

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marko BLAŽIČ

**VPLIV RASTLINSKIH EKSTRAKTOV NA PRODUKCIJO
MIKOTOKSINOV PRI NITASTIH GLIVAH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINING EFFECT OF DIFFERENT PLANT EXTRACTS ON
MYCOTOXIN PRODUCTION BY FILAMENTOUS FUNGI**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorja dr. Jana Mavrija in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentor: dr. Jan Mavri

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor NEKREP
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Jan MAVRI
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marko BLAŽIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.222+615.915(043)=163.6
KG mikotoksini/nitaste glive/ *Aspergillus flavus*/*Aspergillus westerdijkiae*/rastlinski ekstrakti
AV BLAŽIČ, Marko
SA RASPOR, Peter (mentor)/ MAVRI, Jan (somentor)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2008
IN VPLIV RASTLINSKIH EKSTRAKTOV NA PRODUKCIJO MIKOTOKSINOV PRI NITASTIH GLIVAH
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XII, 47 str., 5 pregl., 19 sl., 6 pril., 75 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Namen naloge je bil določiti vpliv treh različnih rastlinskih ekstraktov (rastlinski izvleček A, rastlinski izvleček B in rastlinski izvleček C) na produkcijo mikotoksinov pri *Aspergillus flavus* (ZIM F070) in *Aspergillus westerdijkiae* (ZIM F068). Oba organizma producirata mikotoksine ter se pogosto nahajata v hrani in krmi. *Aspergillus flavus* producira mikotoksina aflatoksin B1 in aflatoksin B2, ki sta dokazano karcinogeni spojini. *Aspergillus westerdijkiae* producira ohratoksin A in ohratoksin B, ki prav tako veljata za toksični spojini. V prvem delu poskusa smo ugotavljali vpliv rastlinskih ekstraktov na rast plesni. Organizma smo kultivirali v centrifugirkah (13 dni pri 28 °C), kamor smo dodali tekoče gojišče z rastlinskimi ekstrakti. Po končani kultivaciji smo odlili izrabljeno gojišče in micelij sušili. Stehtali smo tako pridobljeno suho biomaso. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da rastlinski ekstrakti pri testiranih koncentracijah ne zavirajo rasti *A. flavus* in *A. westerdijkiae*. V drugem delu poskusa smo določali koncentracijo aflatoksina B1 pri *A. flavus* in koncentracijo ohratoksina A pri *A. westerdijkiae*. Plesni smo gojili na trdnem gojišču, kateremu smo dodali rastlinske ekstrakte. Koncentracijo mikotoksinov v gojišču smo po 13 dneh kultivacije določali s pomočjo encimsko imunskega testa (ELISA). Ugotovili smo, da sta rastlinska izvlečka A in C inhibitorno vplivala na produkcijo mikotoksinov pri testiranih organizmih. Rastlinski izvleček B je inhibiral sintezo ohratoksina A pri glivi *A. westerdijkiae*, pri glivi *A. flavus* pa je presenetljivo povečal koncentracijo aflatoksina B1.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 579.222+615.915(043)=163.6
CX mycotoxins/ filamentous fungi/ *Aspergillus flavus*/*Aspergillus westerdijkiae*/plant extracts
AU BLAŽIČ, Marko
AA RASPOR, Peter (supervisor)/ MAVRI, Jan (co-advisor)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (rewiever)
PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI DETERMINING EFFECT OF DIFFERENT PLANT EXTRACTS ON MYCOTOXIN PRODUCTION BY FILAMENTOUS FUNGI
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO XII, 47 p., 5 tab., 19 fig., 6 ann., 75 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB The purpose of the research project is to determine and establish the influence of plant extracts (plant extract A, plant extract B and plant extract C) on production of mycotoxins in fungi *Aspergillus flavus* (ZIM F070) and *Aspergillus westerdijkiae* (ZIM F068). They are both mycotoxin producing moulds, often present in contaminated food and animal feed. *Aspergillus flavus* produces mycotoxins aflatoxin B1 and aflatoxin B2, which are proved to be cancerous substances. *Aspergillus westerdijkiae* produces ochratoxin A and B, which are toxic compounds as well. In the first part of experiment we determined the influence of plant extracts on fungal growth. Both types of filamentous fungi were cultivated in tubes (for 13 days at 28 °C) to which we added selected culture medium with proper concentration of plant extract. After 13 days the culture medium was poured away and dried. Dry biomass of the mycelium was then weighed. Based on results we found out that plant extracts at tested concentrations do not inhibit fungal growth. In the second part of experiment we determined the concentration of aflatoxin B1 in *A. flavus* and the concentration of ochratoxin A in *A. westerdijkiae*. The moulds were cultivated on solid medium (for 13 days at 28 °C) to which we added selected culture medium with proper concentration of plant extract. Concentrations of mycotoxins were measured after 13 days by the Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). Based on results we found out that plant extracts A and C have inhibitory effect on mycotoxin production on tested fungi. Plant extract B has also inhibitory effect on production of ochratoxin A by *A. westerdijkiae*, but surprisingly increased the synthesis of aflatoxin B1 by *A. flavus*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKOVANJA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKOTOKSINI	3
2.1.1 Aflatoksini	4
2.1.2 Ohratoksini	7
2.2 ANALITIKA – METODE DETEKCIJE MIKOTOKSINOV	10
2.2.1 HPLC	10
2.2.2 Encimsko-immunska metoda (ELISA).....	11
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 METODE	13
3.1.1 Namnoževanje plesni.....	13
3.1.2 Priprava inokuluma	13
3.1.3 Submerzna kultivacija	14
3.1.4 Merjenje suhe biomase.....	14
3.1.5 Kultivacija na površini agarja v petrijevih ploščah	15
3.1.6 Merjenje koncentracije mikotoksinov	16
3.1.7 Statistična obdelava podatkov	18
3.2 MATERIALI	20
3.2.1 Mikroorganizmi	20
3.2.2 Gojišča	21
3.2.3 Reagenti, raztopine.....	22
3.2.4 Pribor in oprema	23
4 REZULTATI	25
4.1 SUHA BIOMASA GLIVE.....	25
4.1.1 Suha biomasa glive <i>Aspergillus westerdijkiae</i> na gojišču YES	25
4.1.2 Suha biomasa glive <i>Aspergillus westerdijkiae</i> na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka A	26
4.1.3 Suha biomasa glive <i>Aspergillus westerdijkiae</i> na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka B	26
4.1.4 Suha biomasa glive <i>Aspergillus westerdijkiae</i> na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka C	27
4.1.5 Suha biomasa glive <i>Aspergillus flavus</i> na gojišču CY.....	28

4.1.6	Suha biomasa glive <i>Aspergillus flavus</i> na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka A.....	29
4.1.7	Suha biomasa glive <i>Aspergillus flavus</i> na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka B.....	29
4.1.8	Suha biomasa glive <i>Aspergillus flavus</i> na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka C.....	30
4.2	DOLOČITEV KONCENTRACIJE MIKOTOKSINOV	31
4.2.1	Koncentracija ohratoksina A v gojišču YES z dodatkom rastlinskega izvlečka A	31
4.2.2	Koncentracija ohratoksina A v gojišču YES z dodatkom rastlinskega izvlečka B.....	32
4.2.3	Koncentracija ohratoksina A v gojišču YES z dodatkom rastlinskega izvlečka C	32
4.2.4	Koncentracija aflatoksina v gojišču CYA z dodatkom rastlinskega izvlečka A	33
4.2.5	Koncentracija aflatoksina v gojišču CYA z dodatkom rastlinskega izvlečka B.....	33
4.2.6	Koncentracija aflatoksina v gojišču CYA z dodatkom rastlinskega izvlečka C	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	35
5.1	RAZPRAVA	36
5.1.1	Določanje suhe biomase	36
5.1.2	Določanje koncentracije mikotoksinov.....	37
5.2	SKLEPI	39
6	POVZETEK.....	40
7	VIRI	41

**ZAHVALA
PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Sestava trdnega gojišča MEA	21
Preglednica 2. Sestava tekočega gojišča YES.....	21
Preglednica 3. Sestava tekočega gojišča CY.....	22
Preglednica 4. Sestava fiziološke raztopine	22
Preglednica 5. Sestava raztopine saharoze	23

KAZALO SLIK

Slika 1. Strukturna formula aflatoksina B1 in B2 (Tarin in sod., 2004)	5
Slika 2. Shema metabolizma aflatoksina B1 (Coulombe, 1993)	7
Slika 3. Strukturna formula ohratoksina A (Tarin in sod., 2004)	8
Slika 4. Shema poteka dela	12
Slika 5. Shematski prikaz Bürker-Türkove števnice (Bürker-Türk, 2008)	13
Slika 6. Prirast suhe biomase <i>Aspergillus westerdijkiae</i> na gojišču YES v odvisnosti od časa kultivacije brez dodanega rastlinskega ekstrakta ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi).....	25
Slika 7. Suha biomasa <i>Aspergillus westerdijkiae</i> na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka A po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi)	26
Slika 8. Suha biomasa <i>Aspergillus westerdijkiae</i> na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka B po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi)	26
Slika 9. Suha biomasa <i>Aspergillus westerdijkiae</i> na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka C po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi)	27
Slika 10. Prirast suhe biomase <i>Aspergillus flavus</i> na gojišču CY v odvisnosti od časa kultivacije brez dodanega rastlinskega ekstrakta ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi)	28
Slika 11. Suha biomasa <i>Aspergillus flavus</i> na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka A po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi).....	29
Slika 12. Suha biomasa <i>Aspergillus flavus</i> na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka B po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi)	29
Slika 13. Suha biomasa <i>Aspergillus flavus</i> na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka C po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi)	30
Slika 14. Koncentracija ohratoksina A po 13 dneh kultivacije plesni <i>Aspergillus westerdijkiae</i> v gojišču YES in YES z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka A ($T = 28$ °C, v temi)	31
Slika 15. Koncentracija ohratoksina A po 13 dneh kultivacije plesni <i>Aspergillus westerdijkiae</i> v gojišču YES in YES z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka B ($T = 28$ °C, v temi)	32

Slika 16. Koncentracija ohratoksina A po 13 dneh kultivacije plesni *Aspergillus westerdijkiae* v gojišču YES in YES z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka C (T = 28 °C, v temi)32

Slika 17. Koncentracija aflatoksina po 13 dneh kultivacije plesni *Aspergillus flavus* v gojišču CYA in CYA z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka A (T = 28 °C, v temi)33

Slika 18. Koncentracija aflatoksina po 13 dneh kultivacije plesni *Aspergillus flavus* v gojišču CYA in CYA z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka B (T = 28 °C, v temi)33

Slika 19. Koncentracija aflatoksina po 13 dneh kultivacije plesni *Aspergillus flavus* v gojišču CYA in CYA z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka C (T = 28 °C, v temi)34

KAZALO PRILOG

Priloga A1. Povprečna vrednost suhe biomase v odvisnosti od časa kultivacije nitaste glive *Aspergillus westerdijkiae* (gojišče YES, T = 28 °C)

Priloga A2. Povprečna vrednost suhe biomase nitaste glive *Aspergillus westerdijkiae* v odvisnosti od koncentracije rastlinskega ekstrakta v gojišču (gojišče YES, T = 28 °C, t = 13 dni)

Priloga A3. Povprečna vrednost koncentracije ohratoksina A v odvisnosti od koncentracije rastlinskega ekstrakta v gojišču (gojišče YES, T = 28 °C, t = 13 dni)

Priloga B1. Povprečna vrednost suhe biomase v odvisnosti od časa kultivacije nitaste glive *Aspergillus flavus* (gojišče CY, T = 28 °C)

Priloga B2. Povprečna vrednost suhe biomase nitaste glive *Aspergillus flavus* v odvisnosti od koncentracije rastlinskega ekstrakta v gojišču (gojišče CY, T = 28 °C, t = 13 dni)

Priloga B3. Povprečna vrednost koncentracije aflatoksina v odvisnosti od koncentracije rastlinskega ekstrakta v gojišču (gojišče CYA, T = 28 °C, t = 13 dni)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
ATCC	American Type Culture Collection
<i>A. westerdijkiae</i>	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>
CY	gojišče (angl. Czapek yeast autolysate)
CYA	gojišče (angl. Czapek yeast autolysate agar)
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
ELISA	encimsko imunski test (angl. Enzyme-linked immunosorbent assay)
EU	Evropska unija
FAO	Organizacija združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (angl. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FLD	fluorescenčni detektor
GC	plinska kromatografija
HACCP	(angl. hazard analysis critical control point)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
KV	koeficient variiranja
LC-MS	tekočinska kromatografija z masno selektivnim detektorjem
M	mol/l
min	Minuta
NCBI	National Center for Biotechnology Information
obr./min	obrati na minuto
RIA	radioimunska analiza
RP	reverzna faza
SPR	površinska plazmonska resonanca
t	Čas
T	Temperatura
TLC	tankoslojna kromatografija
s	standardna deviacija
V	Volumen
V _D	delovni volumen
w	utežni odstotek
w/v	utežno volumski odstotek
YES	gojišče (angl. yeast extract-sucrose broth)
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

SLOVARČEK

Mikotoksini: so sekundarni metaboliti, ki jih tvorijo specifične vrste filamentoznih gliv. So toksične, karcinogene in alergene spojine za človeka in živali.

Aflatoksini: so mikotoksini plesni iz rodu *Aspergillus*, ki se pogosto nahajajo na rastlinskih substratih, kot so žitarice, fige, bučna in sončnična semena, razni oreščki, tobak in druga živila. Pri človeku in živalih lahko povzročijo raka na jetrih.

Ohratoksini: so skupina sekundarnih metabolitov toksikogenih plesni rodov *Aspergillus* in *Penicillium*. Na človeka in živali delujejo nefrotoksično in hepatotoksično.

1 UVOD

V zadnjem času smo med potrošniki živilske industrije priča povečanem povpraševanju po hrani brez umetnih konzervansov in po sveži hrani, ki bi bila minimalno tehnološko obdelana (Cowan, 1999). Negativna lastnost takšnih izdelkov je hitrejša in večja pokvarljivost, kar predstavlja veliko nevarnost za zdravje potrošnikov (Davidson in Harrison, 2002).

Plesni so ena izmed skupin kvarljivcev, ki so odgovorni za spreminjanje kakovosti, okusa in užitnosti hrane, zraven tega imajo nekatere vrste plesni sposobnost tvorjenja mikotoksinov. Mikotoksini so sekundarni metaboliti, ki jih tvorijo specifične vrste filamentoznih gliv. To so spojine, ki veljajo za zelo toksične, karcinogene in alergene, tako za človeka kot za živali (Soliman in Badaea, 2002). Prisotnost mikotoksina v surovinah živalske industrije in končnih produktih ima za posledico zdravstvene težave in veliko ekonomsko škodo (Sanchez in sod., 2005). Zaradi toksičnih lastnosti mikotoksinov je v številnih državah že predpisana zelo stroga zakonodaja glede maksimalne količine mikotoksinov v hrani in krmi.

Uporaba rastlinskih ekstraktov je v živilski industriji še posebej zanimiva, saj jih ima večina status GRAS (angl. Generally Recognized As Safe) in nam zato omogočajo bolj naraven pristop h konzerviranju živil. Rastline in rastlinski ekstrakti že imajo bogato zgodovino uporabe v zdravilstvu, prehrani, religiji in drugih namenih (Burt, 2004). S številnimi raziskavami ugotavljamo vedno več uporabnih lastnosti zelišč in drugih rastlin na področju živilske industrije, kozmetične industrije in tudi farmacije. Zato je namen novejših raziskav med drugim poiskati tudi takšne rastlinske ekstrakte, ki bi zavirali rast plesni in produkcijo mikotoksinov.

1.1 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj naloge je bil oceniti vpliv različnih rastlinskih ekstraktov (v besedilu rastlinski izvleček A, rastlinski izvleček B in rastlinski izvleček C) na rast in produkcijo mikotoksinov pri *Aspergillus flavus* – ZIM F070 in *Aspergillus westerdijkiae* – ZIM F068. Spremljali smo tudi časovni potek rasti biomase izbranih gliv.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

Hipoteza 1

Rastlinski ekstrakti pri nižjih koncentracijah ne vplivajo na rast nitastih gliv.

Hipoteza 2

Rastlinski ekstrakti pri nižjih koncentracijah vplivajo na produkcijo mikotoksinov pri nitastih glivah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKOTOKSINI

Beseda mikotoksin izvira iz kombinacije grške in latinske besede: myces (gr.) – gliva in toksikum (lat.) – strup. Mikotoksini so naravne nizkomolekularne organske spojine, ki so si strukturno zelo različne.

So sekundarni toksični metaboliti, ki jih sintetizirajo nitaste saprofitne glive. Mikotoksini so kemično heterogena skupina, kateri je skupno toksično delovanje na človeka in druge vretenčarje. V to skupino spada že več kot 300 spojin (Cole in Cox, 1981).

V skupino mikotoksinov pa ne spadajo nizkomolekularni sekundarni metaboliti, katerih toksičnost je v glavnem omejena na mikroorganizme (npr. penicilin, ki ga uvrščamo med antibiotike) ter spojine, ki so za človeka toksične zgolj v večjih koncentracijah (npr. etanol) (Bennett, 1987).

Bolezni, ki jih povzročajo mikotoksini, imenujemo mikotoksikoze. Do njih prihaja zaradi zaužitja hrane rastlinskega ali živalskega izvora, ki je bila kontaminirana s toksikogenimi plesnimi, oziroma natančneje, njihovimi izločki mikotoksini (Bennett in Klich, 2003).

Mikotoksikoze so poznane po celem svetu, npr. ergotizem v Evropi, alimentarna toksična aleukija v Rusiji, akutna aflatoksikoza v Jugovzhodni Aziji, humani primarni jetrni karcinom v JV Aziji in v Afriki. Okratoksin A naj bi bil vzrok tudi za balkansko endemično nefropatijo in kronični nefritis v severni Afriki (Northolt in sod., 1995; Van Egmond, 1995).

Mikotoksini vstopijo v organizem prvenstveno z uživanjem hrane, z vdihovanjem mikotoksikogenih spor plesni, mogoča pa je tudi dermalna pot njihovega vnosa, pri kateri mikotoksini v organizem preidejo skozi kožo, in sicer kot posledica fizičnega kontakta s plesnimi (Bennet in Klich, 2003).

Izpostavljenost organizma toksičnim mikotoksinom se kaže v akutnih in kroničnih obolenjih, odvisno od časa in pogostosti izpostavljenosti določenemu toksinu. Do akutne zastrupitve pride po časovno kratkotrajni (24 ur ali manj) izpostavljenosti smrtni dozi določenega toksina (Jeršek in sod., 2004). Takšne zastrupitve se lahko končajo tudi s smrtjo (Pitt, 2000). Pogostejši pa so kronični znaki zastrupitve, ki so posledica

izpostavljenosti organizma manjšim količinam mikotoksinov skozi daljše časovno obdobje (James, 1985).

Najpogostejši vir okužbe z mikotoksini so žitna zrna, bučna in sončnična semena, razni oreščki, sadeži citrusov in suho sadje. V večjih količinah se pojavlja v hrani okrog 20 mikotoksinov, ki so proizvod gliv iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps* in *Helminthosporium*. Ti toksini letno kontaminirajo približno 25 % vse svetovne hrane (Gilbert in Anklam, 2002; Coulombe 1993).

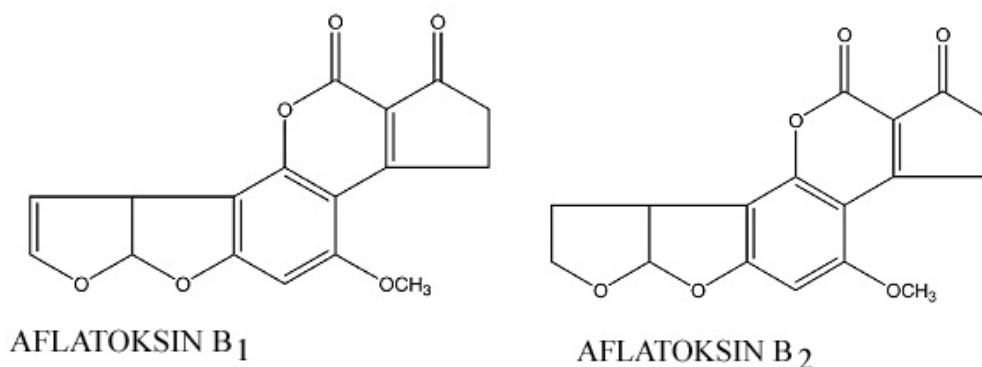
Organizmi iz rodu *Aspergillus* proizvajajo toksine, kot so aflatoksini, ohratoksini, sterigmatocistin in ciklopiazonsko kislino. Rod *Penicillium* proizvaja toksine patulin, ohratoksine, citrinin, penitrem A in ciklopiazonsko kislino. Toksini rodu *Fusarium* so deoksinivalenol, nivalenol, zearalenon, T-2 toksin, diacetoksiskirpenol, moniliformin in fumonizini. Rod *Alternaria* proizvaja tenuazonsko kislino, alternariol in njegov metileterski derivat. Glive iz rodu *Claviceps* so vir ergot alkaloidov. Citohalasini pa so proizvod plesni rodu *Helminthosporium* (Bennet in Klich, 2003; Richard, 2007).

2.1.1 Aflatoksini

Aflatoksine so prvič izolirali in identificirali leta 1961, ko je poginilo več kot 100.000 puranov in druge perutnine, katero so hranili s kikirikijevo moko iz Brazilije. Izbruh bolezni so takrat poimenovali »turkey X disease«. Ugotovili so, da je bila moka kontaminirana s plesnijo *Aspergillus flavus*. Iz te plesni so kasneje izolirali skupino toksinov, ki so jih poimenovali aflatoksini. Beseda aflatoksin tako izhaja iz besed »*Aspergillus flavus* **toksin**« (Blount, 1961).

Aflatoksini so difurokumarinski derivati, ki so sintetizirani v poliketidni metabolni poti nekaterih sevov nitastih gliv iz rodu *Aspergillus* (Klich in sod., 2000). Glavni štirje predstavniki skupine aflatoksinov so aflatoksin B1, B2, G1 in G2. Razdelitev je bila narejena na osnovi fluorescence molekul v prisotnosti UV-svetlobe. Aflatoksini skupine B fluorescirajo pri modri (blue) valovni dolžini, medtem ko aflatoksini skupine G pri zeleni (green) valovni dolžini. Med vsemi oblikami aflatoksinov je oblika B1 najpogostejša in tudi najbolj karcinogena. Poznamo pa še najmanj 16 drugih oblik mikotoksinov, ki

večinoma nastajajo kot posledica biotransformacij oziroma razgradnje aflatoksinov (Heathcote in sod., 1978; Goldblatt, 1969).



Slika 1: Strukturna formula aflatoksina B1 in B2 (Tarin in sod., 2004)

Glavni producenti mikotoksinov skupine aflatoksini so organizmi iz rodu *Aspergillus*. V povezavi s kontaminacijo hrane oziroma krme se najpogosteje pojavljata *A. flavus* in *A. parasiticus*, medtem ko se *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* in *A. pseudotamari* pojavljajo redkeje (Klich in sod., 2000; Peterson in sod., 2001). Znotraj toksikogenih vrst plesni pa obstajajo velike razlike med sevi. Tako samo polovica sevov *A. flavus* proizvaja aflatoksine, katerih koncentracije lahko zelo variirajo (Klich in Pitt, 1988).

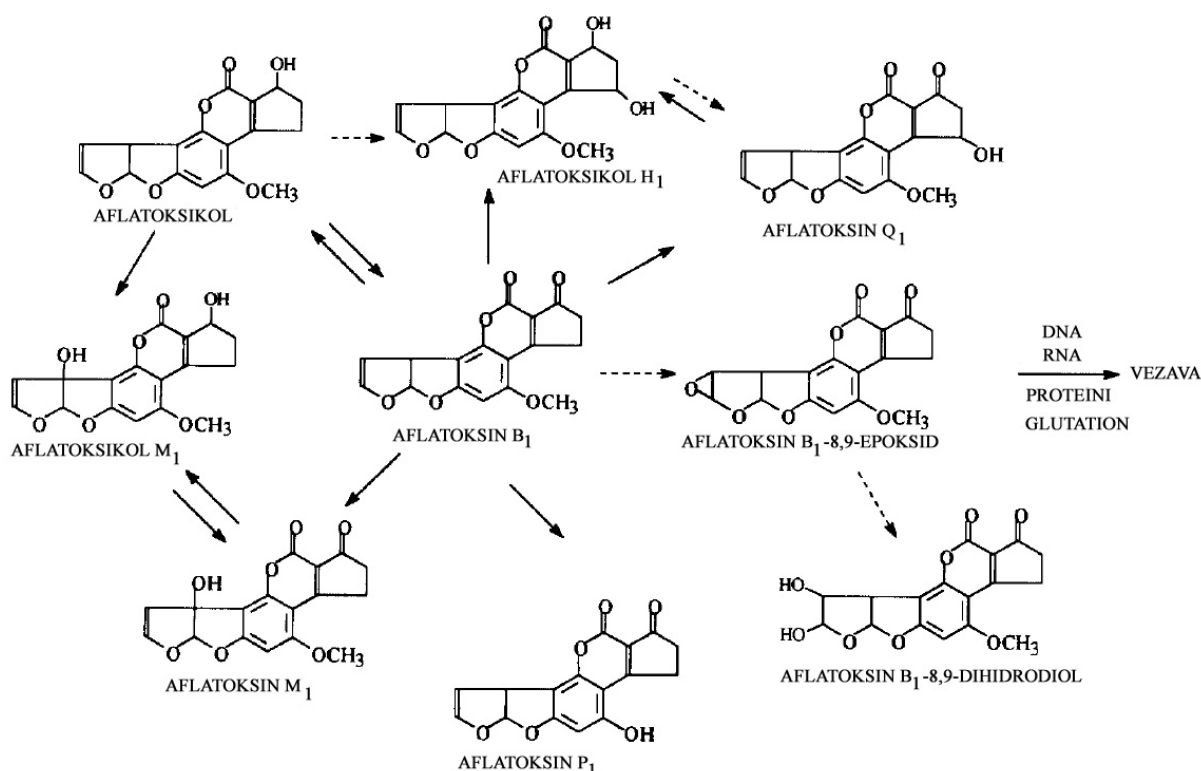
Aflatoksini se pogosto nahajajo na rastlinskih substratih, kot so žitarice, fige, bučna in sončnična semena, razni oreščki, tobak in druga živila (Diener in sod., 1987).

Aflatoksini so toksični za sesalce, perutnino in ribe. Imajo več znanih bioloških učinkov, kot so karcinogenost, imunotoksičnost in hepatotoksičnost (Eaton in Groopman, 1994; Newberne in Butler, 1969). Jetra so primarni tarčni organ aflatoksinov. Tumorji so tukaj najpogostejši, a se lahko pojavljajo tudi drugod (Peerse in Linsell, 1973).

Aflatoksin B1 deluje tako, da se pretvori v obliko, ki se lahko veže na DNA. Transformacija poteka v jetrih s citokromom P450, ki aflatoksin B1 pretvori v različne produkte (slika 2), ki so večinoma manj toksični kot sam aflatoksin B1. Znan produkt je

aflatoksin M1, gre za hidroksilirano obliko aflatoksina B1. Največkrat ga najdemo v mleku živali, ki so jih hranili z aflatoksini onesnaženo hrano. Drugi znani produkt razgradnje aflatoksina B1 v telesu je aflatoksin B1-8,9-epoksid, ki lahko reagira z gvaninskim dušikom na mestu 7. V primeru, če ta reakcija poteče z gvaninskim ostankom na DNA, lahko to vodi v mutacijo oziroma natančneje v tranzverzijo GC baznega para v TA bazni par (Foster in sod., 1983). Pomembna povezava pri nastanku hepatokarcinoma je verjetno inaktivacija p53 tumor supresorskega gena v nekaterih celicah jeter. Ta gen se dokazano inaktivira, če pride do mutacije v predelu kodona 249. Ta mutacija je povezana s tranzverzijo baze G v bazo T oziroma AGG v AGT. Prav takšna zamenjava v baznih parih pa je znan mehanizem delovanja omenjenega aflatoksina B1-8,9-epoksida (Bressac in sod., 1991; Eaton in Gallagher, 1994).

Občutljivost organizma na aflatoksine je odvisna od razmerja med hitrostjo detoksifikacije s pomočjo glutationa (Raj in sod., 1986) in aktivacije oziroma nastajanja mutagene oblike aflatoksina, to je aflatoksina B1-8,9-epoksid (Eaton in Groopman, 1994). Tako je dokazano, da se aflatoksin štirideset krat pogosteje veže na DNA v jetrih podgan, kot na DNA v jetrih miši (Lutz in sod., 1980). Znane pa so tudi razlike v občutljivosti med pripadniki iste vrste. Razlike so posledica različnih dejavnikov, kot so starost, spol, teža, prehrana in predhodno zdravstveno stanje (Cullen in Newberne, 1994; Eaton in Groopman, 1994; Newberne in Butler, 1969).



Slika 2: Shema metabolizma aflatoksina B₁ (Coulombe, 1993)

Zaradi karcinogenih lastnosti aflatoksinov je v številnih državah predpisana zelo stroga zakonodaja glede dovoljene maksimalne količine aflatoksinov v hrani. Tako v Ameriki FDA (U.S. Food and Drug Administration) določa, da je maksimalna vsebnost vsote aflatoksinov B₁, B₂, G₁ in G₂ v hrani 20 µg/kg, v mleku pa je dovoljena vsebnost aflatoksina M₁ 0,5 µg/kg (FAO Food and Nutrition Paper No. 81).

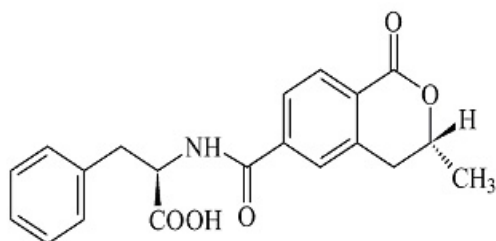
Evropska unija ima predpisano še strožjo zakonodajo. Z Uredbo EC 1881/2006 je določena skupna vsebnost aflatoksinov v hrani (vsota aflatoksinov B₁, B₂, G₁ in G₂) in vsebnost aflatoksina B₁ samega, ki je najbolj toksična oblika. Tako je skupna vsebnost aflatoksinov v hrani, npr. v suhem sadju največ 10 µg/kg, medtem ko je v mleku dovoljena količina aflatoksina M₁ le 0,05 µg/kg.

2.1.2 Ohratoksini

Predstavnik ohratoksinov, ohratoksin A, je prvič izoliral Van der Merwe s sodelavci leta 1965, kot metabolit glive *Aspergillus ochraceus*. Po tej plesni, ki izloča oker barvilo, je ta

skupina toksinov tudi dobila ime. Odkritje toksina je bil del obširne raziskave, ki je bila namenjena izključno iskanju novih, do tedaj še nepoznanih mikotoksinov pri glivah. Povod za tako obširno raziskavo in iskanje novih mikotoksinov je bilo ravno odkritje aflatoksinov nekaj let pred tem (Van der Merwe in sod., 1965).

Ohratoksini so poliketidni derivati dihidroizokumarina, ki je preko karboksilne skupine na mestu 12 z amidno vezjo vezan na L- β -fenilalanin. Med seboj se razlikujejo po radikalu, vezanem na osnovno molekulo. V skupino ohratoksinov spada vsaj sedem strukturno sorodnih spojin. Med njimi sta najbolj toksična ohratoksin A in njegov metilni derivat ohratoksin C.



OHRATOKSIN A

Slika 3: Strukturna formula ohratoksina A (Tarin in sod., 2004)

Glavni producenti ohratoksinov so glive iz rodu *Aspergillus* (*A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. melleus*, *A. niger* in druge). Posebna pozornost je bila posvečena vrsti *A. niger*, saj gre za organizem, ki se uporablja v proizvodnji nekaterih encimov in citronske kisline, ki se tudi uporablja v živilstvu. Zato je potrebno zagotoviti, da industrijski sevi, ki se uporabljajo v proizvodnji, ne producirajo ohratoksinov. Znan pa je še vsaj eden organizem iz rodu *Penicillium*, to je *P. verrucosum*, ki tudi sintetizira ohratoksin in pogosto kontaminira ječmen (Chu, 1974; Pitt, 1987).

Ohratoksine lahko najdemo v različnih živilih rastlinskega in živalskega izvora. Najpogosteje ga odkrivamo v kavnih zrnih, kakavu, žitih, suhem sadju, papriki, začimbah in grozdju. To so tudi rastlinski substrati, na katerih uspešno rastejo ohratoksin producirajoče plesni. V hrani živalskega izvora pa je ohratoksin prisoten zaradi počasnega

izločanja iz organizma živali, ki so jih hranili z ohratoksini kontaminirano krmo (Marquardt in Frohlich, 1992; Pitt, 2000; Van Egmond in Speijers, 1994).

Ohratoksin A prizadene predvsem ledvice, kjer povzroči akutne ali kronične razjede, v višjih koncentracijah pa deluje toksično tudi na jetra. Ohratoksin A tako deluje nefrotoksično, hepatotoksično, imunotoksično, karcinogeno in teratogeno (Beardall in Miller, 1994; Kuiper –Goodman in Scott, 1989). Ohratoksin povezujejo z nastankom vsaj dveh kroničnih bolezni pri sesalcih, to je endemsko nefropatijo prašičev in balkansko endemsko nefropatijo pri človeku. Balkanska endemska nefropatija je bolezen, ki pri ljudeh povzroča kronično obolenje ledvic. To ledvično obolenje je najpogostejše v skandinavskih državah in na področju jugovzhodne Evrope v Srbiji, Bosni, Hrvaški, Bolgariji in Romuniji. Bolezen povezujejo tudi z nastankom tumorjev na urinarnem traktu (Pfohl-Leszkowicz in sod., 2002).

Poznani so vsaj trije mehanizmi delovanja ohratoksina A na celično fiziologijo:

- Ohratoksin A je derivat L-fenilalanina, zato lahko inhibira delovanje fenilalanin-tRNA sintetaze. Prihaja do kompetitivne inhibicije sintetaze zaradi tekmovanja med fenilalaninom in ohratoksinom A za vezavo na ta encim. Posledica tega mehanizma je inhibicija sinteze proteinov (Bunge in sod., 1979, Marquardt in Frohlich, 1992).
- Zavira nastajanje ATP v mitohondrijih ledvic, tako da inhibira znotraj mitohondrijski transport fosfata (Meisner in Meisner, 1981).
- Povzroča lipidno peroksidacijo ter oksidativni stres (Rahimtula in sod., 1988).

Ohratoksin je dokazano nevaren za zdravje ljudi in živali, zato je Evropska unija z uredbo EC 466/2001 nato pa še z dopolnitvijo te uredbe EC 123/2005, določila maksimalne koncentracije ohratoksina A za nekatera živila rastlinskega izvora. Tako je maksimalna vsebnost ohratoksina, ki je še dovoljena v nepredelanih surovih žitih 5 µg/kg, v prehrabnih izdelkih iz žita 3 µg/kg, v suhem sadju, npr. v rozinah pa 10 µg/kg.

2.2 ANALITIKA – METODE DETEKCIJE MIKOTOKSINOV

Zaradi pomembnosti mikotoksinov za zdravje ljudi in živali so bile do danes razvite številne metode za kvalitativno in kvantitativno določanje mikotoksinov. Najbolj razširjene metode za detekcijo mikotoksinov so tankoslojna kromatografija (TLC), plinska kromatografija (GC), visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC), tekočinska kromatografija z masno selektivnim detektorjem (LC-MS) in različne imunološke metode, kot je encimsko imunski test (ELISA) in radioimunska analiza (RIA) (Bullerman, 2003). V zadnjem času pa se razvijajo tudi nove metode, ki temeljijo na osnovi biosenzorjev (npr. SPR), infrardeče svetlobe in zvočnih lastnosti (Krska in sod., 2007).

Prve metode, ki so jih razvili za detekcijo aflatoksinov in ohratoksinov, so bile osnovane na osnovi njihovih fluorescenčnih lastnosti. To so bile kvantitativne oziroma semikvantitativne metode. Ena izmed njih je bila tankoslojna kromatografija (TLC). Z razvojem tekočinske kromatografije in imunoafinitetnih kolon, ki omogočajo učinkovito odstranjevanje interference, so TLC počasi opustili (Juriševič Kahne, 2005).

2.2.1 HPLC

Osnovne in najhitrejše metode bazirajo na analizi z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC) na reverzni fazi (RP) kolone ter fluorescenčno detekcijo (FLD). Po ustreznem vzorčenju je potrebno najti ustrezen postopek ekstrakcije za čim bolj učinkovito izolacijo mikotoksina iz živila. Za boljšo ekstrakcijo toksina se uporablja kar nekaj različnih vodnih raztopin, topil (metanol, acetonitril, kloroform, diklorometan, etilacetat in druga) in mešanic le-teh z vodo ali kislino. Sledi čiščenje tako pridobljenega ekstrakta na različnih kolonah, ki odstranjujejo prisotne nečistoče – interferirajoče komponente živila v ekstraktu. Izbira načina čiščenja ekstrakta odločilno vpliva na mejo detekcije postopka. Trenutno so imunoafinitetne kolone najbolj učinkovite in selektivne. Njihova uporaba je enostavna, zahteva kratek čas, zagotavlja popolnoma avtomatiziran sistem analize in dovoljuje uporabo večjega števila vzorcev. Imunoafinitetna kolona ima vezana specifična protitelesa, na katera se vežejo le molekule določenega mikotoksina iz ekstrakta, ostale

komponente pa speremo iz kolone. Vezan toksin z ustreznim topilom eluiramo iz kolone. Tako pripravljen eluat je primeren za identifikacijo in kvantitativno analizo na prisotnost toksina z HPLC-FLD, ki simultano identificira in kvantitativno določi vsebnost toksina v analiziranem vzorcu. Identifikacija se izvede s primerjavo retenzijskega časa standarda, na osnovi površine kromatografskega vrha pa se določi koncentracija toksina (Bullerman, 2003).

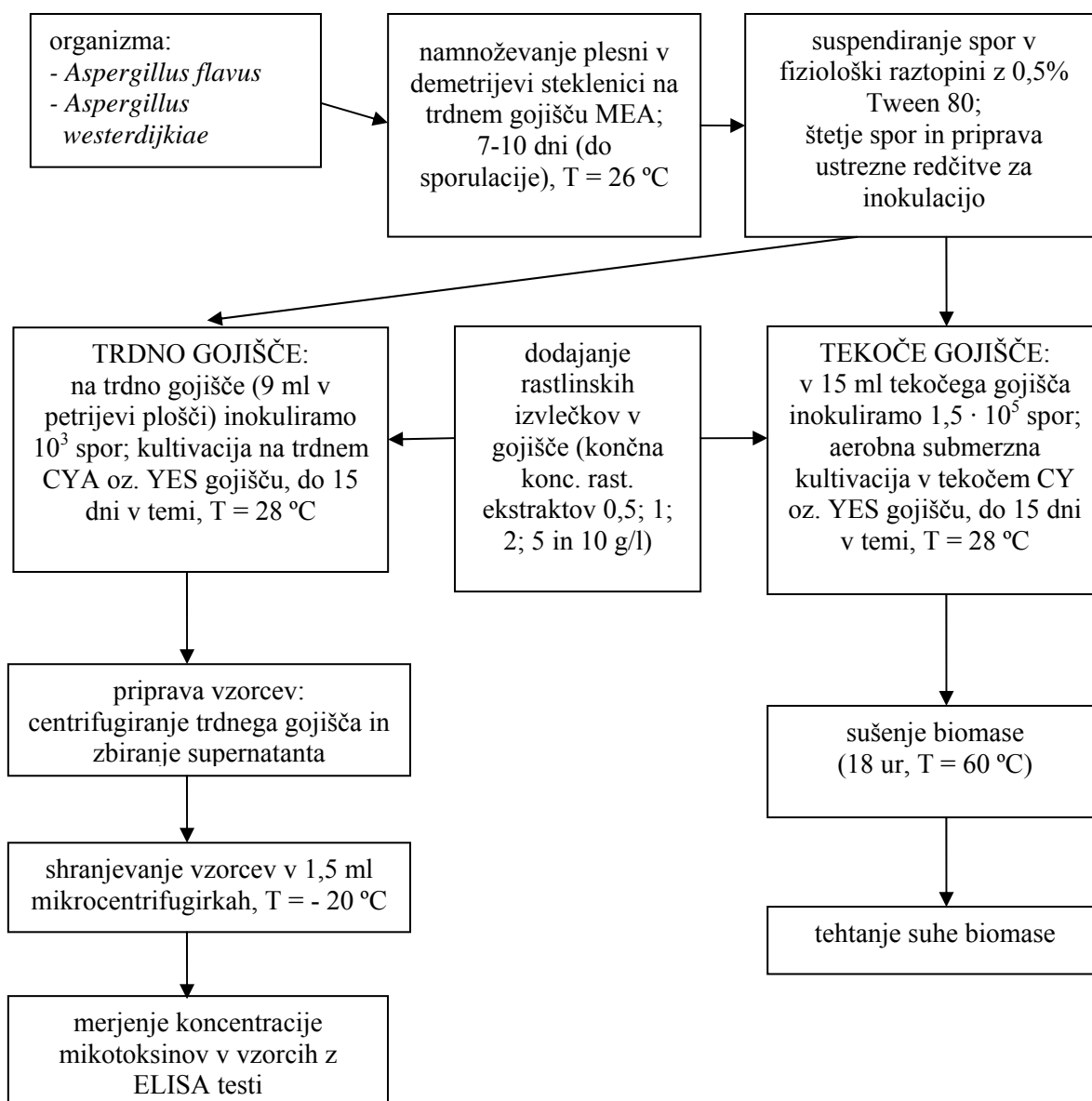
2.2.2 Encimsko-immunska metoda (ELISA)

V zadnjem času se za detekcijo mikotoksinov uveljavljajo tudi različne imunološke metode, kot je npr. encimsko imunski test (ELISA). Gre za metodo, ki ni zahtevna za izvedbo, ne potrebuje drage opreme za analitiko, prav tako pa ni potrebno predhodno čiščenje vzorcev oziroma je le-to enostavno. ELISA je visoko občutljiva kvantitativna metoda, ki se izvaja v več različnih izvedbah, med katerimi sta indirektna in direktna kompetativna metoda, najbolj pogosti (Krska in sod., 2007).

ELISA lahko temelji na vezavi antigena s primarnim protitelesom, ki ga predhodno vežemo na trak oz. strip (ang. lateral flow strip technology, ki je zelo uporaben na terenu) ali pa na mikrotitersko ploščico (v laboratoriju). Na primarno protitelo se veže ustrezen antigen oziroma iskani mikotoksin, tako nastali kompleks se nato veže še z encimom konjugiranim sekundarnim protitelesom. Encim po dodatku specifičnega substrata le-tega spremeni, kar povzroči spremembo barve. Gre za t.i. »sendvič tehniko« encimsko-detekcijskega sistema, kvantifikacija pa se izvaja s pomočjo merjenja absorbance (Ahmed, 2002).

3 MATERIAL IN METODE

Končni rezultati eksperimentalnega dela diplomske naloge predstavljajo meritve teže suhe biomase in meritve koncentracije mikotoksinov v vzorcih pridobljenih po končani kultivaciji plesni na trdnem gojišču. Laboratorijsko delo je potekalo v več delih, ki so si sledili v zaporedju, prikazanem na sliki 4.



Slika 4: Shema poteka dela

3.1 METODE

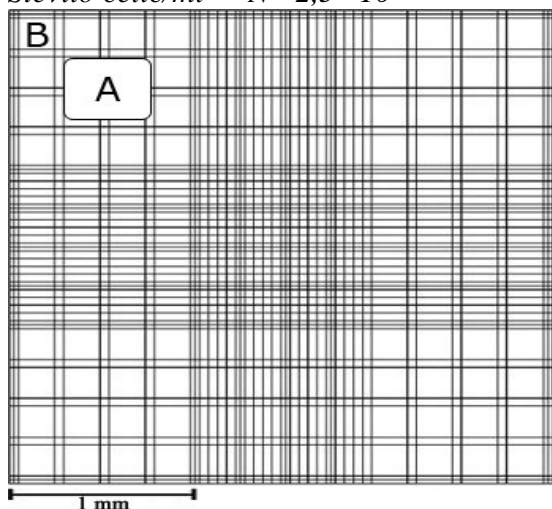
3.1.1 Namnoževanje plesni

Namnoževanje plesni smo izvedli tako kot v svojem članku navajata Fan in Chen (1999). Iz petrijeve plošče smo izrezali delček s plesnijo preraslega trdnega gojišča. S tem koščkom smo nato inokulirali trdno gojišče MEA v demetrijevi steklenici. Tako inokuliran poševnik smo nato inkubirali pri 26 °C v temi, 7-10 dni oziroma do sporulacije plesni.

3.1.2 Priprava inokuluma

Inokulum spor smo pripravili tako kot v članku navaja Nguefack in sod. (2004). Namnoženo kulturo plesni smo prelili s 30 ml fiziološke raztopine, ki smo ji dodali 2 kapljici Tween 80 za lažje dispergiranje hidrofobnih spor. S cepilno zanko smo sprostili spore v sterilno fiziološko raztopino. Z direktnim štetjem pod mikroskopom smo s pomočjo Bürker-Türkove števne ploščice (slika 3) določili število spor v inokulumu. Prešteli smo celice v petih kvadratih (označeno z B), znotraj večjega kvadrata (na sliki 3 označenega z A). Po enačbi (1) smo izračunali povprečno število celic na kvadratek (\bar{N}) in to število pomnožili s faktorjem redčitve ter konstanto $2,5 \cdot 10^5$.

$$\text{Število celic/ml} = \bar{N} \cdot 2,5 \cdot 10^5 \quad \dots (1)$$



Slika 5: Shematski prikaz Bürker-Türkove števne ploščice (Bürker-Türk, 2008)

Ko smo določili število celic v mililitru, smo uporabili ustrezen volumen za inokulacijo. Za inokulacijo tekočega gojišča je bila končna koncentracija $1 \cdot 10^4$ spor na mililiter gojišča. Za inokulacijo trdnega gojišča je bila končna koncentracija $1 \cdot 10^3$ spor na petrijevo ploščo (9 ml gojišča v petrijevi plošči \varnothing 70 mm).

3.1.3 Submerzna kultivacija

Submerzna kultivacija je potekala tako, kot jo v članku opisuje Ren (1999), le da je kultivacija namesto v elermajericah potekala v sterilnih centrifugirkah (50 ml) velikosti 30x115 mm. V centrifugirko smo odmerili 10,5 ml sveže pripravljene gojišča YES oziroma 14,1 ml sveže pripravljene gojišča CY, zamašili z zamaškom iz umetne pene in sterilizirali v avtoklavu (20 min, 121 °C, 1,2 bara). Po sterilizaciji smo v gojišče dodali s filtracijo sterilizirano 50% (w/v) vodno raztopino saharoze, in sicer 4,5 ml v centrifugirke z gojiščem YES in 0,9 ml v centrifugirke z gojiščem CY. V centrifugirke z gojišči smo dodali (razen v kontrole) rastlinske ekstrakte (rastlinski izvleček A, rastlinski izvleček B in rastlinski izvleček C) tako da je bila končna koncentracija ekstrakta v gojišču 0,5; 1,0; 2,0 in 5,0 g/l. V centrifugirke, ki smo jih uporabili za kontrolo rasti, smo v 15 ml gojišča dodali 375 μ l 96 % etanola (Merck). To je enak volumen etanola, kot ga dodamo v gojišče pri dodajanju rastlinskega ekstrakta z najvišjo koncentracijo (to je 5,0 g/l).

Pripravljeno gojišče smo nato inokulirali s spori plesni tako, da je bila končna koncentracija $1 \cdot 10^4$ spor na mililiter gojišča. Plesni smo kultivirali v temi pri 28 °C v inkubatorju. Časovni potek rasti smo spremljali z vzorčenjem 3., 6., 9., 11., 13 in 15. dan kultivacije, za ugotavljanje vpliva rastlinskih ekstraktov na rast plesni smo vzorčili 13. dan kultivacije.

3.1.4 Merjenje suhe biomase

Težo suhe biomase smo določali po postopku, kot ga je v članku opisal Badei (1992). Postopek smo nekoliko spremenili, in sicer smo suho biomaso sušili v centrifugirki pri 60 °C 18 ur. Na dan vzorčenja smo iz centrifugirke, v kateri je rasla plesen, previdno odlili izrabljeno gojišče tako, da je micelij ostal v centrifugirki. Nato smo centrifugirko z biomaso sušili 18 ur do konstantne mase pri temperaturi 60 °C. Po 18 urah smo

centrifugirko skupaj z biomaso stehali. Od teže centrifugirke s suho biomaso smo odšteli težo prazne centrifugirke, ki smo jo stehali pred inokulacijo. Tako smo dobili težo suhe biomase, ki je zrasla v 50 ml centrifugirki s 15 ml gojišča.

3.1.5 Kultivacija na površini agarja v petrijevih ploščah

Kultivacijo na površini agarja v petrijevih ploščah smo izvedli po metodi, kot sta jo opisala Soliman in Badeaa (2002). Kultivacija na trdnem gojišču je potekala v petrijevih ploščah premera 70 mm, v katere smo odmerili 9 ml gojišča. V 1000 ml infuzijskih steklenicah smo avtoklavirali 350 ml sveže pripravljene gojišča YES oziroma 470 ml sveže pripravljene gojišča CYA. Po sterilizaciji smo v gojišče dodali s filtracijo sterilizirano 50 % (w/v) vodno raztopino saharoze, in sicer 150 ml izhodne raztopine v steklenico z gojiščem YES in 30 ml izhodne raztopine v steklenico z gojiščem CYA. Preden smo gojišče nalili v petrijeve plošče, smo dodali rastlinske ekstrakte (rastlinski izvleček A, rastlinski izvleček B in rastlinski izvleček C), tako da je bila končna koncentracija ekstrakta v gojišču 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 in 10,0 g/l.

Naslednji dan smo trdno gojišče v petrijevih ploščah inokulirali s sporami plesni tako, da je bila končna koncentracija $1 \cdot 10^3$ spor na petrijevo ploščo. Plesni smo kultivirali v temi pri 28 °C v inkobatorju. Časovni potek rasti smo spremljali z vzorčenjem 3., 6., 9., 11., 13. in 15. dan kultivacije, za ugotavljanje vpliva rastlinskih ekstraktov na rast plesni smo vzorčili 13. dan kultivacije.

Za potrebe vzorčenja smo uporabili naslednji protokol:

- prenos celotnega trdnega gojišča skupaj z micelijem plesni iz petrijeve plošče na sterilno gazo
- prenos sterilne gaze skupaj z gojiščem v 50 ml centrifugirko
- zaprtje centrifugirke s plastičnim pokrovom, rob gaze je ujet na zunanji strani centrifugirke
- centrifugiranje centrifugirke z gojiščem 6 min pri 3000 obr./min
- odstranitev gaze z gojiščem po centrifugiranju in odpipetiranje supernatanta z dna centrifugirke

- prenos vzorcev v 2 ml mikrocentrifugirke in centrifugiranje 10 min pri 14000 obr./min
- prenos supernatanta brez usedlin v nove mikrocentrifugirke
- zamrznitev vzorcev pri -20 °C

3.1.6 Merjenje koncentracije mikotoksinov

3.1.6.1 Merjenje koncentracije aflatoksinov

Koncentracijo aflatoksina (B1 in B2) smo izmerili z komercialnim ELISA kompletom Celer AFLA ELISA kit proizvajalca Tecna. Meritve smo izvedli po protokolu, ki je naveden v navodilih proizvajalca Tecna (Mycotoxins, 2005).

Celer AFLA ELISA komplet je zasnovan na polistirenski mikrotiterski ploščici, v kateri so na površino jamic vezana anti-aflatoksin protitelesa. V pripravljalni mikrotiterski ploščici smo zmešali z encimom označen aflatoksin in aflatoksin iz vzorca. Takšno mešanico smo nato prenesli v mikrotitersko ploščico, ki je prevlečena z anti-aflatoksin protitelesi. Med inkubacijo prosti aflatoksin (iz vzorca) in aflatoksin, označen z encimom tekmujeta za vezavna mesta na anti-aflatoksin protitelesih. Nevezani aflatoksin smo odstranili s spiranjem. Koncentracijo vezanega encima na mikrotitersko ploščico smo določili posredno z encimsko aktivnostjo. Encim pretvori brezbarvni substrat v modro obarvan produkt. Z dodatkom reagenta, ki zaustavi reakcijo, se barva produkta iz modre spremeni v rumeno. Nato smo izmerili absorbanco pri 450 nm. Obarvanost produkta je obratnosorazmerna količini aflatoksina v vzorcu.

Po navodilih proizvajalca Tecna smo izvedli sledeči postopek za merjenje koncentracije mikotoksinov (Mycotoxins, 2005):

- pipetiranje po 100 µl encimskega konjugata v jamice pripravljalne mikrotiterske ploščice
- dodatek 50 µl priloženega standarda oziroma vzorca v določeno jamico
- premešanje volumna mešanice z mikropipeto

- prenos 100 μ l vsebine v mikrotitersko ploščico, jamice so prevlečene z anti-aflatoksin protitelesi
- inkubiranje mikrotiterske ploščice natančno 10 minut pri sobni temperaturi
- odlitje mešanice iz jamic po končani inkubaciji
- trikratno spiranje jamic mikrotiterske ploščice s pufrom za spiranje
- odlitje pufra za spiranje, pivnanje mikrotiterske ploščice s papirnato brisačo
- dodatek 100 μ l raztopine za razvijanje reakcije v vsako jamico mikrotiterske ploščice in rahlo pomešanje
- inkubiranje mešanice natančno 5 minut pri sobni temperaturi
- dodatek 50 μ l raztopine za zaustavitev reakcije in ponovno rahlo pomešanje mikrotiterske ploščice
- merjenje absorbanca (pri 450 nm) v roku 60 minut po ustavitvi reakcije

3.1.6.2 Merjenje koncentracije ohratoksina A

Koncentracijo ohratoksina A smo izmerili z komercialnim ELISA kompletom I'screen OCHRA proizvajalca Tecna. Meritve smo izvedli po protokolu, ki je naveden v navodilih proizvajalca Tecna (Mycotoxins, 2005).

I'screen OCHRA komplet je zasnovan na polistirenski mikrotiterski ploščici, v kateri so na površino jamic vezana proti kunčja IgG protitelesa. V mikrotiterski ploščici smo zmešali z encimom (hrenovo peroksidazo-HRP) označen ohratoksin, ohratoksin iz vzorca in specifična anti-ohratoksin protitelesa. V času inkubacije molekule ohratoksina A (iz vzorca) in ohratoksin A (konjugiran z encimom HRP) tekujeta za prosto vezavna mesta na anti-ohratoksin kunčjih protitelesih. Takšno mešanico smo nato prenesli v mikrotitersko ploščico, ki je prevlečena s proti kunčjimi IgG protitelesi. Anti-ohratoksin kunčja protitelesa (z vezanim ohratoksinom) se vežejo s proti kunčjimi IgG protitelesi, ki so pritrjena v jamicah mikrotiterske ploščice. Nevezani ohratoksin smo odstranili s spiranjem. Koncentracijo vezanega encima (HRP) na mikrotitersko ploščico smo določili posredno z

encimsko aktivnostjo. Encim pretvori brezbarvni substrat v modro obarvan produkt. Z dodatkom reagenta, ki zaustavi reakcijo, se barva produkta iz modre spremeni v rumeno. Nato se izmeri absorbanca pri 450 nm. Obarvanost produkta je obratno sorazmerna količini ohratoksina v vzorcu.

Po navodilih proizvajalca Tecna smo izvedli sledeči postopek za merjenje koncentracije mikotoksinov:

- dodatek 50 μ l priloženega standarda oziroma vzorca v določeno jamico mikrotiterske ploščice
- dodajanje 100 μ l encimskega konjugata z mikropipeto v jamice mikrotiterske ploščice
- rahlo pomešanje mikrotiterske ploščice
- inkubiranje mešanice 20 minut pri sobni temperaturi
- odlitje mešanice iz jamic po končani inkubaciji
- trikratno spiranje jamic mikrotiterske ploščice s pufrom za spiranje
- odlitje pufra za spiranje, pivnanje mikrotiterske ploščice s papirnato brisačo
- dodatek 200 μ l raztopine za razvijanje reakcije v vsako jamico mikrotiterske ploščice in rahlo pomešanje
- inkubiranje mešanice natančno 20 minut pri sobni temperaturi
- dodatek 50 μ l raztopine za zaustavitev reakcije in ponovno rahlo pomešanje mikrotiterske ploščice
- merjenje absorbanca (pri 450 nm) v roku 60 minut po ustavitvi reakcije

3.1.7 Statistična obdelava podatkov

Poskusi so bili izvedeni v več ponovitvah, zato smo dobljene rezultate statistično obdelali in ovrednotili. Dobljeni izračuni so nam bili v pomoč pri razlagi vpliva rastlinskih ekstraktov na rast in produkcijo mikotoksinov pri nitastih glivah. Rezultate meritev smo

podali kot povprečno vrednost in oceno variabilnosti oziroma standardnega odklona od povprečne vrednosti različnih gojitev. Podatke za rast biomase in produkcijo mikotoksina smo dobili na podlagi treh neodvisnih bioloških ponovitev in dvakratnega merjenja vsakega vzorca. Vse statistične operacije smo izvedli s pomočjo programa Microsoft Excel (average, stdev, t-test).

3.1.7.1 Povprečna vrednost

Pri štetju spor, tehtanju teže suhe biomase in merjenju absorbance za določanje koncentracije mikotoksinov smo vse meritve izvedli v več ponovitvah.

Rezultate meritev smo podali kot povprečno vrednost (\bar{X}) – enačba (2) (Košmelj, 2001).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots(2)$$

\bar{X} -povprečna vrednost; n-število vzorcev; X_i - vrednost i-te meritve; n-število meritev

3.1.7.2 Standardni odklon, koeficient variiranja

Za oceno variabilnosti rezultatov pri vzorcih smo uporabili standardni odklon (SD) – enačba (3) in koeficient variiranja (KV) – enačba (4) (Košmelj, 2001).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \dots (3)$$

$$KV (\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100 \quad \dots (4)$$

3.1.7.3 t-test

Preizkušanje domneve o razliki med povprečjema dveh majhnih neodvisnih vzorcev (kontrolnega in tretiranega vzorca) imenujemo t-test (Adamič, 1989). Preizkus temelji na vzorčni porazdelitvi razlik dveh povprečij. Osnovna domneva je, da se povprečji obeh vzorcev značilno razlikujeta. Načelna domneva pa je, da oba vzorca izvirata iz iste populacije in da ni resnične razlike med obema povprečjema oziroma da je morebitna razlika samo posledica naključja. To domnevo preverjamo z izračunom verjetnosti, da bi dobili razliko med povprečjema obeh vzorcev, kakršno bi v resnici dobili, če bi bila vzorca vzeta iz iste populacije. Če je ta verjetnost dovolj majhna, torej manjša kot stopnja tveganja, za katero smo se odločili, zavrnilo ničelno domnevo v korist osnovne domneve. Na podlagi primerjave med tabelarično – kritično vrednostjo t pri dvosmernem testu ob tveganju p in pri m stopinjah prostosti ter izračunane vrednosti t lahko zavrnilo oziroma sprejmemo ničelno domnevo. Zgornje meje tveganja (p), pri katerih zavračamo ničelno domnevo, so najpogosteje 0,05; 0,01 ali 0,001. Glede na te meje govorimo tudi o 5-, 1- in 0,1-odstotni stopnji značilnosti rezultatov (Fujs, 2004). Za naše rezultate smo uporabljali zgornjo mejo tveganja $p \leq 0,05$, tako da lahko z več kot 95-odstotno verjetnostjo trdimo, da se povprečji obeh vzorcev statistično značilno razlikujeta.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}} \quad \dots (5)$$

$$s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}} \quad \dots (6)$$

3.2 MATERIALI

Pri raziskovalnem delu smo uporabili biološki in potrošni material ter laboratorijsko opremo laboratorija Katedre za biotehnologijo.

3.2.1 Mikroorganizmi

3.2.1.1 *Aspergillus westerdijkae*

Uporabili smo sev nitaste glive *Aspergillus westerdijkiae* – ZIM F68 (CBS 112803; NRRL 3174; ATCC 22947) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Biotehniške fakultete. Ta sev proizvaja ohratoksin A in B.

Organizem smo gojili na petrijevih ploščah s trdnim gojiščem MEA v inkubatorju pri temperaturi 26 °C.

3.2.1.2 *Aspergillus flavus*

Uporabili smo sev nitaste glive *Aspergillus flavus* – ZIM F70 (CBS 573.65; ATTC 16875; NRRL 500) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Biotehniške fakultete. Ta sev proizvaja aflatoksin B1 in B2.

Organizem smo gojili na petrijevih ploščah s trdnim gojiščem MEA v inkubatorju pri temperaturi 26 °C.

3.2.2 Gojišča

- Trdno gojišče MEA (Malt ekstrakt agar) (Atlas, 1993)

Preglednica 1: Sestava trdnega gojišča MEA

Sestavina	masa [g]
sladni ekstrakt (Biolife)	20
bakteriološki pepton (Oxsoid)	1
brezvodna glukoza (Kemika)	20
bakteriološki agar (Biolife)	20
dH ₂ O	do 1000 ml

- Tekoče gojišče YES (Yeast extract – sucrose broth) (Ren, 1999)

Preglednica 2: Sestava tekočega gojišča YES

Sestavina	masa [g]
saharoza	150
kvasni ekstrakt	20
dH ₂ O	do 1000 ml

Gojišču smo šele po sterilizaciji v avtoklavu sterilno dodali 50 % (w/v) vodne raztopine saharoze, in sicer smo dodali 300 ml sterilne raztopine saharoze v 700 ml sterilnega gojišča, skupni volumen je tako bil 1000 ml.

Pri pripravi trdnega gojišča YES smo pred sterilizacijo dodali še 15 g/l agarja.

- Tekoče gojišče CY (Czapek yeast autolysate) (Atlas, 1993)

Preglednica 3: Sestava tekočega gojišča CY

Sestavina	masa [g]
saharoza	30
kvasni ekstrakt	5
NaNO ₃	3
K ₂ HPO ₄	1
KCl	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
dH ₂ O	do 1000 ml

Gojišču smo šele po sterilizaciji v avtoklavu sterilno dodali 50 % (w/v) vodne raztopine saharoze, in sicer smo dodali 60 ml sterilne raztopine saharoze v 940 ml sterilnega gojišča, skupni volumen je tako bil 1000 ml.

Pri pripravi trdnega gojišča CYA (Czapek yeast autolysate agar) smo gojišču CY pred sterilizacijo dodali še 15 g/l agarja.

3.2.3 Reagenti, raztopine

- Fiziološka raztopina – fosfatna voda

Preglednica 4: Sestava fiziološke raztopine

Sestavina	masa [g]
KH ₂ PO ₄	3,40
NaOH	3M
dH ₂ O	do 100 ml

Zatehtali smo 3,40 g KH₂PO₄, dodali 50 ml destilirane vode, uravnali pH = 7,2 s 3M vodno raztopino NaOH in dopolnili do 100 ml z destilirano vodo. Delovno raztopino KH₂PO₄ smo pripravili tako, da smo vzeli 1,25 ml izhodne raztopine KH₂PO₄ in dopolnili do 1000 ml z destilirano vodo. Puffer smo sterilizirali (20 min, 121 °C, 1,2 bara).

- 50 % (w/v) vodna raztopina saharoze

Preglednica 5: Sestava raztopine saharoze

Sestavina	masa [g]
saharoza	500
dH ₂ O	do 1000 ml

Raztopino smo mešali na magnetnem mešalu, da se je saharoza popolnoma raztopila. Raztopino saharoze smo sterilizirali z vakuumsko filtracijo skozi filtrni papir s premerom por 0,2 µm (Sartorius).

- 20 % (w/v) etanolna raztopina rastlinskih ekstraktov

Pripravili smo tri različne raztopine rastlinskih ekstraktov (rastlinski izvleček A, rastlinski izvleček B in rastlinski izvleček C). V 20 ml centrifugirko smo zatehtali 2 g izbranega rastlinskega izvlečka (v prahu) in dolili do 10 ml 96 % etanola (Merck). To smo nato mešali na stresalniku, dokler ni nastala homogena suspenzija (kar je trajalo približno 5 minut).

- Določanje koncentracije aflatoksina

Encimsko imunski test (ELISA) komplet Celer AFLA ELISA kit proizvajalca Tecna

- Določanje koncentracije ohratoksina

Encimsko imunski test (ELISA) komplet I'screen OCHRA proizvajalca Tecna

3.2.4 Pribor in oprema

Materiali:

- avtoklav Sutjeska
- tehtnici: Sartorius-exelence, Sartorius-analytic
- magnetno mešalo Tehnica Železniki 550 M
- pH meter Mettler Toledo SevenMulti
- mikrovalovna pečica Sanyo
- brezprašna komora Iskra PIO SMBC 122
- petrijevke Golias
- 50-ml, 500-ml in 1000-ml merilni valj

- naprava za filtriranje Sartorius
- vakuumsko črpalko VEB REGLERVERK
- sterilni membranski filtri (premer por 0,2 μm) Sartorius
- pinceta
- vrtinčnik Tehnica Železniki EV 100
- cepilna zanka
- centrifuga Tehnica LC-321
- inkubator Sutjeska
- plinski gorilnik
- mikroskop Leica ATC 2000
- avtomatske pipete Gilson
- 2-ml mikrocentrifugirke Eppendorf
- števna ploščica Bürker-Türk
- računalnik, programski paket Magellan
- čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Safire 2
- mikrotitrsko plošče NUNC F96 MicroWell™
- hladilnik LHT Škofja Loka
- zamrzovalnik (- 20 °C) LTH Škofja Loka
- zamrzovalnik (- 80 °C) Heto

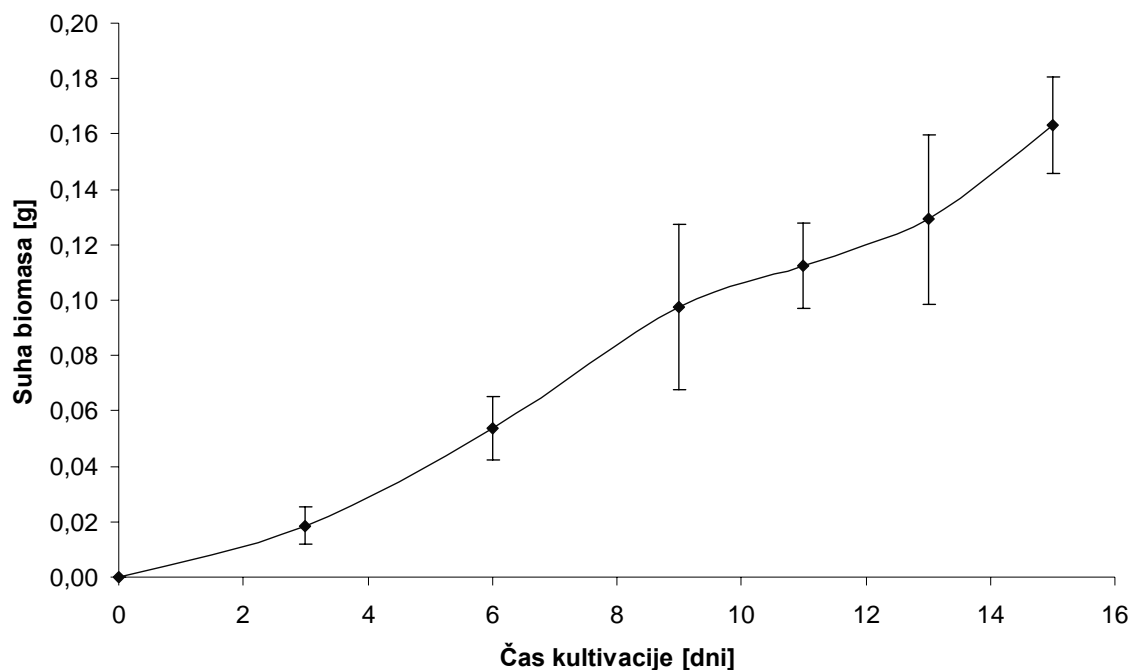
4 REZULTATI

Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v času od maja 2007 do junija 2008. Skladno s postavljeno hipotezo smo skušali dokazati, da izpostavitve kultur plesni *Aspergillus flavus* – ZIM F070 in *Aspergillus westerdijkiae* – ZIM F068 izbranim preparatom (rastlinski izvleček A, rastlinski izvleček B in rastlinski izvleček C) v določenih koncentracijah zavre produkcijo mikotoksinov.

4.1 SUHA BIOMASA GLIVE

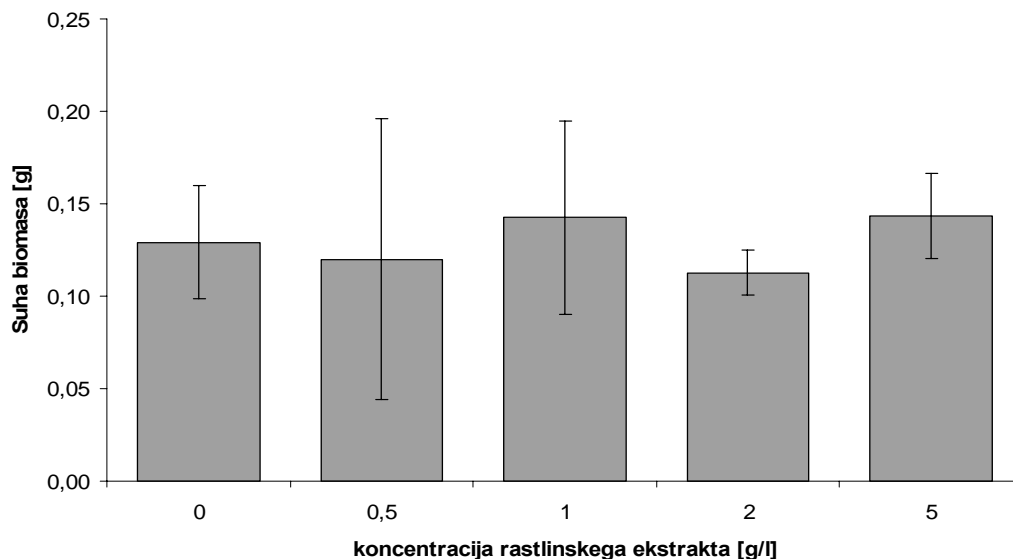
Suho biomaso smo določili tako, da smo izrabljeno gojišče odlili, micelij plesni pa sušili 18 ur do konstantne mase pri temperaturi 60 °C. Spremljali smo časovni potek rasti biomase in vpliv rastlinskih ekstraktov na rast biomase po 13. dnevih glede na kontrolo.

4.1.1 Suha biomasa glive *Aspergillus westerdijkiae* na gojišču YES



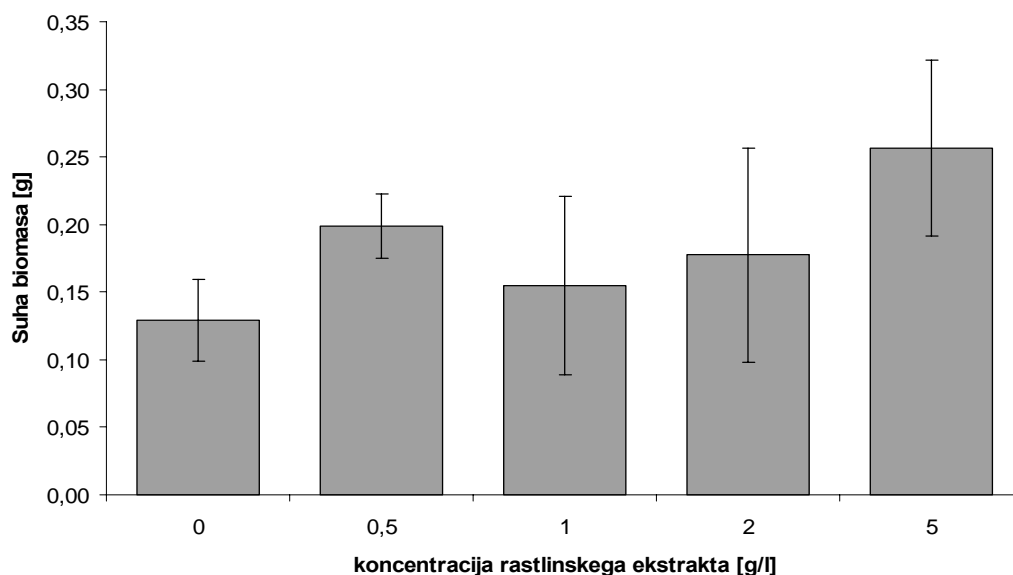
Slika 6: Prirast suhe biomase *Aspergillus westerdijkiae* na gojišču YES v odvisnosti od časa kultivacije brez dodanega rastlinskega ekstrakta ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti petih ponovitev.

4.1.2 Suha biomasa glive *Aspergillus westerdijkiae* na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka A



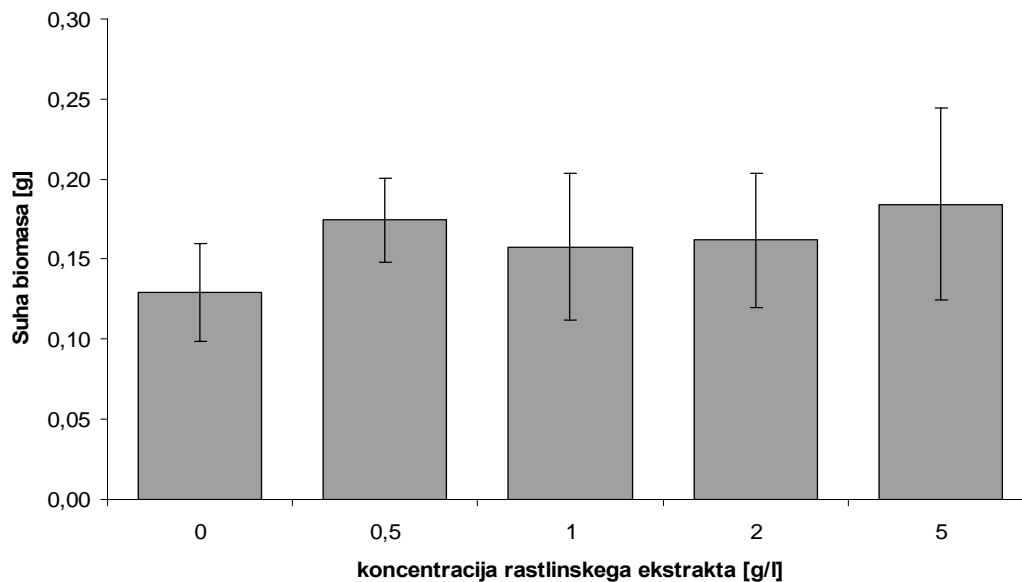
Slika 7: Suha biomasa *Aspergillus westerdijkiae* na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka A po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti petih ponovitev.

4.1.3 Suha biomasa glive *Aspergillus westerdijkiae* na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka B



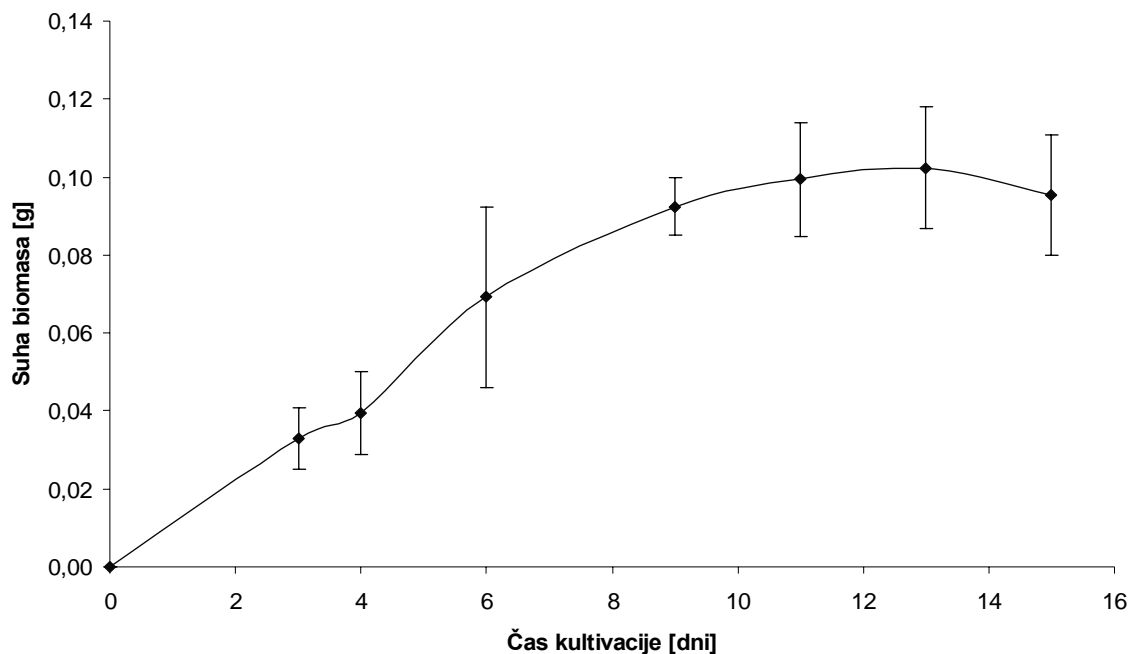
Slika 8: Suha biomasa *Aspergillus westerdijkiae* na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka B po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti petih ponovitev.

4.1.4 Suha biomasa glive *Aspergillus westerdijkiae* na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka C



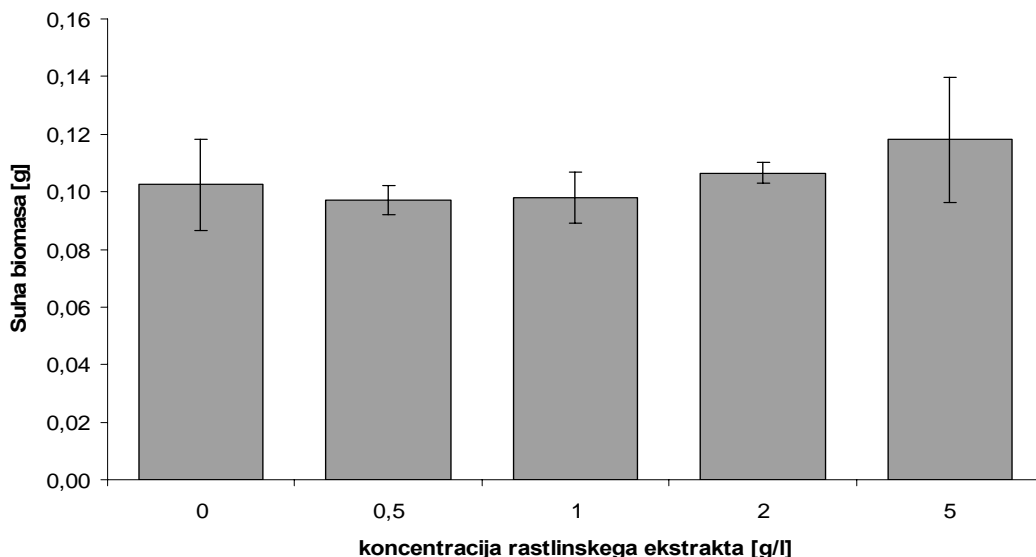
Slika 9: Suha biomasa *Aspergillus westerdijkiae* na gojišču YES v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka C po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti petih ponovitev.

4.1.5 Suha biomasa glive *Aspergillus flavus* na gojišču CY



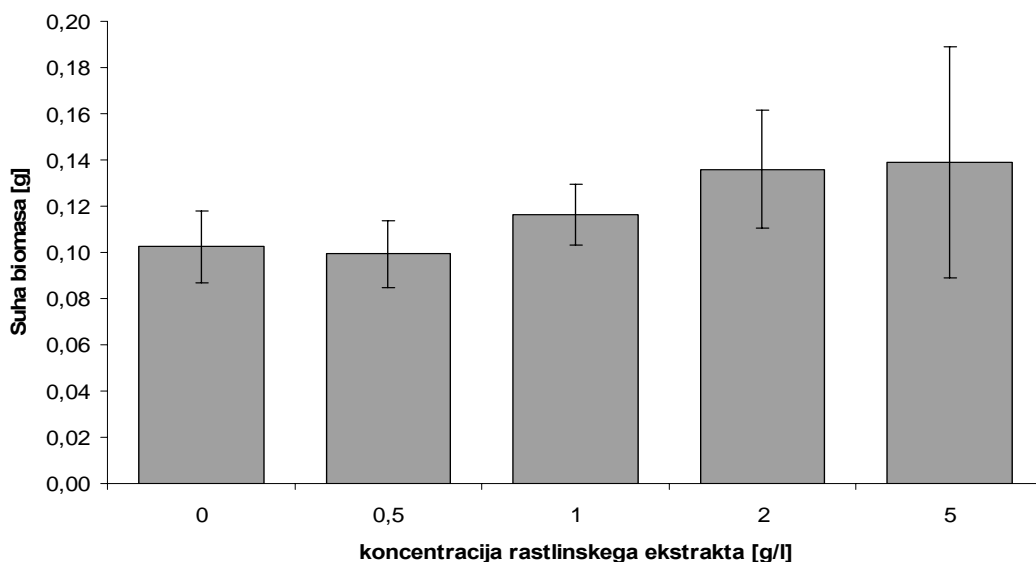
Slika 10: Prirast suhe biomase *Aspergillus flavus* na gojišču CY v odvisnosti od časa kultivacije brez dodanega rastlinskega ekstrakta ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti petih ponovitev.

4.1.6 Suha biomasa glive *Aspergillus flavus* na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka A



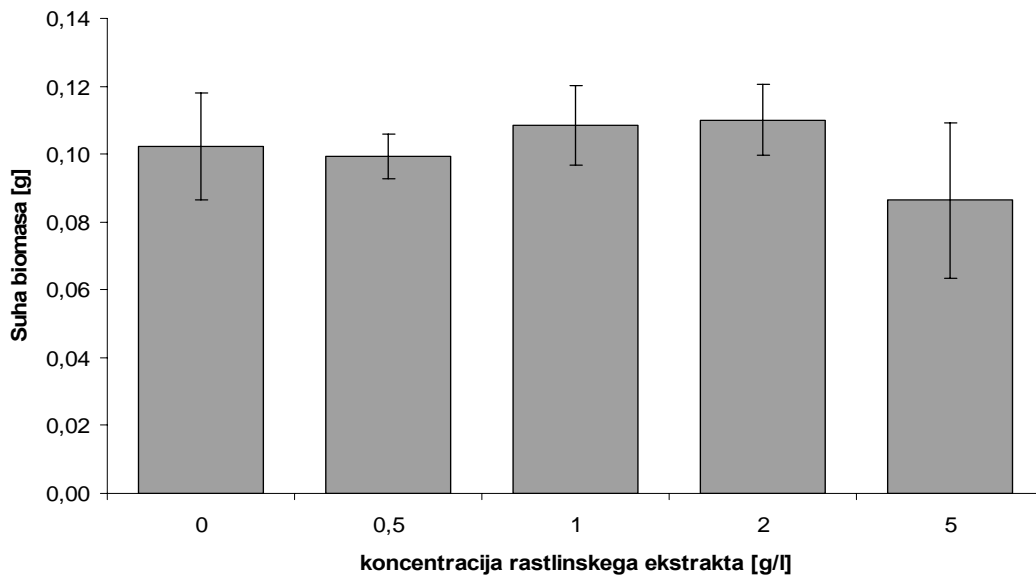
Slika 11: Suha biomasa *Aspergillus flavus* na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka A po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti petih ponovitev.

4.1.7 Suha biomasa glive *Aspergillus flavus* na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka B



Slika 12: Suha biomasa *Aspergillus flavus* na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka B po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti petih ponovitev.

4.1.8 Suha biomasa glive *Aspergillus flavus* na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka C

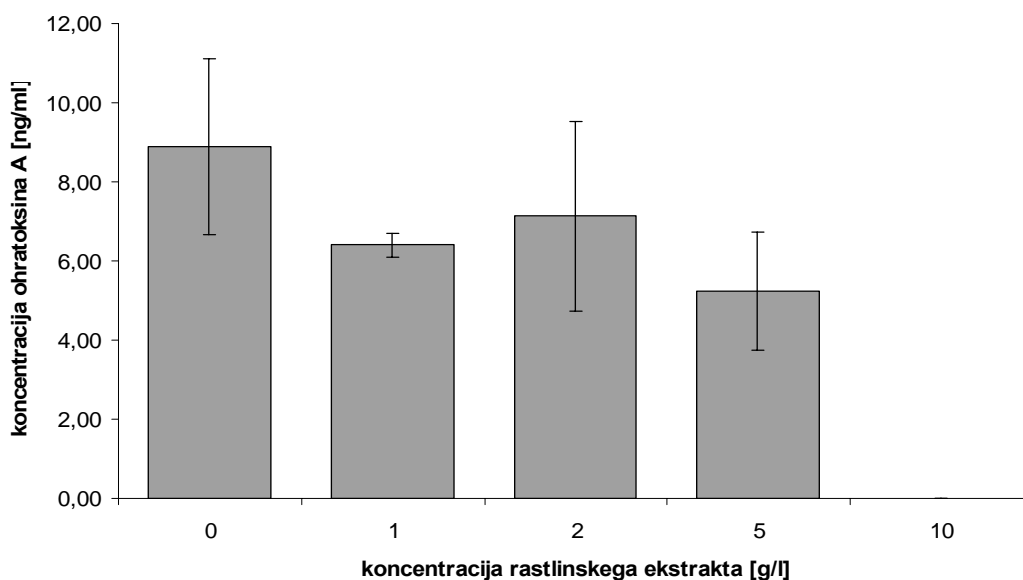


Slika 13: Suha biomasa *Aspergillus flavus* na gojišču CY v odvisnosti od koncentracije rastlinskega izvlečka C po 13 dneh kultivacije ($V_D = 15$ ml, $T = 28$ °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti petih ponovitev.

4.2 DOLOČITEV KONCENTRACIJE MIKOTOKSINOV

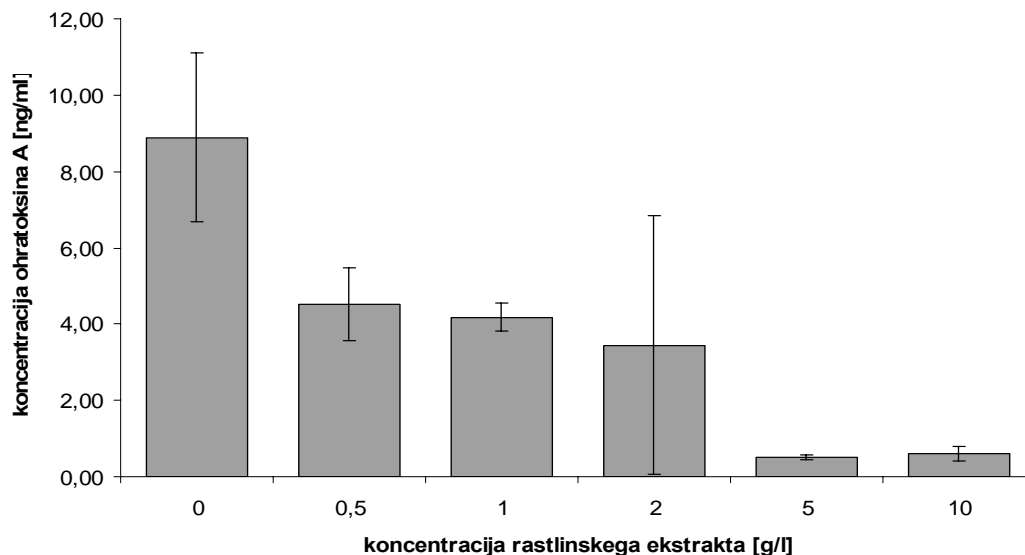
Po 13 dneh kultivacije plesni na trdnem gojišču smo odvzeli vzorce, ki smo jih kasneje porabili za določitev koncentracije mikotoksinov. Za merjenje koncentracije ohratoksina A smo uporabili komercialni komplet I'screen OCHRA proizvajalca Tecna. Za merjenje koncentracije aflatoksina (B1 in B2) pa smo uporabili komercialni komplet Celer AFLA ELISA kit proizvajalca Tecna.

4.2.1 Koncentracija ohratoksina A v gojišču YES z dodatkom rastlinskega izvlečka A



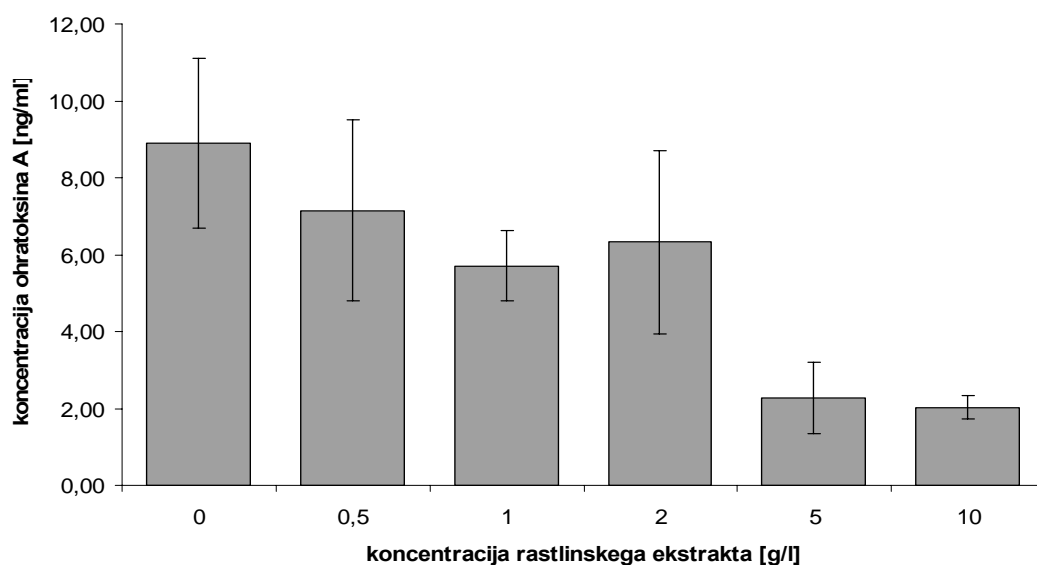
Slika 14: Koncentracija ohratoksina A po 13 dneh kultivacije plesni *Aspergillus westerdijkiae* v gojišču YES in YES z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka A ($T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečje vrednosti štirih ponovitev.

4.2.2 Koncentracija ohratoksina A v gojišču YES z dodatkom rastlinskega izvlečka B



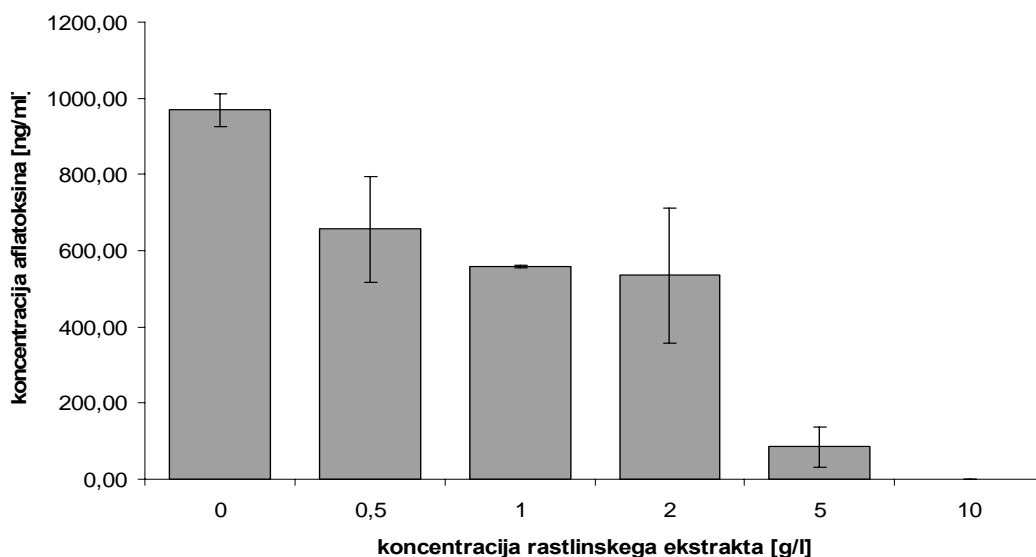
Slika 15: Koncentracija ohratoksina A po 13 dneh kultivacije plesni *Aspergillus westerdijkiae* v gojišču YES in YES z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka B (T = 28 °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečje vrednosti štirih ponovitev.

4.2.3 Koncentracija ohratoksina A v gojišču YES z dodatkom rastlinskega izvlečka C



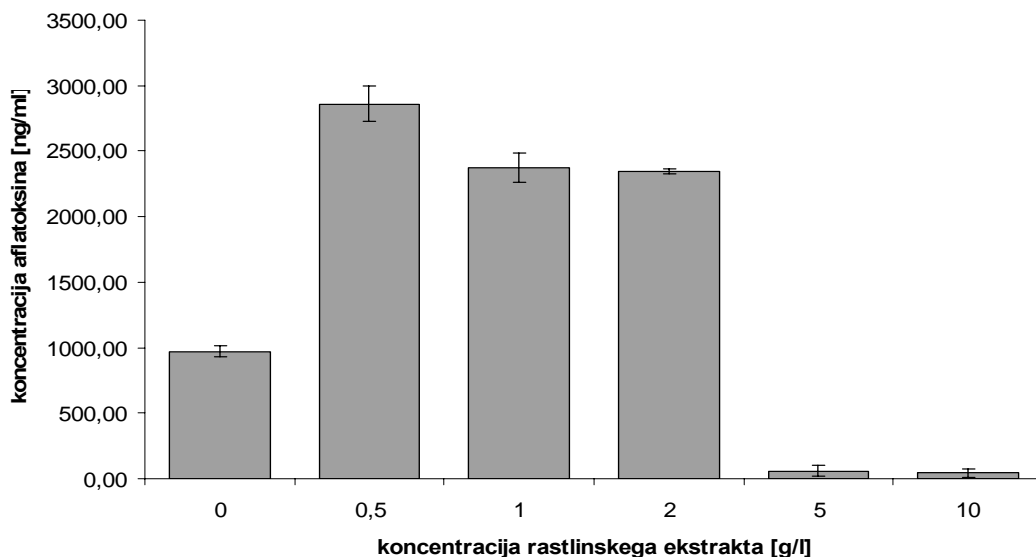
Slika 16: Koncentracija ohratoksina A po 13 dneh kultivacije plesni *Aspergillus westerdijkiae* v gojišču YES in YES z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka C (T = 28 °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečje vrednosti štirih ponovitev.

4.2.4 Koncentracija aflatoksina v gojišču CYA z dodatkom rastlinskega izvlečka A



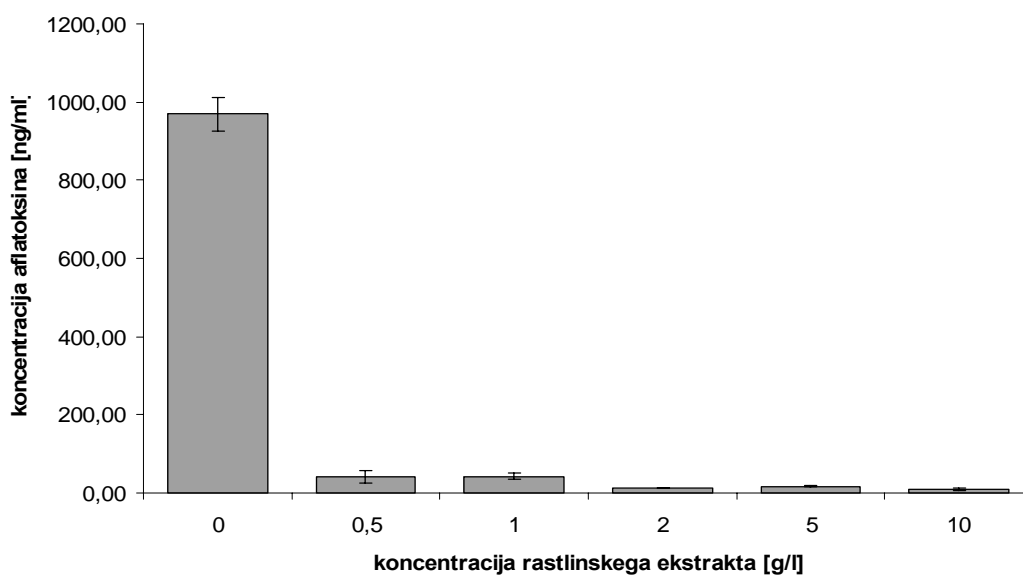
Slika 17: Koncentracija aflatoksina po 13 dneh kultivacije plesni *Aspergillus flavus* v gojišču CYA in CYA z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka A (T = 28 °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečje vrednosti štirih ponovitev.

4.2.5 Koncentracija aflatoksina v gojišču CYA z dodatkom rastlinskega izvlečka B



Slika 18: Koncentracija aflatoksina po 13 dneh kultivacije plesni *Aspergillus flavus* v gojišču CYA in CYA z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka B (T = 28 °C, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečje vrednosti dveh ponovitev.

4.2.6 Koncentracija aflatoksina v gojišču CYA z dodatkom rastlinskega izvlečka C



Slika 19: Koncentracija aflatoksina po 13 dneh kultivacije plesni *Aspergillus flavus* v gojišču CYA in CYA z različnimi koncentracijami rastlinskega izvlečka C ($T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, v temi). Rezultati so predstavljeni kot povprečje vrednosti štirih ponovitev.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Skladno z delovno hipotezo smo skušali dokazati, da dodatek rastlinskih ekstraktov vpliva na produkcijo mikotoksinov pri *Aspergillus flavus* – ZIM F070 in *Aspergillus westerdijkiae* – ZIM F068.

Med mikotoksini so zaradi svoje toksičnosti najbolj proučeni aflatoksini. Dobro so znani pogoji, ki so potrebni, da pride do produkcije aflatoksina pri plesnih *Aspergillus flavus* in *Aspergillus parasiticus*. Kacholz in Demain (1983) sta ugotovila, da na produkcijo aflatoksina pozitivno vplivajo amonijeve soli kot vir dušika. Nitrat kot vir dušika omogoča le rast plesni, ne omogoča pa produkcije aflatoksina. Tudi White in Johnson (1982) sta ugotovila povezavo med nitrifikacijo in produkcijo aflatoksinov pri *A. flavus*, in sicer nitrifikacija zaustavi nastajanje aflatoksinov. Prav tako so Orvehed in sod. (1988) ugotovili, da nitrat zavira produkcijo tudi drugih poliketidnih mikotoksinov. Ugotovljeno je tudi, da povečanje koncentracije nekaterih sladkorjev (glukoze, riboze, fruktoze, sorboze, manoze, maltoze in saharoze) pozitivno vpliva na metabolizem aflatoksinov (Abdollahi in Buchanan, 1981). Jayashree in Subramanyam (2000) pa sta ugotovila še en pomemben dejavnik, ki vpliva na produkcijo aflatoksinov. Ugotovila sta, da je oksidativni stres pogoj za nastanek aflatoksinov pri *A. parasiticus*. Ta ugotovitev potrjuje in razlaga starejše raziskave (Fanelli in sod., 1985; Velikonja in sod., 1987; Paster in sod., 1988), da spojine (sintetični antioksidanti butil hidroksi anisol – BHA, butil hidroksi toluen – BHT in drugi) za katere je bilo ugotovljeno antioksidativno delovanje, zavirajo tudi nastanek aflatoksinov. Zaradi antioksidativnega delovanja rastlinskih izvlečkov (Vaägi in sod., 2005; Ivanova in sod., 2005; Aruoma in sod. 1996; Ponce in sod., 2004; in drugi) in raziskav, na podlagi katerih je bilo ugotovljeno, da sintetični antioksidanti zavirajo produkcijo mikotoksinov, je smiselno raziskovati ali tudi rastlinski ekstrakti (kot naravni antioksidanti) zavirajo produkcijo mikotoksinov.

5.1 RAZPRAVA

Kljub temu, da se pri pridelavi hrane v uporabi mnogo sintetičnih fungicidov, je njihova varnost za zdravje človeka vprašljiva. Uporaba številnih rastlinskih ekstraktov bi lahko predstavljala alternativno pot za preprečevanje rasti plesni in produkcije mikotoksinov (Fan in Chen, 1999; Mahmoud 1999).

5.1.1 Določanje suhe biomase

Rast biomase smo spremljali s submerzno kultivacijo plesni v obdobju 15 dni (Slika 6 in Slika 10) in s tem pridobili podatke o rasti krivulji. Vzorce za določanje vpliva različnih koncentracij rastlinskih ekstraktov smo vzorčili 13. dan, saj takrat plesen že preide v fazo sporulacije in produkcije mikotoksinov (Soliman in Badeaa, 2002).

5.1.1.1 *Aspergillus westerdijkiae* – ZIM F068

Iz rezultatov o suhi biomasi, ki smo jih zbrali v 13. dnevu kultivacije, lahko sklepamo, da noben izmed izbranih rastlinskih ekstraktov pri izbranih koncentracijah ne vpliva inhibitorno na rast *A. westerdijkiae*. S tem smo izključili možnost, da je zmanjšana produkcija mikotoksinov posledica počasnejše rasti oziroma zmanjšanja biomase plesni.

Pri rastlinskem izvlečku A (slika 7) in rastlinskem izvlečku C (slika 9), nismo pri nobeni od testiranih koncentracij opazili zmanjšanja suhe biomase. Le pri dodajanju rastlinskega izvlečka B (slika 8) v gojišče smo opazili povečanje biomase glede na kontrolo.

5.1.1.2 *Aspergillus flavus* – ZIM F070

Iz rezultatov o suhi biomasi, ki smo jih zbrali v 13. dnevu kultivacije, lahko sklepamo, da noben izmed izbranih rastlinskih ekstraktov pri izbranih koncentracijah ne vpliva inhibitorno na rast *A. flavus*. S tem smo izključili možnost, da je zmanjšana produkcija mikotoksinov posledica počasnejše rasti oziroma zmanjšanja biomase plesni.

Pri rastlinskem izvlečku A (slika 11) nismo pri nobeni od testiranih koncentracij opazili zmanjšanja suhe biomase. Pri rastlinskem izvlečku C (slika 13) smo pri najvišji koncentraciji, to je pri 5 g/l zaznali zmanjšanje teže suhe biomase. Pri dodajanju rastlinskega izvlečka B (slika 12) v gojišče pa smo pri koncentracijah višjih, od 1 g/l, opazili povečanje teže suhe biomase, glede na kontrolo.

5.1.2 Določanje koncentracije mikotoksinov

5.1.2.1 Ohratoksin A

Koncentracijo ohratoksina smo določali z encimsko imunskim testom (ELISA) komplet I'screen OCHRA proizvajalca Tecna.

Pri merjenju koncentracije ohratoksina A smo opazili, da je pri dodajanju rastlinskih ekstraktov prišlo do zmanjšanja produkcije mikotoksina pri nitasti glivi *A. westerdijkiae*. Zmanjšano produkcijo mikotoksina je mogoče opaziti pri vseh treh rastlinskih ekstraktih (slika 14, 15 in 16), glede na kontrolo, v katero ni bilo dodanega nobenega rastlinskega ekstrakta.

5.1.2.2 Aflatoksin B1 in B2

Koncentracijo aflatoksina B1 in B2 smo določali z encimsko imunskim testom (ELISA) komplet Celer AFLA ELISA kit proizvajalca Tecna.

Pri merjenju koncentracije aflatoksina smo opazili, da je pri dodajanju rastlinskega izvlečka A in rastlinskega izvlečka C prišlo do zmanjšanja produkcije mikotoksina pri nitasti glivi *A. flavus*. Pri rastlinskem izvlečku A se je s povečevanjem koncentracije tega postopoma zmanjševala koncentracija aflatoksina. Pri dodajanju rastlinskega izvlečka C pa je že pri najmanjši koncentraciji, to je 0,5 g/l, prišlo do občutnega zmanjšanja koncentracije aflatoksina glede na kontrolo. V rastlinskem izvlečku C je verjetno spojina ali skupina spojin, ki aktivno delujejo na metabolizem aflatoksinov. Z izolacijo in identifikacijo te spojine oziroma skupine posameznih spojin v rastlinskem izvlečku C bi tako lahko proučevali regulatorne mehanizme biosinteze aflatoksinov.

Pri določanju koncentracije aflatoksinov je potrebno upoštevati, da so protitelesa anti-aflatoksin B1 navzkrižno reaktivna (po specifikacijah proizvajalca gre za 29,2 % navzkrižno reaktivnost) tudi z aflatoksinom B2 (Mycotoxins, 2005).

5.2 SKLEPI

- Dodatek rastlinskega izvlečka A pri testiranih koncentracijah ne vpliva na rast plesni *Aspergillus flavus* in *A. westerdijkiae*. Dodatek rastlinskega izvlečka pa inhibitorno vpliva na produkcijo izmerjenih mikotoksinov pri omenjenih plesnih.
- Dodatek rastlinskega izvlečka B pri testiranih koncentracijah pozitivno vpliva na rast plesni *A. flavus* in *A. westerdijkiae*. Dodatek rastlinskega izvlečka pri plesni *A. westerdijkiae* inhibitorno vpliva na produkcijo izmerjenega ohratoksina A, medtem ko pri *A. flavus* pride do izrazitega povečanja koncentracije izmerjenega aflatoksina B1.
- Dodatek rastlinskega izvlečka C pri testiranih koncentracijah ne vpliva na rast *A. flavus*, medtem ko pri *A. westerdijkiae* pride do manjšega povečanja biomase. S povečevanjem koncentracije rastlinskega izvlečka se pri *A. westerdijkiae* postopoma zmanjšuje koncentracija izmerjenega ohratoksina A. Pri *A. flavus* pa že pri najnižji koncentraciji rastlinskega izvlečka pride do občutnega padca produkcije izmerjenega aflatoksina B1.

6 POVZETEK

V zadnjem času smo med potrošniki živilske industrije priča povečanem povpraševanju po hrani brez umetnih konzervansov in po sveži hrani, ki bi bila minimalno tehnološko obdelana. Negativna lastnost takšnih izdelkov je hitrejša in večja pokvarljivost, kar predstavlja veliko nevarnost za zdravje potrošnikov. Plesni so ena izmed skupin kvarljivcev, ki so odgovorni za spreminjanje kvalitete, okusa in užitenosti hrane, zraven tega imajo nekatere vrste plesni sposobnost tvorjenja mikotoksinov. Mikotoksini so sekundarni metaboliti, ki jih tvorijo specifične vrste filamentoznih gliv. To so spojine, ki veljajo za zelo toksične, karcinogene in alergene, tako za človeka kot za živali. Prisotnost mikotoksina v surovinah živalske industrije in končnih produktih ima za posledico zdravstvene težave in veliko ekonomsko škodo. V nalogi smo želeli ugotoviti vpliv različnih rastlinskih ekstraktov (v besedilu rastlinski izvleček A, rastlinski izvleček B in rastlinski izvleček C) na rast in produkcijo mikotoksinov pri *Aspergillus flavus* – ZIM F070 in *Aspergillus westerdijkiae* – ZIM F068. V prvem delu poskusa smo ugotavljali vpliv rastlinskih ekstraktov na rast plesni. Organizma smo kultivirali v centrifugirkah (13 dni pri 28 °C), kamor smo dodali tekoče gojišče z rastlinskimi ekstrakti. Po končani kultivaciji smo odlili izrabljeno gojišče in micelij sušili. Stehtali smo tako pridobljeno suho biomaso. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da rastlinski ekstrakti pri testiranih koncentracijah ne zavirajo rasti *A. flavus* in *A. westerdijkiae*. V drugem delu poskusa smo določali koncentracijo aflatoksina B1 pri *A. flavus* in koncentracijo ohratoksina A pri *A. westerdijkiae*. Plesni smo gojili na trdnem gojišču, kateremu smo dodali rastlinske ekstrakte. Koncentracijo mikotoksinov smo določali po 13 dneh kultivacije s pomočjo encimsko imunskega testa (ELISA). Ugotovili smo, da rastlinski izvleček A in rastlinski izvleček C inhibitorno vplivata na produkcijo mikotoksinov pri testiranih plesnih. Rastlinski izvleček B pa inhibitorno vpliva na produkcijo ohratoksina A pri *A. westerdijkiae*, medtem ko pri *A. flavus* presenetljivo poveča koncentracijo aflatoksina B1.

7 VIRI

Abdollahi A., Buchanan R. L. 1981. Regulation of aflatoxin biosynthesis: Induction of aflatoxin production by various carbohydrates. *Journal of Food Science*, 46: 633-635

Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. Druga izdaja. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 27-89

Ahmed F. E. 2002. Detection of genetically modified organisms in food. *Trends in Biotechnology*, 20, 5: 215-233

Aruoma O. I., Spencer J. P. E., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J., Halliwell. B. 1996. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provencal herbs. *Food and Chemical Toxicology*, 34: 449-456

Atlas R.M. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, CRC Press, Inc.: 280-280, 538-538

Badei. A. Z. M. 1992. Antimycotic effect of cardamom essential oil against mycotoxigenic molds in relation to its chemical composition. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, 14: 177-182

Beardall J. M., Miller J. D. 1994. Disease in humans with mycotoxins as possible causes. V: *Mycotoxins in grains: compounds other than aflatoxin*. Miller J. D., Trenholm H. L. (eds.). Minnesota, Eagan Press: 487-539

Bennett J. W. 1987. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology. *Mycopathologia*, 100: 3-5

Bennett J. W., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 3: 497-516

Blount W. P. 1961. Turkey »X« disease. *Journal of the British Turkey Federation*, 9: 52, 55-58, 61, 77

Bressac B., Kew M., Wands J., Ozturk M. 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350: 429-431

Bullerman L. B. 2003. Mycotoxins. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglos P M. (eds.). Amsterdam, Elseviere Science: 4080-4108

Bunge I., Heller K., Roschenthaler R. 1979. Isolation and purification of ochratoxin A. *Zeitschrift fur Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*, 168: 457-458

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253

Bürker-Türk. 2008. Tokyo, The University of Tokyo, Faculty of medicine, Department of Biochemistry and Molecular biology.

http://biochem2.umin.jp/contents/Manuals/manual95/B_Turk_P.jpg (julij 2008): 1 str.

Chu F. S. 1974. Studies on ochratoxins. *Critical Reviews in Toxicology*, 2: 499-524

Cole R. J., Cox R. H. 1981. *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York. Academic Press: 960 str.

Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Communities*, L 77: 1-13

Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Official Journal of the European Communities*, L 23: 3-5

Coulombe R. A. 1993. Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76, 880-891

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 4: 564-582

Cullen J. M., Newberne P. N. 1994. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. V: The toxicity of aflatoxins. Human health, veterinary, and agricultural significance. Eaton D. L., Groopman J. J. (eds.). San Diego, Academic Press: 3-26

Davidson P. M., Harrison M. A. 2002. Resistance and adaption to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*, 56, 11: 69-78

Diener U. L., Cole R. J., Sanders T. H., Payne G. A., Lee L. S., Klich M.A. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 25: 249-270

Eaton D. L., Gallagher E. P. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34: 135-172

Eaton D. L., Groopman J. D. (eds.). 1994. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. San Diego, Academic Press: 544 str.

Fan J. J., Chen J. H. 1999. Inhibition of aflatoxin-producing by welsh onion extracts. *Journal of Food Protection*, 62: 414-417

Fanelli C., Fabbri A. A., Pieretti S., Finotti S., Passi S. S. 1985. Effect of different antioxidants and free radical scavengers on aflatoxin production. *Experientia*, 40: 191-193

FAO. 2004. *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. FAO Food and Nutrition Paper No. 81. Rome, Food and Agriculture Organization: 165 str.

Foster P. L., Eisenstadt E., Miller J. H. 1983. Base substitution mutations induced by metabolically activated aflatoxin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 2695-2698

Fujs Š. 2004. Metabolni odziv kvasovke *Kluyveromyces marxianus* na selen. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 59-64

Gilbert J., Anklam E. 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 6/7: 468-486

Goldblatt L. A. 1969. Aflatoxin – scientific background, control and implications, New York, Academic Press: 472 str.

Heathcote J. G., Hibbert J. R. 1978. Aflatoxins: chemical and biological aspects. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company: 212 str.

Ivanova D., Gerova D., Chervenkov T., Yankova T. 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96:145–150

James R. C. 1985. General principles of toxicology. V: Industrial toxicology. Williams P. L., Burson J. L. (eds.). New York, Van Nostrand Reinhold: 7-26

Jeršek B., Poklar Urlih N., Dekleva N., Sever D. 2004. Kemijski dejavniki tveganja v živilih in njihov nadzor. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi 2004, Radenci, 18-19 marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45-64

Juriševič Kahne B. 2005. Ohratoksin A v živilih rastlinskega izvora. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-63

Kacholz T., Demain A. L. 1983. Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. *Journal of Natural Products*, 11: 141-149

Klich M. A., Mullaney E. J., Daly C. B., Cary J. W. 2000. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *A. tamari* and *A. ochraceoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 605-609

Klich M. A., Pitt J. I. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society*, 91: 99-108

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.

Krska R., Welzik E., Boudra H. 2007. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 241-264

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

Lutz W. K., Jaggi W., Luthy J., Sagelsdorff P., Schlatter C. 1980. In vivo covalent binding of aflatoxin M1 to liver DNA of rat, mouse and pig. *Chemico-Biological Interactions*, 32: 249-256

Mahmoud A. L. E. 1999. Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extracts of some Egyptian plants. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 334-336

Marquardt R. R., Frohlich A. A. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science*, 70: 3968-3988

Meisner H., Meisner P. 1981. Ochratoxin A, an inhibitor of renal phosphoenolpyruvate carboxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 208: 146-151

Mycotoxins. 2005. Trieste, Tecna S.r.l. – Area Science Park (januar 2005)
[http://www.tecnalab.it/itproducts/level2eng\\$dir=12&struct=fields](http://www.tecnalab.it/itproducts/level2eng$dir=12&struct=fields) (julij 2008): 19 str.

Newberne P. M., Butler W. H. 1969. Acute and chronic effect of aflatoxin B1 on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Research*, 29: 236-250

Nguefack J., Leth V., Amvam Zollo P. H., Mathur S. B. 2004. Evulation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 329-334

Northolt M. D., Frisvald J. C., Samson, R. A. 1995. Occurence of food-borne fungi and factors for growth. V: Introduction to food-borne fungi. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvald J.C., Filtenborg O. (eds.). 4th ed. Barn, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 243-250

Orvehed M., Häggblom P., Söderhäll K. 1988. Nitrogen inhibition of mycotoxin production by *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2361-2364

Paster N., Juven B. J., Harshemesh H. 1988. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 64: 293-297

Peerse F. G., Linsell C. A. 1973. Dietary aflatoxins and human liver cancer – a population study based in Kenya. *British Journal of Cancer*, 27: 473-484

Peterson S. W., Ito Y., Horn B. W., Goto T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nominus*. *Mycologia*, 93: 689-703

Pfohl-Leszkowicz A., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I. N., Castegnaro M. 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: a review on aetiological causes and potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 19: 282-302

Pitt J. I. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 266-269

Pitt J. I. 2000. Toxicogenic fungi: which are important. *Medical Mycology*, 38: 17-22

Ponce A. G., del Vallea C. E., Roura S. I. 2004. Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 37: 199-204

Rahimtula A. D., Bereziat J. C., Bussacchini-Griot V., Bartsch H. 1988. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochemical Pharmacology*, 37: 4469-4475

Raj H. G., Prasanna H. R., Mage P. N., Lotlikar P. D. 1986. Effect of purified rat and hamster hepatic glutathione S-transferases on the microsome mediated binding of aflatoxin B1 to DNA. *Cancer Letters*, 33:1-9

Ren P., Ahearn D. G., Crow S. A. 1999. Comparative study of *Aspergillus* mycotoxin production on enriched media and construction material. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23: 209-213

Richard J. L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 3-10

Sanchez E., Heredia N., Garcia S. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 271-279

Soliman K. M., Badeaa R. I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1669-1675

Tarin A., Rosell M. G., Guardino X. 2004. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins aflatoxins and ochratoxin A. *Journal of Chromatography A*, 1047: 235-240

Uredba Komisije (ES), št. 1881/2006 z dne 19. decembra 2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih. *Uradni list Evropske Unije*, L 364: 5-24

Vaägi E., Rapavi E., Hadolin M., Vaäsaärhelyineä Pereädi K., Alaäzs A., Blaäzovics A., Simaändi B. 2005. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana*. Herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:17-21

Van der Merwe K. J., Steyne P. S., Fourie L. F., Scott D. B., Theron J. J. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205: 1112-1113

Van Egmond H. P. 1995. Mycotoxin in food: analysis, detection and legislation. V: Introduction to food-borne fungi. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvald J.C., Filtenborg O. (eds). 4th ed. Barn, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 261-269

Van Egmond H. P., Speijers G. J. A. 1994. Survey of data on the incidence and levels of ochratoxin A in food and animal feed worldwide. *Natural Toxins*, 3: 125-144

Velikonja J., Pupovac-Velikonja A., Dürriegl A. 1987. Culture of *Aspergillus parasiticus* in apple juice: II. The effect of butylhydroxyanisole (BHA) and butylhydroxytoluene (BHT) on fungal growth and aflatoxin biosynthesis. *Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*, 185: 223-226

White J. P., Johnson G. T. 1982. Aflatoxin production correlated with nitrification in *Aspergillus flavus* group species. *Mycologia*, 74: 718-723

ZAHVALA

Mentorju dr. prof. Petru Rasporju se zahvaljujem za vodenje in strokovne popravke pri izdelavi diplomskega dela.

Posebej bi se rad zahvalil somentorju dr. Janu Mavriju za strokovno vodenje, vso pomoč, potrpežljivost in veliko praktičnih nasvetov pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se dr. Poloni Jamnik za številne konstruktivne diskusije in vzpodbudo s katero mi je zelo pomagala pri nastanku diplomske naloge.

Zahvaljujem se dr. Sonji Smole Možina za hiter in temeljit pregled diplomskega dela ter opravljeno recenzijo.

Zahvaljujem se vsem sodelavcem Katedre za biotehnologijo za prijetno delovno vzdušje v katerem je moja diploma nastajala in zorela ter številne strokovne diskusije, ki so mi bile v veliko pomoč pri izdelavi pričujočega dela.

Predvsem pa se zahvaljujem svojim staršema, ki sta mi vsa študijska leta stala ob strani, tudi takrat, ko ni šlo vse po načrtih. Mama in oče hvala vama.

PRILOGE

Priloga A1: Povprečna vrednost suhe biomase v odvisnosti od časa kultivacije nitaste glive *Aspergillus westerdijkiae* (gojišče YES, T = 28 °C)

kultivacija [dni]	teža suhe biomase [g]	KV (%)
3	0,02 ± 0,01	35,17
6	0,05 ± 0,01	21,37
9	0,10 ± 0,03	30,72
11	0,11 ± 0,02	13,82
13	0,13 ± 0,03	23,57
15	0,16 ± 0,02	10,65

Priloga A2: Povprečna vrednost suhe biomase nitaste glive *Aspergillus westerdijkiae* v odvisnosti od koncentracije rastlinskega ekstrakta v gojišču (gojišče YES, T = 28 °C, t = 13 dni)

koncentracija rastlinskega ekstrakta v gojišču [g/l]		teža suhe biomase [g]	KV (%)
kontrola	0	0,10 ± 0,02	15,39
rastlinski izvleček A	0,5	0,12 ± 0,08	5,15
	1	0,14 ± 0,05	8,90
	2	0,11 ± 0,01	3,32
	5	0,14 ± 0,02	18,33
rastlinski izvleček B	0,5	0,20 ± 0,02	14,67
	1	0,15 ± 0,07	11,41
	2	0,18 ± 0,08	18,85
	5	0,26 ± 0,07	35,82
rastlinski izvleček C	0,5	0,17 ± 0,03	6,70
	1	0,16 ± 0,05	10,82
	2	0,16 ± 0,04	9,49
	5	0,18 ± 0,06	26,47

Priloga A3: Povprečna vrednost koncentracije ohratoksina A v odvisnosti od koncentracije rastlinskega ekstrakta v gojišču (gojišče YES, T = 28 °C, t = 13 dni)

koncentracija rastlinskega ekstrakta v gojišču [g/l]		koncentracija ohratoksina A [ng/ml]		KV (%)	t-test
kontrola	0	8,90 ±	2,22	24,99	
rastlinski izvleček A	1	6,40 ±	0,31	4,85	0,05
	2	7,13 ±	2,39	33,51	0,23
	5	5,25 ±	1,49	28,41	0,02^a
rastlinski izvleček B	0,5	4,52 ±	0,95	20,98	0,00^a
	1	4,18 ±	0,37	8,80	0,00^a
	2	6,38 ±	0,30	4,69	0,17
	5	0,51 ±	0,05	10,76	0,00^a
	10	0,59 ±	0,19	32,67	0,00^a
rastlinski izvleček C	0,5	7,15 ±	2,34	32,68	0,24
	1	5,71 ±	0,91	16,01	0,02^a
	2	6,33 ±	2,39	37,81	0,09
	5	2,28 ±	0,92	40,33	0,00^a
	10	2,02 ±	0,31	15,25	0,00^a

^astatistično značilna razlika: $p < 0,05$

Priloga B1: Povprečna vrednost suhe biomase v odvisnosti od časa kultivacije nitaste glive *Aspergillus flavus* (gojišče CY, T = 28 °C)

kultivacija [dni]	teža suhe biomase [g]	KV (%)
3	0,03 ± 0,01	23,67
4	0,04 ± 0,01	26,85
6	0,07 ± 0,02	33,63
9	0,09 ± 0,01	8,01
11	0,10 ± 0,01	14,62
13	0,10 ± 0,02	15,39
15	0,10 ± 0,02	16,03

Priloga B2: Povprečna vrednost suhe biomase nitaste glive *Aspergillus flavus* v odvisnosti od koncentracije rastlinskega ekstrakta v gojišču (gojišče CY, T = 28 °C, t = 13 dni)

koncentracija rastlinskega ekstrakta v gojišču [g/l]		teža suhe biomase [g]	KV (%)
kontrola	0	0,10 ± 0,02	15,39
rastlinski izvleček A	0,5	0,10 ± 0,00	5,15
	1	0,10 ± 0,01	8,90
	2	0,11 ± 0,00	3,32
	5	0,12 ± 0,02	18,33
rastlinski izvleček B	0,5	0,10 ± 0,01	14,67
	1	0,12 ± 0,01	11,41
	2	0,14 ± 0,03	18,85
	5	0,14 ± 0,05	35,82
rastlinski izvleček C	0,5	0,10 ± 0,01	6,70
	1	0,11 ± 0,01	10,82
	2	0,11 ± 0,01	9,49
	5	0,09 ± 0,02	26,47

Priloga B3: Povprečna vrednost koncentracije aflatoksina v odvisnosti od koncentracije rastlinskega ekstrakta v gojišču (gojišče CYA, T = 28 °C, t = 13 dni)

koncentracija rastlinskega ekstrakta v gojišču [g/l]		koncentracija aflatoksina [ng/ml]		KV (%)	t-test
kontrola		969,36 ± 42,47		4,38	
rastlinski izvleček A	0,5	655,90 ± 138,57		21,13	0,00^a
	1	558,17 ± 4,33		0,78	0,00^a
	2	535,79 ± 177,14		33,06	0,00^a
	5	85,15 ± 53,46		62,79	0,00^a
rastlinski izvleček A	0,5	2859,97 ± 135,66		4,74	0,00^a
	1	2374,38 ± 115,06		4,85	0,00^a
	2	2348,10 ± 20,29		0,86	0,00^a
	5	60,48 ± 45,22		74,78	0,00^a
	10	43,04 ± 35,03		81,38	0,00^a
rastlinski izvleček A	0,5	41,14 ± 16,66		40,50	0,00^a
	1	43,06 ± 8,84		20,54	0,00^a
	2	12,21 ± 0,46		3,79	0,00^a
	5	16,69 ± 0,96		5,75	0,00^a
	10	9,33 ± 2,57		27,51	0,00^a

^astatistično značilna razlika: $p < 0,05$

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marko BLAŽIČ

**VPLIV RASTLINSKIH EKSTRAKTOV NA
PRODUKCIJO MIKOTOKSINOV PRI NITASTIH
GLIVAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008