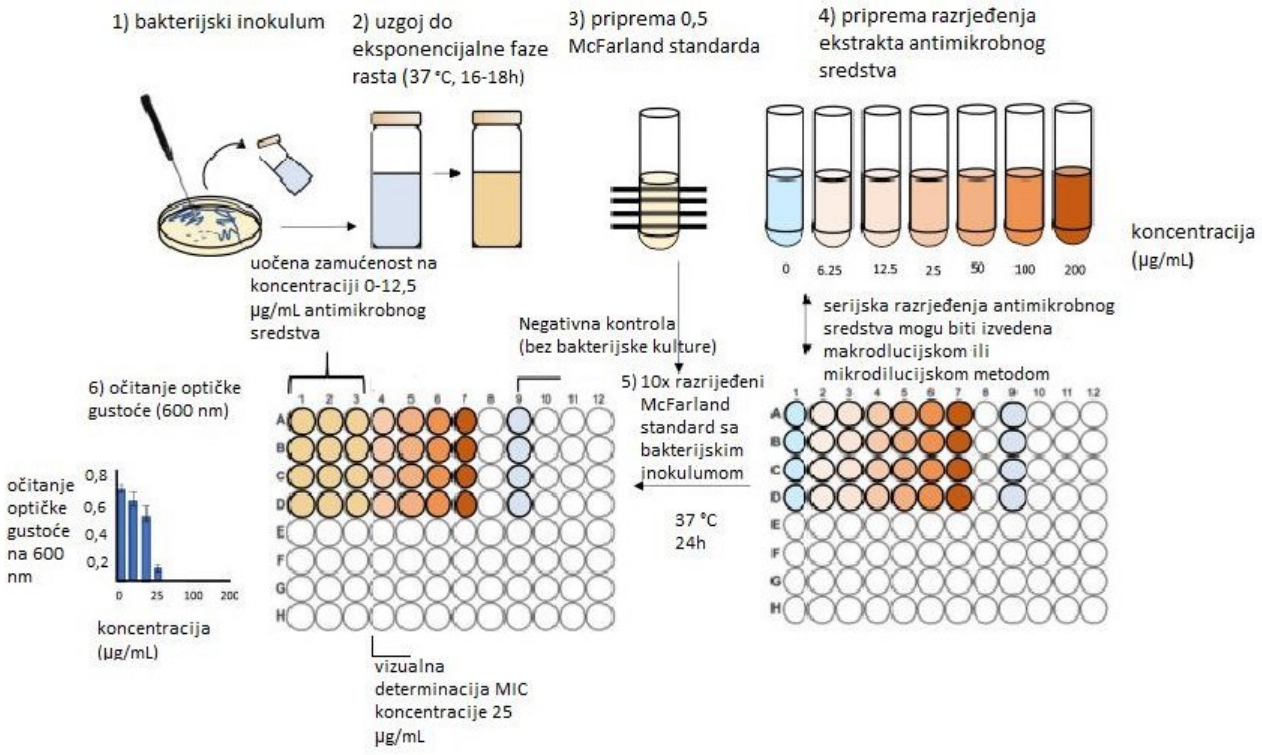
Potreba za novim antifungalnim sredstvima (koja su ujedno i prirodan proizvod) nužna je ne samo zbog povećanja gljivičnih infekcija već i zbog razvijene otpornosti na antifungalne tvari.

Procjena antimikrobne aktivnosti ekstrakata dobivenih iz algi ključna je za identifikaciju vrsta koje bi mogle poslužiti u proizvodnji novih antibiotika ili fungicida. Pri tome se koriste različite metode od kojih je najpopularnija starija kvalitativna disk-difuzijska metoda prikazana na **Slici 3** - na inokuliranoj krutoj hranjivoj podlozi postavi se filter papir natopljen određenom količinom potencijalnog antibiotika. Nakon inkubacije, mjeri se promjer zone inhibicije rasta mikroorganizma (Duraković i Duraković 2000; Leksikografski zavod Miroslav Krleža).



Slika 20 Disk-difuzijska metoda koja se primjenjuje za procjenu antimikrobne aktivnosti (Bedenić, 2005)

Mikrometoda koja se koristi za procjenu minimalne koncentracije inhibitora (eng. minimal inhibitory concentration - MIC) i minimalne smrtonosne koncentracije (eng. minimal lethal concentration MLC) predstavlja semikvantitativnu, djelotvornu i jeftinu metodu za procjenu antifungalne aktivnosti ekstrakata. Osim inhibitornog učinka, dodaci u podlogama mogu uzrokovati i poboljšan rast, te se u tom slučaju procjenjuje minimalna inducirajuća koncentracija (eng. growth inducing concentration – GIC) (Jerković i sur., 2019).



Slika 21 Primjer procjene antimikrobne aktivnosti mikrometodom (Cotton i sur., 2018)



Slika 22 Primjer mikrotitarske pločice za mikrometodu s inokulumom plijesni *Aspergillus flavus* i razrijeđenim ekstraktima morskih organizama – zamućenje u pojedinim jažicama mikrotitarske pločice ukazuje na potencijalan rast plijesni (vlastita fotografija)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj diplomskog rada je odrediti antifungalni učinak ekstrakata morskih organizama, plaštenjaka *Aplydium conicum*, zelene makroalge *Codium bursa*, smeđe makroalge *Cystoseira compressa* te koralja *Eunicella cavolinii*. Ekstrakti pripremljeni u vodi i dimetilsulfoksidu te su ispitani odvojeno kako bi se usporedilo njihovo djelovanje. Antifungalno ispitivanje je provedeno na najznačajnijim mikotoksikogenim plijesnima: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraces*, *Fusarium gramniearum*, *Fusarium verticillioides*, te *Penicillium expansum* standardiziranom mikrodilucijskom metodom prema CLSI M38-A vodiču.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Priprema ekstrakata:

Ekstrakti algi dobiveni su ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (na ultrazvučnoj kupelji sa destiliranom vodom, s radnom frekvencijom od 37 Hz i snagom od 50 W). Korištena su dva otapala – voda (za polarne komponente) i dimetil sulfoksid (za nepolarne komponente). Svi uzorci su pripremljeni u omjeru 10mL/g, osim uzorka alge *Codium bursa* koja je pripremljena u omjeru 20mL/g. Temperatura i vrijeme u oba slučaja su bili konstantni (30 °C i 30 min). Ekstrakti su filtrirani i čuvani na temperaturi 4 °C do analize.

Izvori primjenjenih ekstrakata algi:

Codium bursa - 04/2018, otok Iški Mrtenjak; geografska širina: 44° 00′ 36″, geografska dužina: 15° 10′ 36″

Eunicella cavolinii - 04/2018, Ljubačka vrata (Rtina); geografska širina: 44° 19′ 14″, geografska dužina: 15° 55′42″

Cystoseira compressa - 04/2018, Zadar Kolovare I; geografska širina: 44° 06′ 26″, geografska dužina: 15° 13′54″

Aplydium conicum - 04/2018, Zadar Kolovare II; geografska širina: 44° 07′ 00″, geografska dužina: 15° 14′00″

3.2.2. Priprema spora plijesni

Plijesni *A. alternata*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, te *P. expansum* su nacijepljene na PDA agar (potato dextrose agar) radi sporulacije i uzgajane tijekom 7 dana u mraku na 25 °C.

Plijesni *F. graminearum* te *F. verticillioides* su nacijepljene na MBA agar (mung bean agar) radi sporulacije i uzgajane tijekom 7 dana u mraku na 25 °C.

Nakon 7 dana spore pojedinih plijesni su sastrugane sa kosih agara u fiziološku otopinu, prebrojene su pomoću Bürker-Türk komore te je njihova koncentracija podešena na 10^6 spora/mL.

3.2.3. Antifungalna analiza

U mikobiološkom laminaru pripremljena je RPMI-1640 podloga prema uputama proizvođača. Nakon otapanja podloge dodan je pufer MOPS (0,164 mol/L) i podešen pH na 7,0 pomoću 1M NaOH. Podloga je sterilizirana u laminaru pomoću 0,22 mikrometarskog filtera u sterilne prazne boce, budući da zbog termolabilnih komponenti podloge, sterilizacija povišenom temperaturom nije primjenjiva.

Za nacjepljivanje smo koristili sterilne mikrotitarske pločice, a plan nacijepljivanja je bio sukladan uputama M38-A s modifikacijama koje su opisali Šarkanj i sur (2013).

Nakon nacjepljivanja, mikrotitarske pločice inkubirane su na 35 °C tijekom 72 h. Praćenje razlike rasta očitalo se na spektrofotometru (Azure Ao Absorbance microplate reader, Azure biosystems, Dublin CA, USA) na 405 i 450 nm. Dobiveni rezultati su obrađeni u računalnom programu Microsoft®Office Excel 2016.

Minimalna inhibitorna koncentracija za 50 % stanica (MIC_{50}) je definirana kao najniža koncentracija ekstrakta kod koje je došlo do barem 50 % redukcije optičke gustoće u odnosu na kontrolni rast. Osim inhibicije rezultata u ovom istraživanju utvrđen je i porast rezultata i stoga je izračunata i GIC_{50} vrijednost koja se definira kao koncentracija ispitivanog ekstrakta kod kojeg je došlo do barem 50 % povišenja optičke gustoće u odnosu na kontrolu.

4. REZULTATI RASPRAVA

4.1. ANTIFUNGALNA AKTIVNOST

Antifungalna aktivnost ekstrakata određena je kod najproblematičnijih i najčešćih vrsta plijesni. Dobiveni rezultati su dani u **Tablici 1**. Među ekstraktima je vidljiva razlika u antifungalnom učinku. Zanimljivo je primjetiti kako DMSO ekstrakti plaštenjaka *Aplidium conicum* i smeđe alge *Cystoseira compressa* nisu imali inhibitorni učinak na neku od navedenih plijesni. Na plijesni roda *Fusarium* DMSO ekstrakti nisu imali inhibitorni učinak no antifungalno djelovanje pokazali su vodeni ekstrakti zelene alge *Codium bursa* i smeđe alge *Cystoseira compressa*, pri visokim koncentracijama. Na plijesni roda *Aspergillus* su ekstrakti svih morskih organizama imali inhibitorno djelovanje, od kojih su se za inhibiciju *A. ochraceus* najboljima pokazali vodeni ekstrakti alge *Codium bursa*, DMSO ekstrakt koralja *Eunicella cavolinii* te vodeni ekstrakti alge *Cystoseira compressa* i plaštenjaka *Aplidium conicum* dok je za *Aspergillus flavus* izvrstan učinak već pri koncentraciji od 5 µg/mL pokazao vodeni ekstrakt alge *Cystoseira compressa*, zatim koralja *Eucinella cavolinii* i plaštenjaka *Aplidium conicum* te DMSO ekstrakt alge *Codium bursa*. *Alternaria alternata* je pokazala najveću osjetljivost na DMSO ekstrakte koralja *Eucinella* pri niskim koncentracijama te vodeni ekstrakt alge *Codium bursa* a *Penicillium expansum* na DMSO ekstrakt alge *Codium bursa* te vodeni ekstrakt plaštenjaka *Aplidium conicum*. Ukoliko obratimo pozornost na ekstrakte morskih organizama, najbolju i najučinkovitiju inhibiciju su pokazali ekstrakti alge *Codium bursa*, koja je jedina imala antifungalan učinak za svaku od navedenih plijesni.

Tablica 1 Minimalna inhibitorna koncentracija koja je reducirala rast barem 50 % plijesni (MIC_{50})

Microorganism	*Aplidium conicum*		*Codium bursa*		*Cystoseira compressa*		*Eucinella cavolinii*	
	DMSO	H_2O	DMSO	H_2O	DMSO	H_2O	DMSO	H_2O
Alternaria alternata	-	-	500	500	-	50	5	-
Aspergillus flavus	-	50	5000	-	-	5	-	50
Aspergillus ochraceus	-	5000	-	500	-	5000	500	-
Fusarium graminearum	-	-	-	5000	-	5000	-	-
Fusarium verticilloides	-	-	-	500	-	-	-	-
Penicillium expansum	-	500	50	-	-	-	-	-

Vrijednosti u tablici su izražene u µg/mL, oznaka "–" označava da nije zabilježena značajna

promjena u odnosu na kontrolu.

Osim antifungalne aktivnosti, određene su i koncentracije ekstrakata koje su uzrokovale rast pojedinih vrsta plijesni. Svaki ekstrakt utjecao je na rast nekoliko vrsta plijesni, osim na rod *Fusarium* na koji nije bilo utjecaja. Na rast plijesni *Aspergillus flavus* utjecalo je čak 4 vrste ekstrakata već pri koncentraciji od 5 µg/mL – ekstrakti alge *Codium bursa* i DMSO ekstrakti *Cystoseira compressa* i *Eucinella cavolinii.* Upravo ti ekstrakti nisu pokazali/pokazali su minimalan inhibitorni učinak na navedenu plijesan (***Tablica 1***).

Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem koje su na algi *Codium bursa* proveli Jerković i sur. (2018).

Tablica 2 Koncentracija koja je inducirala rast barem 50 % plijesni (GIC_{50})

Microorganism	*Aplidium conicum*		*Codium bursa*		*Cystoseira compressa*		*Eucinella cavolinii*	
	DMSO	H_2O	DMSO	H_2O	DMSO	H_2O	DMSO	H_2O
Alternaria alternata	**5000**	**5-5000**	**-**	**-**	**5000**	**5**	**500, 5000**	**-**
Aspergillus flavus	**5000**	**-**	**5, 50**	**5**	**5, 5000**	**-**	**5-5000**	**500, 5000**
Aspergillus ochraceus	**50-5000**	**-**	**5000**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Fusarium graminearum	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Fusarium verticilloides	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Penicillium expansum	**5-5000**	**5000**	**-**	**5000, 500**	**5-5000**	**500, 5000**	**5000**	**500, 5000**

Vrijednosti u tablici su izražene u µg/mL, oznaka "–" označava da nije zabilježena značajna promjena u odnosu na kontrolu.

5. ZAKLJUČCI

Prema dobivenim rezultatima, uočeno je da su ekstrakti svih morskih organizama imali inhibitorni učinak na pojedine vrste plijesni u određenim koncentracijama.

Izvrsne učinke inhibicije (MIC_{50} = 5 µg/mL), pokazao je vodeni ekstrakt smeđe alge *Cystoseira compressa* za plijesan *Aspergilus flavus* te DMSO ekstrakt koralja *Eucinella cavolinii* za plijesan *Alternaria alternata*.

Najbolje antifungalno djelovanje pokazali su ekstrakti zelene alge *Codium bursa* koji su inhibirali sve primjenjene vrste plijesni.

Istražen je i utjecaj ekstrakata na rast plijesni gdje je uočeno da su na rast plijesni *Aspergillus flavus* poticajan učinak imala 4 ekstrakata već pri koncentraciji od 5 µg/mL – ekstrakti alge *C. bursa* i DMSO ekstrakti alge *C. compressa* i koralja *E. cavolinii*.

Kao krajnji zaključak, može se reći da morski organizmi imaju biološki aktivne spojeve koji pokazuju antifungalni učinak te su stoga organizmi od velikog interesa za buduća ispitivanja.

6. LITERATURA

1. Aiello A, Borrelli F, Capasso R, Fattorusso E, Luciano P, Menna M: Conicamin, a Novel Histamine Antagonist from the Mediterranean Tunicate Aplidium conicum. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13:4481–4483, 2003.

2. Aiello A, Esposito G, Fattorusso E, Iuvone T, Luciano P, Menna M: Aplidiasterols A and B, two new cytotoxic 9,11-secosterols from the mediterranean ascidian Aplidium conicum. *Steroids* 68:719–723, 2003.

3. Aiello A, Fattorusso E, Luciano P, Mangon, A, Menna M: Isolation and Structure Determination of Aplidinones A-C from the Mediterranean AscidianAplidium conicum: A Successful Regiochemistry Assignment by Quantum Mechanical13C NMR Chemical Shift Calculations. *European Journal of Organic Chemistry* 23:5024–5030, 2005.

4. Aiello A, Fattorusso E, Luciano P, Macho A, Menna M, Munoz E: Antitumor Effects of Two Novel Naturally Occurring Terpene Quinones Isolated from the Mediterranean Ascidian Aplidium conicum. *Journal of Medicinal Chemistry* 48:3410-3416, 2005.

5. Amaike S, Keller NP: Aspergillus flavus. *Annual Review of Phytopathology* 49(1):107–133, 2011.

6. Bedenić B: Antibakterijski lijekovi. U: Uzunović-Kamberović, S. (ur.) *Medicinska mikrobiologija,* str 221-252. Štamparija Fojnica d.o.o., Zenica, 2009.

7. Bertanha C, Januário A, Alvarenga T, Pimenta L, Silva M, Cunha W, Pauletti P: Quinone and Hydroquinone Metabolites from the Ascidians of the Genus Aplidium. *Marine Drugs* 12(6):3608–3633, 2014.

8. Bui-Klimke TR, Wu F: Ochratoxin A and human health risk: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(13):1860-9, 2015.

9. Burge HA: Fungus allergens, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 3:19-329, 1985.

10. Bushnell WR, Leonard KJ: *Fusarium head blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, Minnesota, 2003.

11. Cimino G, De Rosa S, De Stefano S: Antiviral agents from a gorgonian,Eunicella cavolini. *Experientia* 40(4):339–340, 1984.

12. Cotton GC, Lagesse NR, Parke L, Meledandri CJ: Antibacterial Nanoparticles. *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology (Second Edition)*, 3:65-82, 2019.

13. DORIS, Données d'Observations pour la Reconnaissance et l'Identification de la faune et la flore Subaquatiques https://doris.ffessm.**fr** [24.08.2019].

14. Duraković S, Duraković L: *Mikologija u biotehnologiji*. Kugler, Zagreb, 2003.

15. Errampalli D: *Penicillium expansum* (Blue Mold). *Postharvest Decay,* 189–231, Agriculture and Agri-Food Canada, Ontario, 2014.

16. Espinoza-Verduzco M de LA, Santos-Cervantes ME, Fernández-Herrera E, Espinoza-Mancillas MG, Chávez-Medina JA, Bermúdez-Álvarez EM, … Leyva-López NE: First report ofAlternaria alternata (Fr.) Keissler causing inflorescence blight inJatropha curcasin Sinaloa, Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 34(3):455–458, 2012.

17. Gabriel MF, Postigo I, Tomaz CT, Martínez J: *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environment International* 89-90, 71–80, 2016.

18. Gamaletsou MN, Rammaert B, Bueno MA, Sipsas NV, Moriyama B, Kontoyiannis DP, Roilides E, Zeller V, Taj-Aldeen SJ, Henry M, Petraitis V, Denning DW, Lortholary O, Walsh TJ: *International Osteoarticular Mycoses Consortium: Aspergillus arthritis: analysis of clinical manifestations, diagnosis, and treatment of 31 reported cases. Medical Mycology* 55(3):246- 254, 2017.

19. Global online database of information about marine life https://www.sealifebase.ca/ [25.08.2019].

20. HAH, Hrvatska agencija za hranu: *Što su mikotoksini*. HAH, 2013. https://www.hah.hr/sto-su- mikotoksini/ [25.08.2019].

21. Howard DH: Pathogenic Fungi in Humans and Animals. *Marcel Dekker*, New York. pp 294- 295, 2003.

22. INSPQ, Centre d'expertise et de référence en santé publique: *Penicillium spp.* 2016. https://www.inspq.qc.ca [24.08.2019].

23. Ioannou E, Abdel-Razik AF, Zervou M, Christofidis D, Alexi X, Vagias C, … Roussis V: 5α,8α-Epidioxysterols from the gorgonian Eunicella cavolini and the ascidian Trididemnum inarmatum: Isolation and evaluation of their antiproliferative activity. *Steroids* 74(1):73–80, 2009.

24. Ioannou E, Abdel-Razik AF, Alexi X., Vagias C., Alexis MN, Roussis V: 9,11-Secosterols with antiproliferative activity from the gorgonian Eunicella cavolini. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17(13):4537–4541, 2009.

25. Jacob MR, Walker LA: Natural products and antifngal drug discovery*. Methods in molecular medicine* vol.118:83-109 Antifungal agents: Methods and Protocols. Humana Press Inc., New Jersey, 2005.

26. Jerković I, Kranjac M, Marijanović Z, Šarkanj B, Cikoš A-M, Aladić K, Pedisić S, Jokić S: Chemical Diversity of Codium bursa (Olivi) C. Agardh Headspace Compounds, Volatiles, Fatty Acids and Insight into Its Antifungal Activity. *Molecules* 24(5):842, 2019.

27. *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, 2010.

28. Klapec T, Šarkanj B, Marček T: *Opasnosti vezane uz hranu*. PTF, Osijek, 2017.

29. Kovač M, Šubarić D, Bulaić M, Kovač T, Šarkanj B: Yesterday masked, today modified; what do mycotoxins bring next? *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 69:196-214, 2018.

30. Larous L, Handel N, Abood JK, Ghoul M: *The growth and production of patulin mycotoxin by Penicillium expansum on apple fruits and its control by the use of propionic acid and sodium benzoate.* Department of Biology, College of Science, University of Setiff. Setiff, Algeria, 2007.

31. Lee HB, Patriarca A, Magan N: Alternaria in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. *Mycobiology* 43(2):93-106, 2015.

32. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža,2020. http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2972 [23.08.2019].

33. Lopes G, Andrade PB, Valentão P: Screening of a Marine Algal Extract for Antifungal Activities. *Natural products from marine algae:methods and protocols*. Humana Press Inc., New York, 2015.

34. MD Guiry: *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org; [28.08 2019].

35. Menna M, Aiello A, D'Aniello F, Imperatore C, Luciano P, Vitalone R, … Santamaria R: Conithiaquinones A and B, Tetracyclic Cytotoxic Meroterpenes from the Mediterranean AscidianAplidium conicum. *European Journal of Organic Chemistry* (16):3241–3246, 2013.

36. Munkvold GP: *Fusarium* Species and Their Associated Mycotoxins. *Mycotoxigenic Fungi*, 51– 106, 2016.

37. Munkvold GP: Fusarium Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods in Molecular Biology* 1542:51-106, 2017.

38. Ožegović L, Pepeljnjak S: *Mikotoksikoze*. Školska knjiga, Zagreb, 1995.

39. Pancaldi D, Tonti S, Prodi A, Salomoni D, Dal Prà M, Nipoti P, Alberti I, Pisi A: *Phytopathologia Mediterranea* Vol. 49, No. 2, pp. 258-266, 2010.

40. Patriarca A, Vaamonde G, Pinto VE: Alternaria. *Batt CA, Tortorello ML (eds) Encyclopedia of food microbiology*, vol 1. Academic Press, Elsevier, London, pp 54–60, 2014.

41. Pinto VE, Patriarca A: Alternaria Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods in Molecular Biology* 1542:13-32, 2017.

42. Pitt JI, Hocking AD: Aspergillus and Related Teleomorphs. *Fungi and Food Spoilage*. Springer, Boston, MA, pp 470-471, 2009.

43. Plascencia-Jatomea M, Susana M, Gómez Y, Velez-Haro JM: *Aspergillus spp*. (Black Mold). *Postharvest Decay*, 267–286, Agriculture and Agri-Food Canada, Ontario, 2014.

44. Pleadin J, Vasilj V, Petrović D: *Mikotoksini: pojavnost, prevencija i redukcija*. Sveučilište u Mostaru, Mostar, 2018.

45. Stengel DB, Connan S: *Natural products from marine algae, methods and protocols*.

Humana Press Inc., New York, 2015.

46. Subbiah V: Antifungal Agents*. Methods and Protocols Edited by E. J. Ernst and P. D. Rogers.* (University of Iowa and University of Tennessee, respectively). Humana Press, Totowa, NJ. 2005. *Journal of Natural Products* 68(11):1713–1713, 2005.

47. Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klapec T: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. HAH, Osijek, 2010.

48. Šarkanj B: "Utjecaj inhibitora glutation S – transferaze na produkciju aflatoksina plijesni Aspergillus flavus." Disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2014.

49. Tannous J, Atoui A, El Khoury A, Francis Z., Oswald I P, Puel O, & Lteif R: A study on the physicochemical parameters for Penicillium expansum growth and patulin production: effect of temperature, pH, and water activity. *Food Science & Nutrition* 4(4):611–622, 2015.

50. Troncoso-Rojas R, Tiznado-Hernández ME: *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot). *Postharvest Decay*, 147–187, Agriculture and Agri-Food Canada, Ontario, 2014.

51. Visagie CM, Varga J, Houbraken J, Meijer M, Kocsubé S, Yilmaz N, … Samson R A: Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (Aspergillus section Circumdati). *Studies in Mycology* 78:1–61, 2014.

52. Waśkiewicz A, Goliński P: Mycotoxins in foods, feeds and their components. *Krmiva* 55:35- 45, 2013.

53. Zorčec A-M, Pejić S, Velić N, Mastanjević K, Krstanović V, Šarkanj B: Određivanje mikotoksina u pivu vezanim sustavom tekućinska kromatografija-tandemska masena spektrometrija (LC-MS/MS). *Proceedings & abstract of the 11th International Scientific/Professional Conference Agriculture in Nature and Environment Protection*, str. 189-193. Glas Slavonije d.d., Osijek, 2018.