Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

Četvrti simpozijum o mikotoksinima, Sarajevo, 14 juni 1991

Ožegović, Ladislav (urednik)

1996.

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/handle/123456789/824

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE
SPECIJALNA IZDANJA
VOL. CIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Vol. 17

ČETVRTI SIMPOZIJUM O MIKOTOKSINIMA

(Sarajevo, 14 Juni 1991)

SARAJEVO 1996

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

SPECIJALNA IZDANJA
VOL. CIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Vol. 17

ČETVRTI SIMPOZIJUM O MIKOTOKSINIMA

(Sarajevo, 14 Juni 1991)

Redakcioni odbor
Seid Huković, Ladislav Ožegović, Džemal Rezaković

Glavni urednik
Ladislav Ožegović
Redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO 1996

ACADEMY OF SCIENCES AND ARTS
OF BOSNIA AND HERZEGOVINA

SPECIAL PUBLICATIONS
VOL. CIII

Department of Medical Sciences
Vol. 17

FOURTH SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS

(Sarajevo, June 14th 1991)

Editorial Board
Seid Huković, Ladislav Ožegović, Džemal Rezaković

Editor
Ladislav Ožegović
Member of the Academy of Sciences and Arts
of Bosnia and Herzegovina

SARAJEVO 1996

ANU
BiH
АНУ
БиХ

U ustaljenoj izdavačkoj djelatnosti ANUBIH ova publikacija se trebala pojaviti u 1992. godini; svi radovi i prilozi su predani na vrijeme i prve otiske pripremljene za objavljivanje imali smo već u rano proljeće 1992. Nažalost, rat u BiH odrazio se i na aktivnosti kod izdavanja, kad su pojedini radovi dijelom ili u cjelini bili izgubljeni. Zahvaljujući saradnji s autorima uspjeli smo kompletirati sadržaj simpozijuma, s izuzetkom jednog priloga, te ih prezentiramo stručnoj javnosti na ocjenu. Na taj način Medicinsko Odjeljenje ANUBIH nastavlja kontinuitet svoje aktivnosti na istraživanjima mikotoksikoza.

Izdavački odbor
Sarajevo 1996.

ANU
ВіН
АНУ
БиХ

SADRŽAJ

UVODNO IZLAGANJE (*Seid Huković*) 5

Zoran Mašić, Mihajlo Mrđen, Sava Pavkov, Željko Mihaljev, Milić Arsenijević

Rezultati pregleda stočnih hraniva iz uvoza na prisustvo aflatoksina, ohratoksina A, zearalenona i trihotecenskih mikotoksina / The Results of Examinations of Imported Feed on the Presence of Aflatoxin, Ochratoxin A, Zearalenone and Trichothecene Mycotoxins 9

Aleksandra Bočarov-Stančić, Marija Škrinjar, Tihomir Stojsavljević, Đula Nađ, Tereza Odadžić

Kontaminacija zrna kukuruza (rod 1990) toksikogenim plesnima i mikotoksinima (aflatoksinom B_1, ohratoksinom A i zearalenonom) / Contamination of Corn Kernels (1990 Crop) with Toxigenic Molds and Mycotoxins (Aflatoxin B_1, Ochratoxin A and Zearalenone) 13

Predrag Radošević, N. Dogović

Određivanje T-2 toksina i njegovih hidrolitičkih metabolita u serumu metodom gasne hromatografije — masene spektrometrije / Determination of T-2 Toxin and Its Hydrolitic Metabolites in Serum by Gas Chromatography—Mass Spectrometry 23

Zvonka Kabaj-Tomšič, Anton Vengušt, Janko Žust, Uroš Pestevšek

Simultana detekcija DON, DAS, T-2 toksina i njihovih metabolita u kukuruzu / Simultaneous Detection of DON, DAS and T-2 Toxin and Their Metabolites in Maize 31

Zdenka Cvetnić i Stjepan Pepeljnjak

Učestalost i toksikogenost sojeva *Aspergillus versicolor* na području Republike Hrvatske / Frequency and Toxicogenicity of *Aspergillus versicolor* Strains on the Area of Republic Croatia 41

Marija Šutić i Milena Nikolić

Pojava znatnih količina aflatoksina M_1 u hloroformskom ekstraktu KES supstrata nakon kultivacije plesni *Aspergillus flavus* MP_1 / Production of Significant Quantities of Aflatoxin M_1 in Chloroform Extracts in Yeasts Substrate by *Asp. flavus* MP_1 Strain Cultivation 53

Sonja Duletić

Neki efekti T-2 toksina na *rec* mutante *Escherichia coli* / Some T-2 Toxin Effects on *rec* Mutants of *Escherichia coli* 59

ANU ВІН АНУ БиХ

Šandor Š. Tobiaš, Isidor Rajić

Uticaj T-2 toksina na zdravlje kokošaka, nosivost i inkubaciju jaja / The Effect of T-2 Toxin on Health, Egg Production And Egg Incubation in Laying Hens 69

S. Topolko, M. Žurić, Miroslava Munk i Vera Auslender-Ujević

Eksperimentalna intoksikacija kunića mikotoksinom T-2 / Experimental Rabbits Intoxication with T-2 Mycotoxin 77

Aleksandra Bočarov-Stančić, P. Radošević i J. Božo

Uporedivanje dva različita postupka ekstrakcije T-2 toksina iz tečne fermentacione podloge upotrebljene za kultivaciju toksikogenih fusaria / Comparison of Two Different Extraction Methods for T-2 Toxin from Liquid Fermentation Medium Used for Toxicogenic Fusaria Cultivation 87

Zoran Mašić, Isidor Rajić, Sava Pavkov, Mihajlo Mrđen

Rezultati pregleda mokraće i fecesa svinja na prisustvo ohratoksina A / The Results of Pigs Urine and Faeces Examinations on the Presence of Ochratoxin A 93

Seid Huković i Nedim Huković

Djelovanje zearalenona na humanom izoliranom ureteru / The Effect of Zearalenone on the Isolated Human Ureter 97

Nedim Huković

Uticaj zearalenona na glatkomišićne organe genito-urinarnog trakta in vitro / The Effect of Zearalenone on the Smooth Muscle of the Organs of Genito-Urinary System in Vitro 101

Ljerka Babić, Jojin Ivetić, Ladislav Ožegović, Nejra Bajramović

Djelovanje zearalenona na adren štakora — histološke promjene / Effects of Zearalenone on the Adren in Rat—Histological Changes 107

Isidor Rajić, Dragan Trajković

Uticaj zeolita dodanog u hranu kontaminiranu zearalenonom i ohratoksinom A na rezultate prašenja krmača / Effect of Zeolyte Added to Feed Contaminated with Ochratoxin A and Zearalenone on the Results of Sows Farrowing 117

Ladislav Ožegović, Stjepan Feldhofer, Dragan Hlubna

Fungicidni i detoksikacioni efekat UBEA 70 na zearalenon i plijesni u kukuruzu / Fungicidal and Detoxificative Effects of UBEA 70 on the Molds and Zearalenone in Contaminated Corn 123

UVODNO IZLAGANJE

Želim vam uspješan rad i boravak u ANUBiH. Ovo je Četvrti simpozij koji se organizira u našoj ANU, a glavni je organizator naš uvaženi akademik Ladislav Ožegović. Kolegi Ožegoviću upućujemo zahvalnost za veliko angažovanje u organizaciji ovih simpozija, koji se uspješno završavaju korisnim zbornicima radova.

Svima vama je poznato da mikotoksini zauzimaju sve veći značaj u nauci, privredi i zdravstvenoj zaštiti. Danas postoje dva stava u vezi sa važnošću mikotoksina. Jedan je da se minimizira značaj mikotoksina, dok je drugi mnogo ozbiljniji - da se mikotoksinima mora posvetiti daleko veća pažnja. Treba se složiti sa H e s s e l t i n e o m (1986) da postoje tri glavna područja interesa kada se govori o mikotoksinima.

Prvo područje je kontekst sa hranom. Gubici hrane su znatni, uzevši globalno, a postoje područja gdje su gubici zabrinjavajući. Drugo područje interesa za mikotoksine je njihov uticaj na imuni sistem životinja i ljudi. Radi se o supresiji imunog sistema. Treći aspekt je zabrinutost zbog djelovanja mikotoksina na ljudsko zdravlje. Medicinari još nisu dovoljno svjesni njihovog patološkog djelovanja. Veliki broj kroničnih obolenja se može dovesti u vezu sa mikotoksinima.

Za razliku od bakterijalnih toksina, koji djeluju brzo, mikotoksini obično djeluju sa latencijom. Zabilježene su epidemije, osim onih poznatih kao što je ergotizam, poput dermatoza uzrokovanih psoralenom, alimentarnih toksičkih aleukija, akutnih aflatoksinskih trovanja u Indiji, Akakabibyo bolesti, zatim se povezuju sa mikotoksinima bolesti kao što je naša nefropatija, Reyov sindrom, Kašin-Back u Sibiru, poliurija u Indiji, beri-beri u Japanu i niz drugih oboljenja.

Postoji više područja koja treba naučnoistraživački obrađivati, a to su: mikologija i taksonomija plijesni, ekologija, tj. uzajamno djelovanje funga i okoline, esej za ispitivanje djelovanja mikotoksina, analitički metod, toksikologija, mikotoksikoze kod životinja, detoksifikacija, biohemizam i ekonomija. Razgovarajući sa akademikom Ožegovićem, mi smo se složili da predložimo da se naša akademija, zapravo njen biomedicinski centar, posveti istraživanju mikotoksina.

Ponovo vam želim uspješan rad i boravak na ovom našem četvrtom sastanku o mikotoksinima.

Seid HUKOVIĆ

ANU
ВіН
АНУ
БиХ

PRILOZI

ANU
BiH
АНУ
БиХ

ANU
ВіН
АНУ
БиХ

REZULTATI PREGLEDA STOČNIH HRANIVA IZ UVOZA NA PRISUSTVO AFLATOKSINA, OHRATOKSINA A, ZEARALENONA I TRIHOTECENSKIH MIKOTOKSINA

ZORAN MAŠIĆ, MIHAJLO MRĐEN, SAVA PAVKOV, ŽELJKO MIHALJEV, MILIĆ ARSENIJEVIĆ

Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad

Apstrakt. Prikazani su rezultati ispitivanja prisustva mikotoksina u stočnim hranivima uveženim u R. Srbiju. Ukupno je ispitano ribljeg brašna 207 uzoraka, kukuruza u zrnu 26, stočnog ječma 9, premiksa za svinje 15, mleka u prahu 2 i gotove hrane za pse 7 uzoraka. Bakteriološka neispravnost, zbog povećane kontaminacije plesnima, utvrđena je u 14 uzoraka, što čini 5,26% od ukupno ispitanih uzoraka. Aflatoksin B_1 i G_1 utvrđeni su u 3 uzorka, ohratoksin A u 7 uzoraka, zearalenon u 5 i trihotecenski mikotoksini u 2 uzorka.

Prisustvo mikotoksina, sekundarnih metabolita plesni u stočnim hranivima i kompletnim krmnim smešama opisano je u mnogim radovima naših i stranih autora.

Cilj ovog rada je prikaz polugodišnjih ispitivanja na prisustvo mikotoksina, raznih stočnih hraniva uveženih u R. Srbiju. Ispitivanja su izvršena u skladu sa Uredbom o zdravstvenoj ispravnosti stočnih hraniva iz uvoza, a prema Pravilniku o maksimalnim količinama štetnih materija i sastojaka u stočnoj hrani.

MATERIJAL I METOD RADA

Uzorkovanje ispitivanih hraniva vršile su nadležne veterinarske inspekcije na graničnim prelazima ili kod krajnjih korisnika. Određivanje mikotoksina izvršeno je metodom po B a l z e r u i sar. (2), a određivanje trihotecenskih mikotoksina izvršeno je kožnim testom na kunićima i zamorcima.

Tabela 1. PRIKAZ REZULTATA ISPITIVANJA STOČNIH HRANIVA NA PRISUSTVO AFLATOKSINA B_1, B_2, G_1, G_2, OHRATOKSINA A, ZEARALENONA I TRIHOTECENSKIH MIKOTOKSINA

Naziv hraniva	Broj uzoraka	aflatoksini mg/kg						ohratoksin A mg/kg		zearalenon mg/kg		trihoteceni
		B_1		B_2	G_1		G_2					
		n-+/%	conc.		n-+/%	conc.		n-+/%	conc.	n-+/%	conc.	n-+/%
Riblje brašno	207	1-0,48	0,040	-	1-0,48	0,020	-	4-1,93	0,035	-	-	-
Kukuruz u zrnu	26	1-3,85	0,025	-	1-3,85	0,035	-	2-7,69	0,048	3-11,54	0,32	2-7,69
Stočni ječam	9	-	-	-	-	-	-	1-11,10	0,080	1-11,10	0,45	-
Premiks za svinje	15	-	-	-	-	-	-	-	-	1-6,67	0,25	-
Mleko u prahu	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kompletna hrana za pse	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ANU BiH АНУ БиХ

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 1.

Stočna hraniva su poticala iz Južne Amerike (riblje brašno), SAD (kukuruz), Austrije (ječam i premiks za svinje), Rumunije (ječam), Švajcarske (mleko u prahu) i Francuske (hrana za pse).

Svi uzorci stočnih hraniva pregledani su bakteriološki i mikološki. Mikološka neispravnost utvrđena je kod 8 uzoraka ribljeg brašna, 4 uzorka kukuruza, 1 uzorka stočnog ječma i 1 uzorka premiksa za svinje. Mikološku floru činile su plesni iz roda Aspergillus, Fusarium, Penicillium i Rhizopus.

Iz prikazane tabele se uočava da su aflatoksini B_1 i G_1 utvrđeni u 2 uzorka ribljeg brašna i 1 uzorku kukuruza u zrnu, ohratoksin A utvrđen je u uzorcima ribljeg brašna (4), kukuruza u zrnu (2) i stočnog ječma (1). Zearalenon je utvrđen u uzorcima kukuruza (3), stočnog ječma (1) i u jednom uzorku premiksa za svinje, trihotecenski mikotoksini utvrđeni su u 2 uzorka kukuruza u zrnu. Od ukupno ispitanih 266 uzoraka stočne hrane, mikotoksini su utvrđeni u 17 uzoraka, što čini 6,39%. Utvrđene koncentracije mikotoksina su ispod dozvoljenih granica utvrđenih Pravilnikom o maksimalnim količinama štetnih materija i sastojaka u stočnoj hrani.

ZAKLJUČAK

Uvežena stočna hrana u R. Srbiji u periodu novembar 1990-april 1991. godine bila je mikotoksikološki ispravna. Neupotrebljivim za ishranu životinja, zbog povećane kontaminacije plesnima, proglašeno je 160 tona ribljeg brašna (8 pozitivnih uzoraka), 120 tona kukuruza u zrnu (4 uzorka pozitivna) i 30 tona ječma i 5 tona premiksa za svinje (po 1 uzorak pozitivan). Stočna hraniva kontaminirana plesnima osposobljena su za ishranu životinja termičkim tretiranjem ili tretiranjem mikostatičkim sredstvima.

THE RESULTS OF EXAMINATIONS OF IMPORTED FEED ON THE PRESENCE OF AFLATOXIN, OCHRATOXIN A, ZEARALENONE AND TRICHOTHECENE MYCOTOXINS

S u m m a r y

There were examined in all 207 samples of fish meal, 26 of corn grains, 9 of barley, 15 of swine premixes, 2 of milk-powder and 7 ready to use dog feed. Bacteriological unfitness, in due course of moldy contamination was determined in 14 samples (5,26% of examined samples). Aflatoxin B_1 and aflatoxin G_1 were determined in 3 samples, ochratoxin A in 7 samples, zearalenone in 5 samples and trichothecene mycotoxins in 2 samples.

LITERATURA

(1) Balzer I., Bogdanić Č., Mužić S. (1976): *Natural contamination of corn with mycotoxins in Yugoslavia.* III IUPAC, Paris, Abstract 2.

(2) Balzer I., Bogdanić Č., Pepeljnjak S. (1978): *Rapid thin layer chromatographic method for determining aflatoksin, ohratoksin A and zearalenone in corn.* J. Ass. off Anal. chem. 61, (3), 584-585.

(3) Hlubna D., Ožegović L. (1986): *Rezultati istraživanja mikotoksina (aflatoksina B_1, ohratoksina A i zearalenona) u Bosni i Hercegovini*, Simpozijum o mikotoksinima, ANUBiH, Posebna izd., knjiga LXXX, Odjeljenje med.nauka, knjiga 12, 65-69.

(4) Kordić B., Panin M., Kandić S., Lončarević A., Muntañola-Cvetković (1986): *Rezultati višegodišnjeg mikrobiološkog i mikotoksikološkog istraživanja stočne hrane u SR Srbiji.* Simpozijum o mikotoksinima, ANUBiH, Posebna izd., knjiga LXXX, Odjeljenje med. nauka, knjiga 12, 17-28.

(5) Klemenc N., Žust J., Vengušt A., Vospernik P. (1986): *Etiologija mikotoksikoza kod domaćih životinja u Sloveniji.* Simpozijum o mikotoksinima, ANUBiH, Posebna izd., knjiga LXXX, Odjeljenje med. nauka, knjiga 12, 43-50.

(6) Mašić Z., Mrđen M., Pavkov S. (1988): *Prikaz rezultata pregleda biljnih i animalnih hraniva koja se koriste za ishranu ljudi i životinja, na prisustvo aflatoksina B_1, ohratoksina A i zearalenona.* Zbornik radova XXX naučnog sastanka mikrobiologa, epidemiologa i infektologa Jugoslavije, Pula, 6-11. 06.1988, 50-51.

(7) Pepeljnjak S., Cvetnić Z. (1986): *Mikološka i mikotoksikološka kontaminacija žitarica na širem anefropatičnom području SR Hrvatske.* Simpozijum o mikotoksinima ANUBiH, Posebna izd., knjiga LXXX, Odjeljenje med.nauka, knjiga 12, 29-41.

(8) Škrinjar M., Vujičić I., Stubblefield R., Jurić V., Mašić Z. (1989): *Zastupljenost aflatoksina B_1 u stočnoj hrani u Vojvodini.* Simpozijum o mikotoksinima. Posebna izd., knjiga LXXXIX, Odjeljenje med. nauka, knjiga 14, 119-129.

(9) Škrinjar M., Vujičić I., Stubblefield R., Jurić V., Stojanović E., Mašić Z. (1989): *Kontaminacija hraniva ohratoksinom A u Vojvodini.* Simpozijum o mikotoksinima, Posebna izd., knjiga LXXXIX, Odjeljenje med. nauka, knjiga 14, 171-179.

KONTAMINACIJA ZRNA KUKURUZA (ROD 1990) TOKSIKOGENIM PLESNIMA I MIKOTOKSINIMA (AFLATOKSINOM B_1, OHRATOKSINOM A I ZEARALENONOM)

ALEKSANDRA BOČAROV-STANČIĆ, MARIJA ŠKRINJAR, TIHOMIR STOJSAVLJEVIĆ, ĐULA NAĐ, TEREZA ODADŽIĆ

Tehnološki institut, "Servo Mihalj", Zrenjanin
Tehnološki fakultet, Novi Sad

Apstrakt. Mikološka i mikotoksikološka istraživanja su izvršena kod 27 uzoraka zrna kukuruza (rod 1990). S izuzetkom dva uvezena iz Afrike i Amerike, svi ostali uzorci su bili poreklom iz Bačke i Banata (SAP Vojvodina). Determinacija mikotoksina (aflatoksina B_1, ohratoksina A i zearalenona) je izvršena multimikotoksinskom metodom B a l z e r a i sar. (1978). Mikološka istraživanja su pokazala dominaciju predstavnika roda Fusarium (50-100% kontaminiranih uzoraka), s *F. moniliforme var. subglutinans* kao najčešćom vrstom. Penicillium spp. (8 determinisanih predstavnika) bio je uočen kod 10-100% kontaminiranih uzoraka; *P. verrucosum var. cyclopium* je bio najzastupljenija vrsta. Nešto niža je bila zagađenost zrna kukuruza aspergillima (20-50%). Mikotoksikološka istraživanja su pokazala odsustvo kontaminacije ohratoksinom A. Kod 10% ispitanih uzoraka iz Vojvodine utvrđeno je prisustvo aflatoksina B_1 (0,0125 mg/kg) i, nešto češće, zearalenona (20% uzoraka; 1,5-10 mg/kg).

UVOD

Tokom više godina bilo je uobičajeno verovanje da je proizvodnja mikotoksina sporadična pojava i da nije blisko povezana s gljivičnim toksinima (F r i s v a d, 1988). Dato verovanje je bilo bazirano na sledećim problemima: a) određeni mikotoksin ne produkuju svi izolati iste vrste; b) taksonomski veoma udaljene vrste mogu da biosintetišu isti mikotoksin; c) mnoge korelacije između gljivičnog taksona i mikotoksina su bile bazirane na pogrešnoj identifikaciji plesni i mikotoksina. Prvi slučaj je pre izuzetak nego pravilo, jer, prema genetičkim istraživanjima nekih autora (B e n n e t t i D e u t s c h, 1986), sojevi *Aspergillus flavus* neproducenti aflatoksina B_1 ipak sadrže odgovarajuće gene za dati mikotoksin. S druge strane, proizvodnja istog mikotoksina nije uvek indikacija taksonomske povezanosti, jer

biosintetski putevi istog sekundarnog metabolita mogu biti fundamentalno različiti (Harborne, 1980).

Skoro sve plesni koje su prisutne na hrani i hranivima su potencijalni producenti mikotoksina u čistoj kulturi na laboratorijskim podlogama. Jer, sekundarni metaboliti plesni su od velikog značaja s obzirom da štite njihov genom od drugih mikroba, insekata i ostalih životinja (Janzen, 1977). Na sreću, prisustvo određene plesni ne znači samo po sebi i prisustvo specifičnog mikotoksina i obrnuto: moguće je utvrditi kontaminaciju određenim mikotoksinom, ali ne i plesni producentom.

Shodno tome, cilj ovog istraživanja je bila determinacija ne samo prisustva mikotoksina (aflatoksina B_1, ohratoksina A i zearalenona) nego i najvažnijih rodova plesni potencijalnih producenata mikotoksina.

MATERIJAL I METODE

Uzorci. Ispitivanjem je bilo obuhvaćeno 27 uzoraka zrna kukuruza otkupljenih za potrebe Industrije prerađevina od kukuruza "IPOK", Zrenjanin. Od toga analizirano je: a) 5 čistih hibrida (NSSC-410, 607 i ZPSC-449, 539, 667) vlažnosti zrna od 35,5-41%; b) 10 prosečnih uzoraka prirodno sušenog kukuruza primljenog u IPOK, vlažnosti zrna od 25-29,5%; c) 10 prosečnih uzoraka veštački sušenog kukuruza datog na preradu u IPOK, vlažnosti zrna od 14-15,5%, i d) 2 uzorka uvezena iz Afrike i Amerike. Sa izuzetkom poslednje kategorije, svi ostali uzorci su bili poreklom iz regiona Banata i Bačke (SAP Vojvodina).

Mikološke analize. Određivanje ukupnog broja plesni je završeno po *Sl. listu SFRJ* (1980) zasejavanjem odgovarajućih razređenja na Sabouraud agar i inkubiranjem na 28°C. Prilikom identifikacije plesni iz rodova Aspergillus i Penicillium korišćen je i Czapek agar, odnosno krompir-saharozni agar u slučaju fusaria. Determinacija gljivičnih izolata je izvršena na osnovu njihovih makroskopskih i mikroskopskih karakteristika (preparati pravljeni laktofenolom ili vodom), i to prema sledećim autorima: Raper i Fennell (1965), Samson 1979) za Aspergillus; Booth (1971) za Fusarium; Raper i Thom (1949), Samson i sar. (1976) za Penicillium; i Samson i van Reenen-Hoekstra (1988) za sve ostale rodove plesni.

Mikotoksikološke analize. BGYF-test (Bright greenish-yellow fluorescens = jasno zelenkasto-žuta fluorescencija) pomoću U.V. zraka (366 nm) prema Shotwell i sar. (1974) je upotrebljen kao preliminarno ispitivanje. Hemijska determinacija mikotoksina je izvršena po multitoksinskoj metodi (Balzer i sar., 1978).

REZULTATI I DISKUSIJA

Mikološke analize

Zrno kukuruza (rod 1990) bilo je inficirano sa deset rodova plesni (tabela 1).

Tabela 1. KONTAMINACIJA ZRNA KUKURUZA (rod 1990)

Br.	Rod plesni	ČISTI HIBRIDI		PRIRODNO SUŠEN		VEŠTAČKI SUŠEN		IZ UVOZA	
		A	B	A	B	A	B	A	B
1	Acremonium	60	3	70	3	60	4	-	-
2	Alternaria	20	1	20	1	30	1	-	-
3	Aspergillus	40	1	50	1	20	4	50	1
4	Cladosporium	60	2	60	3	40	4	-	-
5	Epicoccum	20	1	20	1	10	1	-	9
6	Fusarium	100	4	80	5	50	5	100	9
7	Mucor	40	10	50	5	20	2	-	-
8	Penicillium	100	3	10	5	60	4	100	1
9	Rhizopus	20	10	-	-	-	-	-	-
10	Ulocladium	-	-	-	-	10	1	-	-
	Ukupan broj plesni po 1 g ($\overline{X}$)	280.000		220.000		110.000		150.000	

A = procenat kontaminiranih uzoraka
B = intenzitet kontaminacije (1-10)

Ako se uporede identifikovane vrste izolovane sa zrna kukuruza tokom našeg istraživanja sa rezultatima drugih autora (Kordić i sar., 1979; Muntaño-la-Cvetković i Borisavljević 1979; Kordić i sar., 1986; Pepeljnjak i Cvetnić, 1986), uočava se u ovom slučaju dominantnost predstavnika Fusarium. U zavisnosti od kategorije uzoraka procenat kontaminacije ovim rodom plesni se kretao od 50-100% (tabela 1). Od šest identifikovanih vrsta (tabela 2), najčešće je utvrđena *F. moniliforme var. subglutinans Wollenw. i Reinking* kod sva tri tipa uzoraka iz regiona Vojvodine. Dobijeni rezultat je u delimičnoj saglasnosti sa istraživanjima Marića i Panin (1963) o učestalosti fusaria u Vojvodini. Druga, po njima, najzastupljenija vrsta *F. moniliforme Sheldon* nije detektovana, osim kod dva uvezena uzorka zrna kukuruza. Istaknuto mjesto je zauzeo i *F. oxysporum Schlecht*, posebno kod veštački sušenog kukuruza (30% kontaminiranih uzoraka) (tabela 2). Ostale identifikovane vrste: *F. avenaceum (Corda ex Fr.) Sacc.*, *F. graminearum Schwabe* i *F. sporotrichioides Sherb.* takođe su do sada citirane u Jugoslaviji (Muntañola-Cvetković i sar., 1982). One su bile sporadično zastupljene i sa manjim intenzitetom kontaminacije zrna (tabela 2).

Sve navedene vrste fusaria su potencijalni producenti različitih mikotoksina i drugih sekundarnih metabolita (npr. fusarične kiseline, etianina, moniliformina, trihotecena, zearalenona) (Marasas i sar., 1984).

Tabela 2. KONTAMINACIJA ZRNA KUKURUZA (rod 1990) VRSTAMA PLESNI IZ RODOVA *Aspergillus*, i *Fusarium*

Br.	Vrsta plesni	ČISTI HIBRIDI		PRIRODNO SUŠEN		VEŠTAČKI SUŠEN		IZ UVOZA	
		A	B	A	B	A	B	A	B
1	*A. fumigatus*	-	-	-	-	-	-	50	1
2	*A. giganteus*	-	-	-	-	10	6	-	-
3	*A. niger*	-	-	10	1	-	-	-	-
4	*A. versicolor*	-	-	20	1	10	-	-	-
5	*Aspergillus spp.*	40	1	20	1	-	-	-	-
6	*F. avenaceum*	-	-	-	-	10	1	-	-
7	*F. graminearum*	-	-	10	1	-	-	-	-
8	*F. moniliforme*	-	-	-	-	-	-	100	8
9	*F. moniliforme* var. *subglutinans*	60	2	40	4	20	4	-	-
10	*F. oxysporum*	20	1	10	4	30	-	-	-
11	*F. sporotrichioides*	-	-	-	-	20	2	-	-
12	*Fusarium spp.*	40	6	-	-	-	-	-	-

Tabela 3. KONTAMINACIJA ZRNA KUKURUZA (rod 1990) VRSTAMA PLESNI IZ RODA *Penicillium*

Br.	Vrsta plesni	ČISTI HIBRIDI		PRIRODNO SUŠEN		VEŠTAČKI SUŠEN		IZ UVOZA	
		A	B	A	B	A	B	A	B
1	*P. canescens*	20	1	-	-	-	-	-	-
2	*P. capsulatum*	-	-	-	-	10	2	-	-
3	*P. chrysogenum*	-	-	-	-	10	2	-	-
4	*P. godlewskii*	40	1	-	-	-	-	-	-
5	*P. raistrichii*	-	-	-	-	10	1	-	-
6	*P. rugulosum*	-	-	-	-	-	-	50	1
7	*P. variabile*	-	-	10	2	10	1	-	-
8	*P. verrucosum* var. *cyclopium*	20	2	-	-	40	4	50	1
9	*Penicillium spp.*	60	3	-	-	20	3	-	-

ANU BiH АНУ БиХ

Posle fusaria najzastupljeniji su bili predstavnici roda Penicillium. Od osam identifikovanih vrsta i nekoliko izolata na čijoj determinaciji još radimo, najčešće je konstatovan *P. verrucosum var. cyclopium (Westling) Samson* i sar. (i do 50% kontamiranih uzoraka) (tabela 2). Od ostalih penicillia, izolovana su dva predstavnika sekcije Biverticillata-Symmetrica: *P. rugulosum Thom* i *P. variabile Sopp.* Zbog prisustva nekih sličnih karakteristika u aspektu kolonija i mikroskopskih struktura, bilo je relativno teško tačno ih identifikovati. Ostale vrste: *P. canescens Sopp, P. capsulatum Raper i Fennell, P. chrysogenum Thom, P. godlewskii Zaleski* i *P. raistrichii G. Smith* su detektovani mnogo ređe (10-20% kontaminiranih uzoraka) (tabela 3). U principu, različitim predstavnicima roda Penicillium mnogo više su bili inficirani uzorci vještački sušenog kukuruza (14-15,5% vlage). Većina ovih penicillia su potencijalni proizvođači mikotoksina (tabela 4).

Tabela 4. NAJZNAČAJNIJI MIKOTOKSINI KOJE MOGU PROIZVODITI *Penicillium spp.*, IZOLOVANE SA ZRNA KUKURUZA (rod 1990)

Vrsta	Mikotoksin	Referenca
P. canescens	citrinin	(a)
	griseofulvin	(b)
P. chrysogenum	ohratoksin A	(a)
	patuin	(a)
	penicilinska kiselina	(a)
P. raistrichii	griseofulvin	(b)
P. rugulosum	patulin	(a)
	rugulosin	(c)
P. variabile	ohratoksin A	(a)
	rugulosin	(c)
P. verrucosum var. *cyclopium*	ciklopiazonična kiselina	(a)
	ohratoksin A	(a)
	patulin	(a)
	penicilinska kiselina	(a)

Legenda: (a) Smith i Hacking (1983)
(b) El-Bana i Pitt (1987)
(c) Samson i van Reenen-Hoekstra (1988)

Kontaminacija zrna kukuruza aspergillima se kretala od 20-50% (tabela 1). Od četiri identifikovana predstavnika (tabela 2), najčešći je bio *A. versicolor (Vuill.) Tiraboschi* potencijalni producent sterigmatocistina (Samson i van Reenen-Hoekstra, 1988). Ostale vrste su bile znatno manje zastupljene, međutim i one su značajne s obzirom da mogu sintetisati toksične metabolite: *A. giganteus Wehmer*-patulin (Smith i Hacking, 1983) *A. niger van Tieghem*-aflatoksin B_1 (Škrinjar, 1990) i *A. fumigatus Fresenius*-fumitremorgen B (Smith i Hacking, 1983).

Od ostalih mikromiceta detektovanih na ispitanim uzorcima (tabela 1), *Acremonium strictum W. Gams* je dominirao (60-70% kontaminacije).

Dematiaceae su bile zastupljene sa tri roda; Cladosporium sp. je najčešće uočen, dok su Alternaria sp. i Ulocladium sp. sporadično zapaženi, i to sa malim intenzitetom kontaminacije (tabela 1).

Plesni koje se prve pojavljuju pri kultivaciji na Sabouraud agaru i koje zahtevaju veće vrednosti aktivne vode, tj. Mucor sp. i Rhizopus sp. uglavnom su konstantovane kod nesušenih i prirodno sušenih uzoraka zrna kukuruza (tabela 1).

Mikotoksikološke analize

Rezultati ispitivanja kontaminacije 27 uzoraka kukuruza mikotoksinima su prikazani u tabeli 5.

Tabela 5. KONTAMINACIJA ZRNA KUKURUZA (rod 1990) MIKOTOKSINIMA

Br.	Mikotoksin	ČISTI HIBRIDI		PRIRODNO SUŠEN		VEŠTAČKI SUŠEN		IZ UVOZA	
		A	C	A	C	A	C	A	C
1	Aflatoksin B_1	-	-	10	0,0125	-	-	50	0,2
2	Ohratoksin A	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Zearalenon	-	-	20	1,5-10	-	-	-	-
4	BGYF-test	-	-	20	-	-	-	50	-

A = procenat kontaminiranih uzoraka

C = koncentracija mikotoksinima (mg/kg)

Aflatoksinom B_1 je bilo kontaminirano 10% uzoraka prirodno sušenog zrna kukuruza i jedan uzorak uvezen iz Afrike. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Šutić i sar. (1982), koji su detektovali sličan nivo zagađenosti ove žitarice gajene na teritoriji Srbije, i Klemenca i sar. (1986), koji su kod uzoraka kukuruza iz Slovenije našli ovaj mikotoksin kod 9,4% uzoraka. Za razliku od naših rezultata, Hlubna i Ožegović (1986) nisu utvrdili prisustvo aflatoksina B_1 u kukuruzu iz Bosne i Hercegovine, a Kordić i sar. (1986) samo kod 2% slučajeva prirodno sušenog zrna. Prisustvo aflatoksina B_1, i to u većoj koncentraciji (0,2 mg/kg) u uzorku uvezenom iz Afrike lako je objasniti s obzirom na klimatske uslove koji tamo vladaju; visoka temperatura i vlažnost pogoduju biosintezi ovog mikotoksina. Međutim, nalaz aflatoksina B_1 u jednom uzorku prirodno sušenog kukuruza iz regiona Bačke ostaje za sada nerazjašnjen, mada se može pretpostaviti da je kod njega bila povećana vlažnost zrna neposredno posle žetve, što je omogućilo ne samo rast plesni producenta, nego i biosintezu samog mikotoksina. Determinisana koncentracija ovog mikotoksina (0,0125 mg/kg), mada je veća od one koju propisuje kao dozvoljenu (Sl. list SFRJ (1990), mogla bi biti smanjena u

tehnološkom procesu obrade zrna kukuruza u skrobarskoj industriji. Dejstvom kompleksa faktora u samom procesu moglo bi da dođe do potpune ili delimične degradacije toksina i samim tim do smanjenja njegove koncentracije u proizvodima (skrobu i glutenu). Istraživanje kontaminacije proizvoda skrobarske industrije će biti cilj naših sledećih istraživanja.

BGYF-test koji indicira prisustvo plesni producenata aflatoksina na osnovu karakteristične fluorescencije koju daje jedan drugi njihov sekundarni metabolit (kojična kiselina) bio je pozitivan samo u slučaju 3 od 27 ispitanh uzoraka (tabela 5). Od toga, u dva slučaja je konstatovana pozitivna korelacija između nalaza aflatoksina B_1 i rezultata testa.

Mada prisustvo ohratoksina A nije retka pojava u zrnu kukuruza u nekim područjima Jugoslavije: u Hrvatskoj Pepeljnjak i Balzer (1982) su ga utvrdili kod 56% uzoraka, odnosno 64% (Pepeljnjak i Cvetnić, 1986); u Bosni i Hercegovini Hlubna i Ožegović (1986) su ga detektovali kod 4,8% uzoraka, a u Sloveniji Klemenc i sar. (1986) kod 9,4% uzoraka, u našem istraživanju nije konstatovano prisustvo ovog mikotoksina. Odsustvo ohratoksina kod prirodno i veštački sušenog zrna kukuruza iz regiona Srbije našli su i Kordić i sar.(1986).

Zearalenon je mikotoksin koji je obično najčešće prisutan u uzorcima žitarica i raznih hraniva u Jugoslaviji i predstavlja znatan problem u našim ekološkim uslovima. U godinama koje su bile izuzetno kišovite u periodu sazrevanja i žetve kukuruza, kao npr. 1978. g., zrno je imalo povećan sadržaj vlage, što je favorizovalo rast fusaria, pa je čak 46,5% uzoraka sadržalo ovaj mikotoksin (Pepeljnjak i Balzer, 1982). Veliku kontaminaciju zrna kukuruza zearalenonom našli su i Klemenc i sar. (1986) - 45,3%, a još više Šutić i sar. (1982) - 83,3% kod prirodno sušenog kukuruza, odnosno 62,8% kod veštački sušenog. Rezultati našeg mikotoksiksološkog istraživanja (tabela 5) pokazuju mnogo manji nalaz zearalenona (kod 20% zrna kukuruza vlažnosti do 29,5%). Dobijeni nalaz bi se mogao objasniti odsustvom (osim u jednom slučaju) plesni *F. graminearum*, koja je najpoznatiji producent ovog mikotoksina. Mada i druga fusaria mogu biosintetisati zearalenon (npr. *F. oxysporum*), verovatno izolovani sojevi nisu bili toksikogeni u datim uslovima.

Nije bilo moguće ustanoviti prisustvo korelacije između ukupnog broja plesni u 1 g kukuruza (tabela 1) i prisustva mikotoksina (tabela 5). Uzorci čistih hibrida koji su bili najviše kontaminirani plesnima (280.000 /g) nisu uopšte sadržali mikotoksine.

ZAKLJUČCI

Deset rodova plesni, predstavljeno sa 25 vrsta je identifikovano na zrnu kukuruza (rod 1990) iz Vojvodine.

Najzastupljeniji je bio Fusarium spp. (50-100% inficiranih uzoraka) sa 6 determinisanih vrsta, od kojih je najčešća bila *F. moniliforme var. subglutinans.*

Penicillium spp. je bio detektovan kod 10-100% ispitanih uzoraka zrna kukuruza. Od 8 identifikovanih vrsta, najučestalija je bila *P. verrucosum var. cyclopium*.

Nešto niža je bila kontaminacija uzoraka s aspergillima (20-50%); *Aspergillus versicolor* je bio najzastupljenija vrsta.

Mikotoksikološka istraživanja zrna kukuruza su pokazala odsustvo kontaminacije ohratoksinom A, i dosta malo zagađenje aflatoksinom B_1 (10% uzoraka prirodno sušenog zrna). Zearalenon je bio najčešće detektovan mikotoksin (20% uzoraka; 1,5-10 mg/kg).

CONTAMINATION OF CORN KERNELS (1990 CROP) WITH TOXIGENIC MOLDS AND MYCOTOXINS (AFLATOXIN B_1, OCHRATOXIN A AND ZEARALENONE)

S u m m a r y

Twenty seven samples of corn kernels (1990 crop) were mycologicaly and mycotoxicologicaly investigated. All samples came from the regions of Bačka and Banat (Vojvodina) with the exception of two imported from Africa and America. Mycotoxins (aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone) were determined according to Balzer et al. (1978).

Ten fungal genera were identified on corn kernels. Fusarium spp. was the dominant one (50-100% contaminated samples). Among six determined species *F. moniliforme var. subglutinans* was the most frequent. Penicillium spp. was detected on 10-100% of investigated samples. *P. verrucosum var. cyclopium* was dominant among eight identified penicillia species. It was the contamination of corn kernels with Aspergillus spp. that was a little bit lower while *A. versicolor* was the most frequent.

Mycotoxicological investigations revealed the absence of ochratoxin A. Aflatoxin B_1 was determined only in 10% of the samples from Vojvodina (0.0125 mg/kg). Hyperestrogenic factor - zearalenone was found in 20% of samples with concentration from 1,5 to 10 mg/kg.

L I T E R A T U R A

Balzer, I., Bogdanić, Ć., Pepeljnjak, S. (1978): *Rapid thin layer chromatographic method for determining aflatoxin, ochratoxin A and zearalenone*. J.Ass. Off. Anal. Chem., 61,3.

Bennett, J.W., Deutsch, E. (1986): *Genetics of mycotoxin biosynthesis*. U: Mycotoxins and phycotoxins (Steyn, P.S., Vleggar, R., eds.). Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York and Tokyo, str. 51-64.

Booth, C. (1971): *The genus Fusarium*. Commonwealth mycological institute, Kew, Surrey, England.

El-Banna, A. A., Pitt, J. I., Leistner, L. (1987): *Production of mycotoxins by Penicillium species*. System. Appl. Microbiol., 10, 42-46.

Frisvad, J. C. (1988): *Fungal species and their specific production of mycotoxins*. U: Introduction to food-borne fungi (Samson, R. A., van Reenen-Hoekstra, E. S.). 3rd ed., Centraalbureau voor schimmelcultures, Baarn, Holandija, str. 239-249.

Harborne, J. B. (1980): *New experimental approaches to plant chemosystematics*. U: Chemosystematics: principles and practice (Bisby, F.A., Vaughan, J.G., Wright, A.C., eds.). The systematics association, Special volume 16, Academic press, London and New York, str. 39-70.

Hlubna, D., Ožegović, L. (1986): *Rezultati istraživanja mikotoksina (aflatoksina B_1, ohratoksina A i zearalenona) u Bosni i Hercegovini*. Poseb. izd., ANUBiH, LXXX, Odelj. med. nauka 12, 65-69.

Janzen, D. H. (1977): *Why fruits rot, mold and meat spoils*. Amer. nat., 111, 691-713.

Klemenc, N., Žust, J., Vengušt, A., Vospernik, P. (1986): *Etiologija mikotoksikoza kod domaćih životinja u Sloveniji*. Poseb. izd. ANUBiH, LXXX, Odelj. med. nauka, 12, 43-50.

Kordić, B., Muntañola-Cvetković, M., Panin, M. (1979): *Field and laboratory studies of swine mycotoxicosis in the S. R. of Serbia* (Yugoslavia). Zbl. Vet. Med., B, 26, 540-550.

Kordić, B., Panin, M., Kandić, S., Lončarević, A., Muntañola-Cvetković, M. (1986): *Rezultati višegodišnjeg mikrobiološkog i mikotoksikološkog istraživanja stočne hrane u SR Srbiji*. Poseb. izd. ANUBiH, LXXX, Odelj. med. nauka, 12, 17-41.

Marasas, W. F. O., Nelson, P. E., Toussoun, T. A. (1984): *Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology*. The Pensylvania State University Press, University Park and London.

Marić, A., Panin, M. (1963): *Fuzariozna plesnivost klipa kukuruza u našoj zemlji*. Savremena poljoprivreda 9, 628-636.

Muntañola-Cvetković, M., Borisavljević, J. (1979): *Mycopopulations in non-dried and dried corn grains*. Biosistematika 5, 1-21.

Muntañola-Cvetković, M., Borisavljević, J., Kordić, B. (1982): *Vrste Fusarium kod kukuruza i njegovih prerađevina u Jugoslaviji*. Poseb. izd. ANUBiH, LX, Odelj. med. nauka, 10, 29-45.

Pepeljnjak, S., Balzer, I. (1982): *Pregled mikoloških i mikotoksikoloških istraživanja sa nefropatičnog i anefropatičnog područja Hrvatske*. Poseb. izd. ANUBiH, LX, Odelj. med. nauka 10, 75-80.

Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z. (1986): *Mikološka i mikotoksikološka kontaminacija žitarica na širem anefropatičnom području SR Hrvatske*. Pos. izd. ANUBiH, LXXX, Odelj. med. nauka 12, 29-41.

Raper, K. B., Fennell, D. I. (1965): *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.

Raper, K. B., Thom, D. I. (1949): *A manual of the Penicillia*. Williams and Wilkins, Baltimore.

Samson, R. A. (1979): *A compilation of the Aspergilli described since 1965*. Studies in mycology 18, CBS, Baarn.

Samson, R. A., Stolk, A. C., Hadlok, R. (1976): *Revision of the subsection Fasciculata of Penicillium and some allied species*. Studies in mycology 11, CBS, Baarn.

Samson, R. A., van Reenen-Hoekstra, E. S. (1988): *Introduction to food-borne fungi*. 3rd ed., Centraal-bureau voor schimmelcultures, Baarn.

ANU BiH АНУ БиХ

Shotwell, O. L., Goulden, M. L., Hesseltine, C. W. (1974): *Aflatoxin: distribution in contamined corn.* Cereal chemistry 51, 492-499.

Sl.list SFRJ (1980): *Pravilnik o metodama vršenja mikrobioloških analiza i superanaliza životnih namirnica.* 25, 853-867.

Sl. list SFRJ (1990): *Pravilnik o maksimalnim količinama štetnih materija i sastojaka u stočnoj hrani.* 2, 27-31.

Smith, J. E., Hacking, A. (1983): *Fungal toxicity.* U: The filamentous fungi (Smith, J. E., Berry, D. R., Kristiansen, B., eds.), Vol. IV, Fungal technology, str. 238-265.

Škrinjar, M. (1990): *Stvaranje aflatoksina B_1 pomoću plesni iz grupe Aspergillus flavus-oryzae i A. niger.* Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev., 28, 29-31.

Šutić, M., Pantović, D., Kordić, B., Matić, S., Ljeşević, O., Svilar, N. (1982): *Aflatoksini u hrani i hranivima.* Poseb. izd. ANUBiH, LX, Odelj. med. nauka 10, 63-74.

ANU BiH АНУ БиХ

ODREĐIVANJE T-2 TOKSINA I NJEGOVIH HIDROLITIČKIH METABOLITA U SERUMU METODOM GASNE HROMATOGRAFIJE – MASENE SPEKTROMETRIJE

PREDRAG RADOŠEVIĆ, N. DOGOVIĆ

Vojnomedicinska kademija, Beograd
Vojnotehnički institut, Beograd

Apstrakt. T-2 toksin, HT-2 toksin i T-2 triol su ekstrahovani na čvrstoj fazi C-18 iz razblaženog uzorka seruma u visokom prinosu (preko 80%), za razliku od T-2 tetraola (oko 10%). Derivatizacija je vršena pomoću anhidrida trifluorsirćetne kiseline, a derivatizovani toksini razdvojani na kapilarnoj koloni HP-1 i detektovani masenom spektrometrijom uz praćenje karakterističnih jona. Detekcione granice metode su: T-2 toksin 15 μg/l, HT-2 toksin 5 μg/l, T-2 triol 3 μg/l i T-2 tetraol 40 μg/l. Preciznost metode je zadovoljavajuća, sem za vrlo niske koncentracije T-2 toksina.

UVOD

T-2 toksin je, pored makrocikličnih trihotecena, svakako jedan od najtoksičnijih Fusarium toksina (Ueno, 1983). Mada se, na sreću, u prirodi retko sreće (Gilbert, 1989), mikotoksikoze izazvane ovim toksinom vrlo su teške i sa ozbiljnim posledicama. Simptomi trovanja su nespecifični (Ueno i sar., 1984), a jedina pouzdana dijagnoza trovanja je detekcija i identifikacija toksina u biološkom materijalu. Međutim, T-2 toksin podleže vrlo brzoj i kompleksnoj razgradnji (Sintov i sar., 1988), što ukazuje na značaj određivanja i metabolita pored nepromenjenog toksina u biološkom materijalu. Metabolička razgradnja T-2 toksina u organizmu se odvija pod uticajem nekoliko enzimskih sistema, od kojih je najznačajniji hidrolitički (Pfeiffer i sar., 1988; Corley i sar., 1986). Karboksilesteraze kao nosioci hidrolitičkog metaboličkog puta razgrađuju ovaj toksin na više metabolita od kojih su najvažniji HT-2 toksin i T-2 tetraol kao krajnji hidrolitički metabolit.

Koncentracije T-2 toksina i njegovih metabolita u biološkom materijalu, čak i u uslovima teških akutnih trovanja, vrlo su male, tako da se za njihovo određi-

vanje zahteva izuzetno osjetljiva metoda. Kapilarna gasna hromatografija, uz prethodnu derivatizaciju ekstrakta uzorka sa fluoriranim acilirajućim agensima i detekciju na elektronapsorpcionom detektoru (Black i sar., 1987), ili masenoselektivnom detektoru (Begley i sar.; D'Agostino i sar., 1986), predstavlja metodu izbora.

Cilj ovog rada je bio razvijanje brze i jednostavne, a u isto vreme dovoljno osetljive metode za određivanje T-2 i HT-2 toksina, T-2 tiola i T-2 tetraola u plazmi u slučaju akutnih trovanja T-2 toksinom.

MATERIJAL I METODE

Hemikalije

Pojedinačni osnovni standardni rastvori T-2 toksina, HT-2 toksina i T-2 triola (SIGMA) napravljeni su rastvaranjem u etilacetatu, tako da je krajnja koncentracija bila 0,1 mg/ml. T-2 tetraol (SIGMA) rastvoren je pomoću metanola u istoj koncentraciji. Mešoviti standardni rastvor mikotoksina za kontaminaciju seruma napravljen je razblaživanjem sledećih zapremina osnovnih rastvora: 50 μl T-2 tetraola, 50 μl T-2 triola, 100 μl HT-2 toksina i 200 μl T-2 toksina u normalnom sudu od 10 ml sa etilacetatom.

Metoksihlor (PolyScience Corp.) je rastvoren pomoću benzola u koncentraciji od 1 mg/l i predstavlja interni standard za hromatografska određivanja.

Metanol, etilacetat, benzol i anhidrid trifluorsirćetne kiseline (TFAA) proizvodnje Merck su p.a. hemikalije.

Aparatura

Određivanja su vršena na gasnohromatografskom-masenospektroskopskom sistemu Hewlett Packard 5970 B uz injiciranje bez splitovanja, temperaturu injektora od 250°C i temperaturu detektora 300°C. Za hromtografiranje je upotrebljena kapilarna kolona HP-1 dimenzija 12 m/0,2 mm i temperaturski program zagrevanja kolone od 150°C do 280°C uz brzinu zagrevanja od 10°C/min. Jonizacija TFA derivata toksina postignuta je strujom elektrona od 70 eV na masenom spektrometru, a praćeni su samo karakteristični joni navedeni u tabeli br.1.

Tabela 1. ODABRANI KARAKTERISTIČNI JONI IZ MASENIH SPEKTARA ZA PRAĆENJE POJEDINIH JEDINJENJA

Toksin	m/e
T-2 tetraol	217,271,327,330,455,569
T-2 triol	121,234,455,569
HT-2 toksin	121,205,455,472,532
T-2 toksin	121,180,327,401,478
METOKSIHLOR	227

Kontaminacija i obrada uzorka

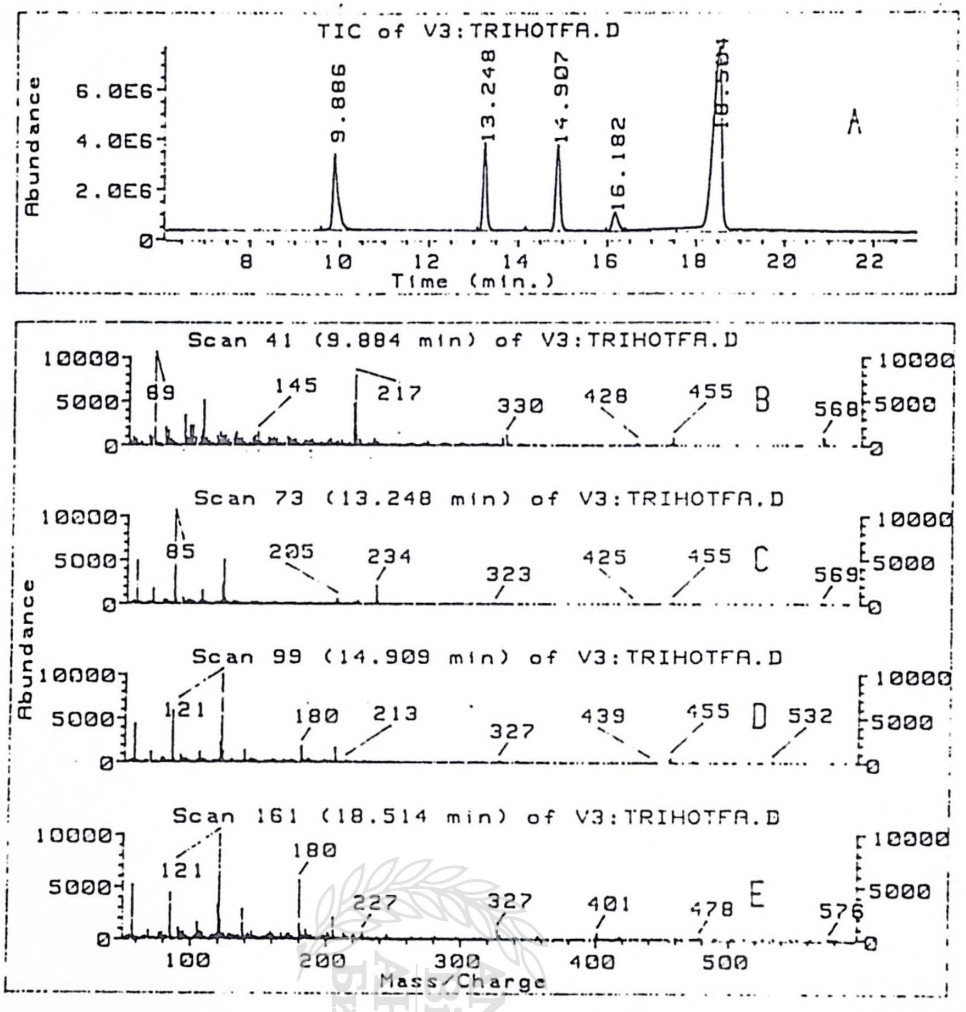
Za ispitivanje prinosa ekstrakcije i konstrukciju baždarnih dijagrama upotrebljen je "srednji uzorak" dobijen od velikog broja pojedinačnih uzoraka seruma zdravih ljudi. Uzorci seruma su kontaminirani sa različitim zapreminama mješovitog standardnog rastvora: 50, 100, 200 i 300 μl je pipetirano u suve epruvete, organski rastvarač je uparen strujom vazduha, a na ostatak je dodato po 10 μl metanola i po 2 ml seruma. Uzorci su razblaženi sa po 4 ml demineralizovane vode i dobro izmešani na "Vortex" mešalici. Toksini iz ovako pripremljenih uzoraka su ekstrahovani na čvrstoj fazi C-18 (SEP PAK-C18 minikolonice Waters) prethodno kondicioniranoj metanolom i demineralizovanom vodom. Posle nanošenja uzorka, kolona je isprana vodom, a toksini eluirani sa 2 ml metanola (brzina protoka je bila 3 ml/min.). Pre derivatizacije metanol je uparen strujom suvog vazduha. Derivatizacija je vršena sa po 100 μl TFAA, zagrevanjem 20 minuta na temperaturi od 60°C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu i uklanjanja viška anhidrida uparavanjem, derivatizovani ekstrakti su rastvoreni u 50 μl benzolskog rastvora internog standarda i po 1 μl injiciran u gasni hromograf.

REZULTATI I DISKUSIJA

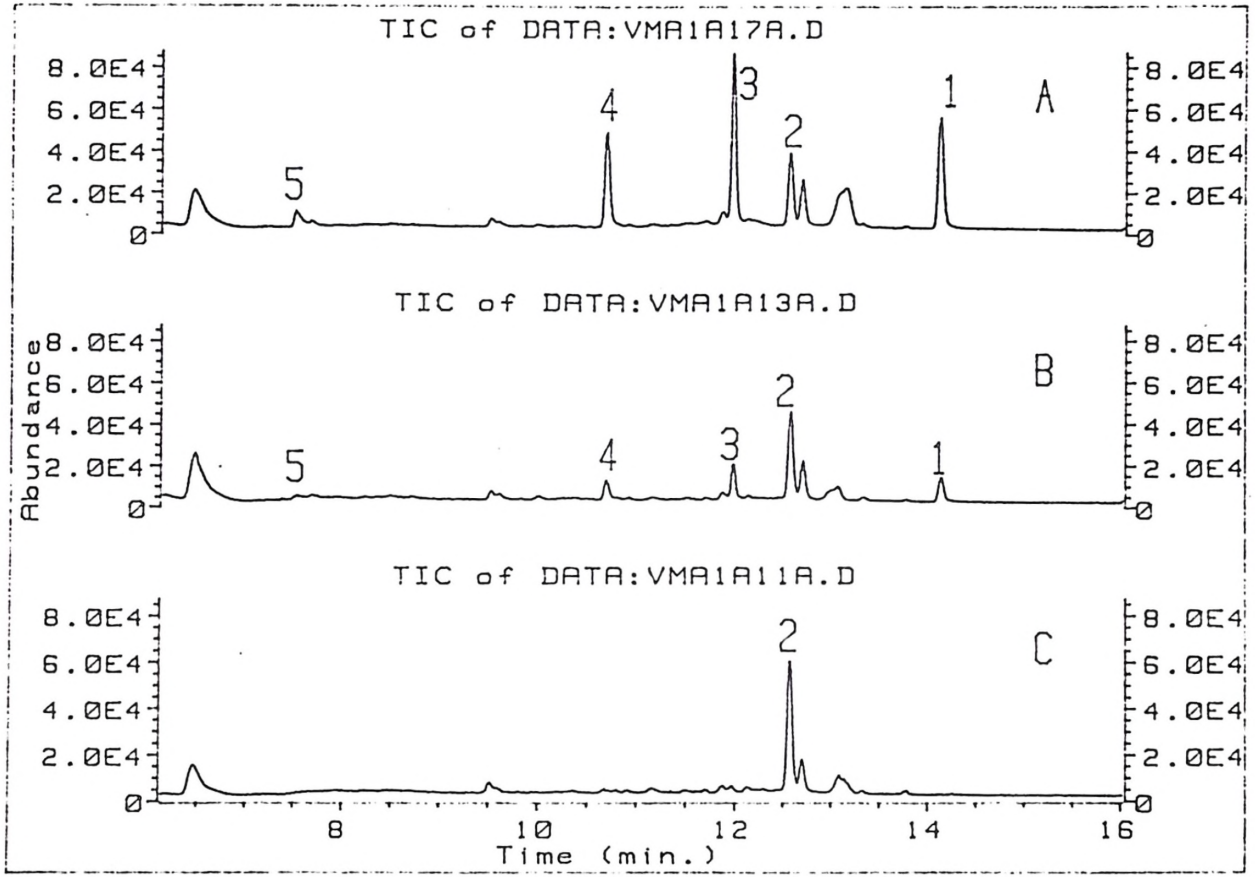
T-2 toksin i njegovi metaboliti su slabo do umereno polarna organska jedinjenja, tako da se ne mogu direktno analizirati na uobičajenim hromatografskim kolonama bez modifikacije strukture. Za derivatizaciju alkoholnih grupa obično se koriste silirajući ili fluorirani acilirajući agensi. U literaturi se navodi da su TFA stabilniji od trimetilsilil derivata trihotecena (Kienz i Verweij, 1986). U preliminarnim istraživanjima to se i kod nas pokazalo, pa smo se u daljem radu opredelili za TFAA kao derivatizacioni reagens.

Međutim, analizirajući TFA derivate trihotecena masenom spektrometrijom uz elektronsku jonizaciju, uočljivo je da se ne dobijaju fragmenti jačeg intenziteta na većim masama (slika br.1). Prateći jone na niskim masama, pogoršava se odnos signal/šum, što direktno utiče na donju granicu određivanja. Značajno poboljšanje osjetljivosti postiglo bi se primjenom blaže forme jonizacije kao što je na primjer hemijska jonizacija, gdje se stimuliše fragmentacija na visokim masama, a molekulski jon je često i osnovni jon u masenom spektru (D'Agostino i sar., 1986).

Na slici br.2 prikazani su hromatogrami seruma sa i bez dodatka toksina. Prinos ekstrakcije na čvrstoj fazi C-18 za T-2, HT-2 i T-2 triol veći je od 80%, dok je za T-2 tetraol ispod 10% što je i za očekivati s obzirom na veliku polarnost ovog jedinjenja. Primjenom smole XAD-2 za ekstrakciju povećao bi se prinos za T-2 tetraol (Heyndrickx A. i sar., 1984), ali bi se značajno produžilo vrijeme ekstrakcije i povećala potrošnja hemikalija.

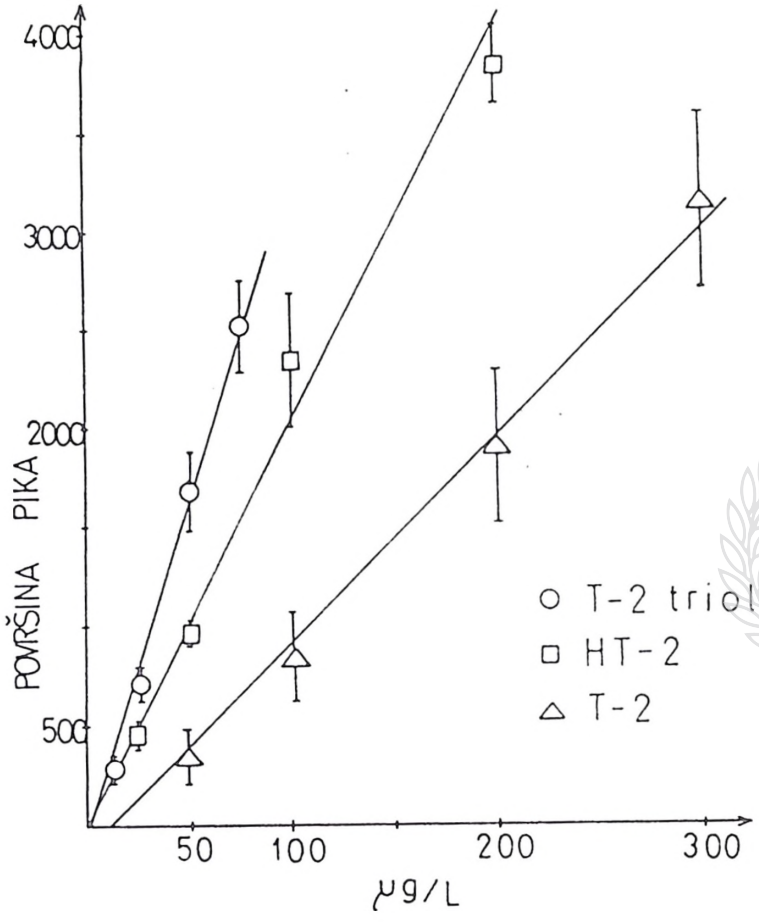


Sl. 1. Hromatogram i maseni spektri TFA derivata trihotecena: A - ukupan jonski hromatogram; maseni spektri: B-200 ng T-2 tetraola, C-100 ng T-2 triola, D-200 ng HT-2 toksina, E-200 ng T-2 toksina. Pik na 16,182 min. je interni standard



Sl. 2. Hromatogrami obrađenih uzoraka seruma. 1 T-2 toksin, 2 interni standard, 3 HT-2 toksin, 4 T-2 triol, 5 T-2 tetraol. A-serum sa: 200 μg/l T-2 toksina, 100 μg/l HT-2 toksina, 50 μg/l T-2 triola i 50 μg/l T-2 tetraola, B-serum sa: 50 μg/l T-2 toksina, 25 μg/l HT-2 toksina, 12,5 μg/l T-2 triola, C-serum bez dodatka toksina.

Baždarne krive za ispitivane toksine (osim za T-2 tetraol, gdje su dobijeni niski prinosi ekstrakcija) su prikazane na slici br. 3. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost od 5 određivanja. Preciznost je najlošija za niske koncentracije T-2 toksina i iznosi oko 30%, dok je za veće koncentracije ispod 20%. Postignute su sledeće detekcione granice: T-2 toksin 15 $\mu g/l$, HT-2 toksin 5 $\mu g/l$, T-2 triol 3 $\mu g/l$ i T-2 tetraol 40 $\mu g/l$.



Sl. 3. Baždarni dijagrami za određivanje T-2 toksina, HT-2 toksina I T-2 triola u serumu. Rasponi označavaju standardnu devijaciju. Korelacioni koeficijenti: ○ r=0,9880, □ r= 0,9925, △ r= 0,9579

Snimajući u masenoj spektrometriji samo pojedine jone iz spektra postoji opasnost gubitka specifičnosti analize. Da bi se ispitala "čistoća" pikova, upoređeni su odnosi intenziteta pojedinih jona iz masenog spektra u smeši standarda sa odnosom istih jona iz realnog uzorka. Razlike u odnosima ni u jednom slučaju nisu veće od 20%, što se smatra prihvatljivim i potvrđuje visoku specifičnost detekcionog sistema.

ANU BiH АНУ БиХ

DETERMINATION OF T-2 TOXIN AND ITS HYDROLITIC METABOLITES IN SERUM BY GAS CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY

S u m m a r y

Simple and sensitive method for determination of T-2 toxin and its hydrolitic metabolites (HT-2 toxin, T-2 triol and T-2 tetraol) in serum is developed. The method is based on solid phase extraction by SEP PAK C-18 cartridges and derivatisation of extracts by trifluoroacetic anhydride. Derivatives are separated on HP-1 capillary column. Detection mode on mass selective detector was select ion monitoring. Detection limits for T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2 triol and T-2 tetraol are 15, 5, 3, and 40 $\mu g/l$ respectivelly. Precission is acceptable except for very small concentration of T-2 toxin.

L I T E R A T U R A

Begley, P., Foulger, B., Jeffery, P., Black, R. (1986): *Detection of trace levels of trichothecenes in human blood using capillary gas chromatography-electron capture negative ion chemical ionisation mass spectrometry*. J. of Chromatogr., 367, 87-101.

Black, R., Clarke, R., Read, R. (1987): *Detection of trace levels of trichothecene mycotoxins in environmental residues and foodstaffs using gas chromatography with mass spectrometric or electroncapture detection*. J. of Chromatogr., 388, 365-378.

Corley, R., Swanson, S., Gullo, G., Johnson, L., Beasley, V., and Buck, W. (1986): *Disposition of T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin, in Intravascularly Dosed Swine*. J.Agric.Food. Chem., 34, 868-875.

D'Agostino, P., Provost, L. Drover, D. (1986): *Analysis of trichothecene mycotoxins in human blood by capillary column gas chromatography-ammonia chemical ionization mass spectrometry*. J. of Chromatogr., 367, 77-86.

Gilbert, J. (1989): *Current views on the occurrence and significance of Fusarium toxins*. J. of Appl. Bacteriol.-Sumposium Suppl., 89-98.

Heyndrickx, A., Sookvanichsilp, N., and van Den Heede, M. (1984): *Gas chromatography and toxicological determination of trichothecenes in biological and environmental samples associates with "Yellow Rain"*. First World Congress of New Compounds in Biological and Chemical Warfare: Toxicological Evaluation. Ghent, 110-131.

Kientz, C. and Verweij, A. (1986): *Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silica capillary columns*. J. of Chromatogr., 355, 229-240.

Pffeifer, R., Swanson, S., Buck, W. (1988): *Metabolism of T-2 Toxin in Rats: Effects of Dose, Route and Time*. J.Agric.Food. Chem., 36, 1227-1232.

Sintov, A., Bialer, M. and Yagen, B. (1988): *Pharmacocinetics and protein binding of trichothecene mycotoxins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in dogs*. Toxicon, 26, 153-160.

Ueno, Y. (1983): *Toxicology*. U: Trichothecenes-Chemical, Biological and Toxicological Aspects (Yoshio Ueno ed.), 135-137. Kodansha l.t.d., Tokyo and Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Oxford and New York.

Ueno, Y., Muto, A., and Kobayashi, J. (1989): *Toxicological properties of T-2 toxin and related trichothecenes*. First World Congress of New Compounds in Biological and Chemical Warfare: Toxicological Evaluation, 160-172, Ghent.

ANU BiH АНУ БиХ

SIMULTANA DETEKCIJA DON, DAS, T-2 TOKSINA I NJIHOVIH METABOLITA U KUKURUZU

ZVONKA KABAJ-TOMŠIČ, ANTON VENGUŠT, JANKO ŽUST, UROŠ PESTEVŠEK

Institut za higieno in patologijo prehrane domačih živali, VTOZD za veterinarstvo, Ljubljana

Apstrakt. Opisana je problematika kontaminacije stočne hrane mikotoksinima iz grupe trihotecena. Posebna pažnja je bila posvećena hemijskom određenju tih toksina. Poslije hidrolize, pomoću koje smo pretvorili diacetoksiscirpenol, T-2 toksin i njihove metabolite te metabolite deoksinivalenola u scirpentriol (STR), T-2 tetraol (TOL) i deoksinivalenol (DON), toksine smo odredili simultano plinskom kromatografijom EC detektorom. Kvalitativno utvrđivanje smo obavili masenom spektroskopijom.

UVOD

Trihotecene proizvode gljivice iz roda Fusarium, Myrothecium, Stachybotris, Cephalosporium i Trichoderma. Najvažniji proizvođači tih toksina su *Fusarium tricinctum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae* i *Stachybotris atra*. Vrsta i količina toksina zavisi od supstrata, temperature, vlage i drugih činitelja. Velika količina trihotecena pronađena je samo u kulturama gljivica. Među toksinima izoliranim iz prirodnih supstrata, najvažniji su T-2 toksin, diacetoksiscirpenol (DAS), deoksinivalenol (DON) i nivalenol (NIV), koji mogu pojedinačno ili u kombinaciji s drugim toksinima prouzrokovati zdravstvene smetnje kod ljudi i životinja (2, 3, 4).

Trihoteceni su seskviterpeni (15 C atoma), čija osnova je trihotecensko jezgro 12,13-epoksitrihotec-9en. Delimo ih na 4 veće grupe: A, B, C i D. Razlikuju se po supstituentima na C3, C4, C7, C8 i C15 mestu. Grupe A, B i D zahvaćaju jednostavne estere i alkohole trihotecena, dok grupa C zahvata makrocikličke toksine. Najvažniji i najčešći su toksini iz grupe A (T-2 toksin, HT-2 toksin, T-2 tetraol, neosolaniol, acetil T-2 toksin, diacetoksiscirpenol, 15-monoacetoksiscirpenol, scirpentriol) i grupe B (deoksinivalenol, diacetilnivalenol, fusarenon X, nivalenol, diacetildeoksinivalenol). Zbog velikog broja do danas poznatih trihotecena

i vrlo različitih osobina supstrata u kojima se nalaze, njihova simultana detekcija za zakonske, medicinske i veterinarske potrebe još uvijek nije standarizirana.

Cilj našeg rada bio je razvijanje metode za hemijsko utvrđivanje trihotecena, koja bi zahvatila što više tih materija, prisutnih u prirodnim supstratima. Prvo smo preveli pomoću hidrolize različite trihotecene iz grupe A i B u njihove odgovarajuće alkohole (scirpentriol, deoksinivalenol i T-2 tetraol), a zatim smo ih separirali i identificirali pomoću plinske kromatografije EC detektorom i masnom spektrometrijom.

MATERIJAL I METODE

Pretražili smo 25 uzoraka više ili manje plesnivog kukuruza iz različitih delova Jugoslavije. Mikološke pretrage izvršili smo po metodama Schmita, Michustina i Trisvijatskoga (13) i metodi koja je opisana u *International Rules for Seed Test ISTA, Vol. 3* (14). Takođe smo izolirali i determinirali toksogene sojeve gljivica. Mikotoksikološke pretrage o prisustvu aflatoksina B_1, B_2, G_2, ohratoksina A i F-2 toksina izvršili smo metodom tankoslojne kromatografije (14). Kožni test na kunićima obavili smo modificiranom metodom (14) po Eppleyu (15). Kloroformski ekstrakt plesnivog kukuruza otparili smo do suvoga, a uljni ostatak naneli na obrijanu kožu belog kunića. Reakciju smo posmatrali vizuelno posle 24, 48 i 72 sata. Za ocenu jakosti reakcije upotrebili smo sledeće kriterije:

0 - bez reakcije;
1 - crvenilo;
2 - jako crvenilo;
3 - jako crvenilo i otok;
4 - vrlo jaka reakcija s edemom i nekrozom.

Za simultano hemijsko određivanje trihotecena u kukuruzu upotrebili smo metodu plinske kromatografije. Uzorke smo prvo ekstrahirali mešavinom acetonitrila i vode (84:16), a zatim smo ih očistili na koloni napunjenoj aktivnim ugljem, neutralnim Al_2O_3 i aktivnom zemljom (1:1:1), te na koloni napunjenoj neutralnim Florisilom. Aktivni ugalj uklanja većinu smetajućih materija, kao što su npr. drugi mikotoksini (aflatoksini, F-2 toksin, ohratoksini), a neutralni Al_2O_3 uklanja pojedine pigmente. Zatim smo pomoću NaOH sve estere trihotecena hidrolizirali u njima srodne alkohole.

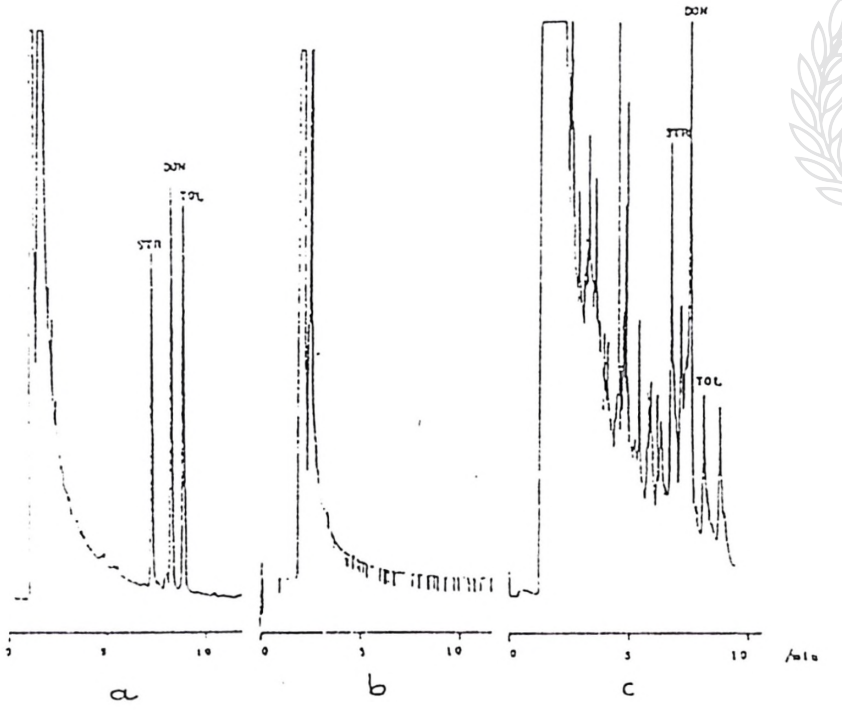
Tom metodom smo T-2 toksin i njegove metabolite pretvorili u T-2 tetraol (TOL), diacetoksiscirpenol i njegove metabolite u scirpentriol (STR), dok je deoksinivalenol (DON) ostao nepromenjen. Uslovi hidrolize su bili izabrani tako da su omogućili maksimalnu pretvorbu spomenutih toksina u TOL i STR te minimalno uticali na raspad DON. Za derivatizaciju smo upotrebili trifluorocetnu kiselinu, koja je na EC detektoru dala bolje rezultate od heptafluorbutilimidazola (17, 19, 20, 21). Separacija se odvijala na 30 m dugačkoj kapilarnoj koloni DB-5 (0,25 μm), nosivi plin bio je dušik s pretokom 1,9 ml/min, temperatura injektora bila je 220°C,

ANU BiH АНУ БиХ

Tabela 1. HIDROLIZA TRIHOTECENA

acetil T-2 T-2 HT-2 T-2 triol T-2 tetraol neosolaniol 4-diacetilneosolaniol 8-acetilneosolaniol	OH –	T - 2 tetraol - TOL
triacetoksiscirpenol diacetoksiscirpenol 15-monoacetoksiscirpenol scirpentriol	OH –	scirpentriol - STR
deoksinivalenol 3-acetildeoksinivalenol 15-acetildeoksinivalenol	OH –	deoksinivalenol - DON

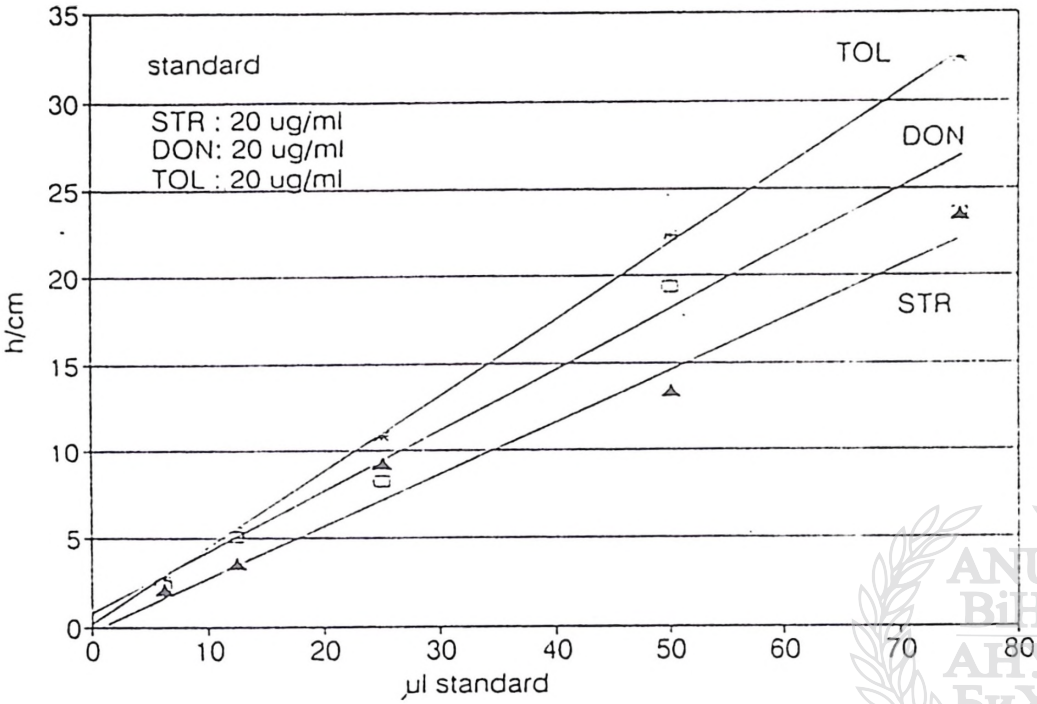
temperatura detektora 250°C, a temperatura kolone 180°C (slika 1). Dobivene rezultate smo potvrdili na plinskom kromatografu s maseno selektivnim detektorom (MSD) s elektronskom i hemijskom ionizacijom (22, 23, 24).



Slika 1. Kromatogrami a) standarda STR, DON i TOL b) zdravog kukuruza c) plesnivog kukuruza

ANU BiH АНУ БиХ

SLIKA 2: Kalibraciona krivulja standarda STR, DON i TOL



Slika 2. Kalibraciona krivulja standarda STR, DON i TOL

Kalibraciona krivulja standarda STR, DON i TOL prikazana je na slici 2. Kod izrade krivulja upotrebili smo metodu najmanjih kvadrata. Korelacijski koeficijenti i jednadžbe pravca za upotrebljene standarde prikazani su u tabeli 2. Iz nje je vidno da je korelacijski koeficijent bio najniži kod DON-a, što bi mogla biti posledica nepotpune derivatizacije. Relativna standardna devijacija za STR bila je 13,7, za DON 10,2 i za TOL 11,8.

Tabela 2. KORELACIJSKI KOEFICIJENTI I JEDNADŽBE PRAVCA

Toksin	r	Jednadžba pravca
STR	0,9959	y = 0,3034 x - 0,2166
DON	0, 9901	y = 0,3271 x + 0,5657
TOL	0,9998	y = 0,4351 x + 0,0548

Rezultati mikoloških i mikotoksikoloških pretraga kukuruza koji je prouzrokovao različitu jačinu reakcije na koži kunića (0 do 4) prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. REZULTATI MIKOLOŠKIH I MIKOTOKSIKOLOŠKIH ISPITIVANJA PLESNIVOG KUKURUZA

Uzorak	Broj spora gljivica u 1000/g	STR ng/g	TOL ng/g	DON ng/g	F-2 ng/g	Aflatoksin B_1 ng/g
1	269	0	0	350		
2	233	0	0	470		
3	62	170	0	0		
4	42	0	0	90		
5	44	0	0	0		
6	336	0	0	0		
7	116	0	0	100		
8	311	10	20	620		
9	241	0	0	380	1200	0
10	405	140	0	80	1000	20000
11	183	0	30	0	0	0
12	260	0	0	90	0	0
13	300	920	0	160000	12000	3600
14	880	0	810	0	10100	0
15	775	0	0	730	0	0
16	1554	220	80	630	0	0
17	525	660	0	12900	12100	
18	57	0	4300	120	0	0
19	494	0	560	3120	1800	30000
20	425	0	0	490	12000	0
21	290	0	1800	27400	0	0
22	505	230	150	0	6000	0
23	123	560	430	0	6000	0
24	98	1000	360	1260	3800	
25	786	620	360	28290		

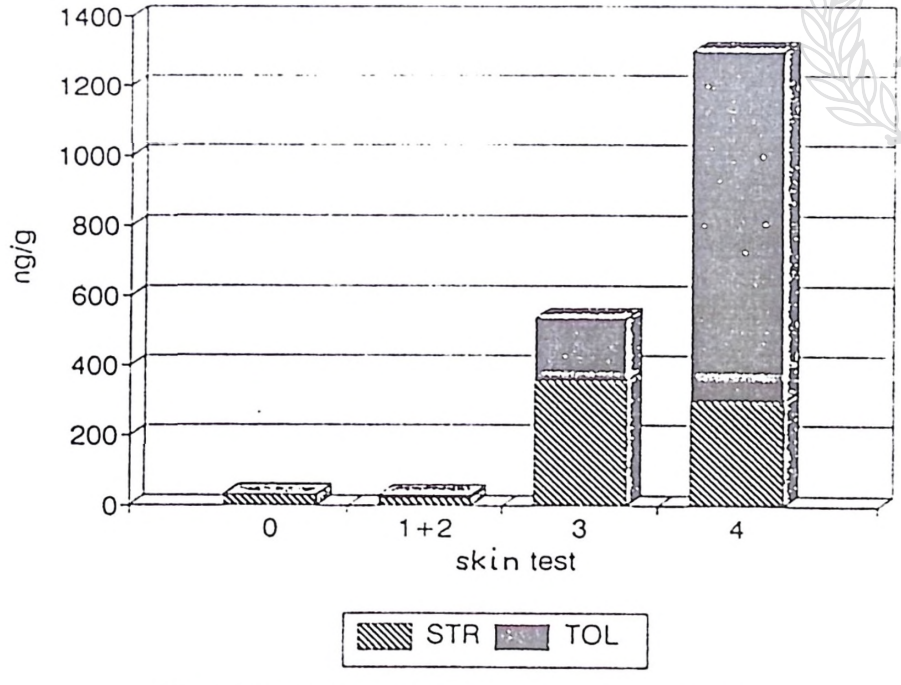
U 1 g uzorka pronašli smo od 42.000 do 1.545.000 spora gljivica. Broj gljivica nije bio proporcionalan prisustvu toksina u kukuruzu. To se podudara s podacima iz literature (3, 5), u kojoj se navodi da gljivice mogu odumreti, dok njihovi toksički metaboliti, zbog svoje stabilnosti, ostaju nepromenjeni. Od gljivica koje proizvode trihotecene, izolirali smo 6 sojeva *Fusarium oxysporum*, 5 sojeva *Fusarium graminearum*, 5 sojeva *Fusarium moniliforme Sheldon*, po jedan soj *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium rigidiusculum* i *Fusarium poae*, 3 soja *Trichoderma harzianum Rifai*, 3 soja *Trichoderma roseum* i jedan soj *Epicoccum species*.

Od mikotoksina su bili u kukuruzu najčešće prisutni DON i njegovi metaboliti (72%), u prosječnoj koncentraciji 9.485 ng/g (80 do 160.000 ng/g). DAS i njegovi metaboliti su bili utvrđeni u 40% pretraženih uzoraka, u prosječnoj količini 180 ng/g (10 do 1.000 ng/g), a T-2 toksin i njegovi metaboliti u 44% uzoraka, u prosječnoj količini 356 ng/g (20 do 4.300 ng/g). Uz trihotecene je 50% uzoraka sadržavalo F-2 toksin, u količini od 500 do 12.100 ng/g, aflatoksin B_1 je bio utvrđen u 3 uzorka (3,6 do 30 ng/g) a ohratoksin A u jednom uzorku (34 ng/g).

Spomenuti rezultati samo se delimično slažu s rezultatima naših prethodnih istraživanja, u kojima smo metodom TLC pronašli manju kontaminaciju stočne hrane T-2 toksinom, DAS i DON (14, 25). Smatramo da su razlike nastale zbog veće osjetljivosti GC-ECD metode, koja omogućava detekciju i do 100 puta manjih količina tih toksina (26). Opisanom metodom smo, pored toksina T-2, DAS i DON, obuhvatili i većinu njihovih metabolita.

Prema podacima iz literature, kontaminacija kukuruza i stočne hrane trihotecenima predstavlja ozbiljan problem u svetu. U SAD je Versonder (27) pronašao DON u 46% pregledanih uzoraka kukuruza (1,5 do 10 mg/kg). Cotte i sar. (28) izveštavaju o 72% kontaminaciji kukuruza DON u koncentracijama od 0,1 do 41,6 mg/kg. U osporljivoj pšenici je Hadler (29) otkrio 94% kontaminaciju DON. U Engleskoj (30) je kontaminacija tim toksinom bila u koncentracijama od 0,02 do 0,4 mg/kg, utvrđena samo u 16% pretraženih uzoraka. Mnogi autori izveštavaju o kontaminaciji stočne hrane trihotecenima i u drugim državama (31, 32). Nivalenol su pronašli u pojedinim državama Evrope i Azije, dok su se T-2 toksin i DAS javljali samo povremeno (33).

Jugoslavenski istraživači su utvrdili relativno mali broj uzoraka stočne hrane kontaminirane dermatoksičkim trihotecenima. Balzer (34) je otkrio T-2 toksin u 8,3% (0,5 do 5,0 mg/kg), a Pepeljnjak (35) u 7,5% pretraženih uzoraka kukuruza (0,16 do 0,46 mg/kg). Isti autor je T-2 toksin pronašao i u 20% pretraženih uzoraka ječma (prosječno 0,16 mg/kg) te u 15,7% pretraženih uzoraka hrane za goveda (0,2 do 0,8 mg/kg).



Slika 3. Rezultati kožnog testa i hemijske pretrage uzoraka

ANU BiH АНУ БиХ

Upoređenje jačine kožne reakcije (slika 3) i prisustva dermatoksičkih trihotecena (izraženih kao scirpentriol i T-2 tetraol) je pokazalo signifikantnu korelaciju r= 0,6, P<0,005. Uzorci broj 15 i 20 su prouzrokovali jaku kožnu reakciju, ali nisu sadržavali spomenute toksine. Verovatno su bili prisutni drugi dermatoksički agensi koje upotrebljenom metodom određivanja nismo obuhvatili. Nijednom od uzoraka bez ili sa slabom kožnom reakcijom nismo ustanovili veće količine STR i TOL.

ZAKLJUČAK

Izvršene su pretrage kontaminacije kukuruza mikotoksinima iz grupe trihotecena. Veliki broj trihotecenskih metabolita smo pretvorili u odgovarajuće alkohole: scirpentriol (STR), deoksinivalenol (DON) i T-2 tetraol (TOL) s namerom da se poveća analitička osetljivost i omogući simultana detekcija većine trihotecena iz grupe A i B. Utvrdili smo da je najniža detekcijska granica za zdrav kukuruz 10 ng/g, a za jako plesniv kukuruz 100 ng/g.

Separaciju trihotecena pomoću kapilarne plinske kromatografije s EC detektorom smo potvrdili masenom spektrometrijom. U 25 uzoraka plesnivog kukuruza najčešće je bio prisutan DON i njegovi metaboliti (72%), u prosečnoj koncentraciji 9.485 ng/g (80 do 160.000 ng/g). DAS i njegovi metaboliti su bili utvrđeni u 40% primera, u prosečnoj količini 181 mg/g (10 do 1.000 ng/g), a T-2 toksin i njegovi metaboliti u 44% primera, u prosečnoj količini 356 ng/g (20 do 4.300 ng/g). Pored trihotecena, bio je u 50% uzoraka pronađen toksin F-2 u koncentraciji od 500 do 12.100 ng/g, u 3 uzorka aflatoksin B_1 (3,6 do 30 ng/g) a u jednom uzorku ohratoksin A (24 ng/g). Upoređenje jačine kožne reakcije i prisustva dermatoksičkih trihotecena u uzorcima je pokazala signifikantnu korelaciju (r=0,6, P<0,005). Ni u jednom od uzoraka bez ili sa slabom kožnom reakcijom nisu bile hemijski utvrđene veće količine dermatoksičkih toksina.

SIMULTANEOUS DETECTION OF DON, DAS AND T-2 TOXIN AND THEIR METABOLITES IN MAIZE

S u m m a r y

The contamination of corn with mycotoxins from trichothecene group was studied. A great number of metabolites of trichothecene toxins were converted to their corresponding alcohols scirpentriol (STR), deoxynivalenol (DON) and T-2 tetraol (TOL), in order to incrise analytical sensitivity and to detect simultaneusly the majority of trichothecene from group A and B. Detection limit from 10 ng/g for normal corn to 100 ng/g for very mouldy corn were estimated. Separation of trichothecenes by capillary gas chromatography with electron capture detector was comfirmed by mass spectrometry. In 25 samples of mouldy corn DON and its metabolites were the most frequent (72%) in average concentration of 9485 ng/g (from 80 to 160000 ng/g). DAS and its metabolites were stated in 40% of cases in average of 181 ng/g

(from 10 to 1000 ng/g) and T-2 toxin and its metabolites in 44% of cases in average 356 ng/g (from 20 to 4300 ng/g). Besides trichothecenes in 50% of samples F-2 toxin in concentration from 500 to 12100 ng/g, aflatoxin B1 in three samples (3.6 to 3o ng/g) and ochratoxin in one sample (24 ng/g) were also found. Comparision between intensity of skin reaction and dermatoxic trichothecenes content showed correlation r= 0.6, which is significant for P<0.005. In no sample without or with weak dermatoxic effect greater quantities of dermatoxic toksins were chemically proved.

LITERATURA

(1) *Mycotoxins: economic and health risks*. Task force report (Council for agricultural science and technology), No. 116, November 1989, Ames, Iowa, USA.

(2) Wyllie T. D., L. G. Morehouse (1977): *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*. Vol. 1. Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins. New York; Basel: Dekker

(3) Lacey J. (1985): *Trichothecenes and other Mycotoxins*. Chichester; New York; Brisbane; Toronto; Singapore: J.Wiley & Sons.

(4) Shepherd M. J., J. Gilbert (1986): *Fusarium mycotoxins in cereals and other stored products*. International Biodeterioration Supp., 2; 61-69.

(5) Smith J. E., Moss M. O. (1985): *Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance.* Chichester; New York: Brisbane; Toronto; Singapore: J.Wiley & Sons.

(6) Eppley R. M., W. Bailey (1973): *12, 13-epoxy trichothecenes as the probable mycotoxins responsible for stahybotryotoxicosis*. Science, 181; 758-760.

(7) Burmeister H. R., J. J. Ellis, S. G. Yates (1971): *Correlation of biological to chromatographic date for two mycotoxins elaborated by Fusarium*. Appl. Microbiol., 21; 673-675.

(8) Mirocha C. J. (1979): *Trichothecene toxins produced by Fusarium*. Conference on mycotoxins in animal feeds and grain related to animal health. Food and drug administration, Rockville, 288-373.

(9) Ueno Y. (1984): *Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes*. Fundam. Appl. Toxicol., 4: 124-132.

(10) Mirocha C. J., S. Pathre (1973): *Identification of the toxic principle in a sample of poaefusarin*. Appl. Microbiol., 266; 719-724.

(11) Kubena L. F. et al. (1987): *Effect of feeding mature white leghorn hens dieto that contain DON*. Poultry Sci., 66.

(12) Snyder A. P. (1984): *Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene*, 579, 583.

(13) Misustin E. N., L. A. Trisvjatskij (1963): *Mikrobi i zerno*, Moskva.

(14) Vengušt A. (1985): *Etiologija mikotoksikoz pri domačih živalih v Sloveniji*. Doktorska disertacija, Ljubljana.

(15) Epply R. M.(1968): *Screening method for zearalenon, aflatoxin and ochratoksin*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 51; 1, 74-78.

(16) Romer T. R.(1986): *Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds.* J.Assoc. Off. Anal.Chem., 69; 4, 699-703.

(17) Rood H. D., S. P. Swanson, W. B. Buck (1986): *Rapid screening procedure for the detection of trichothecenes in plasma and urine.* J.Chomatogr., 378: 375-383.

(18) Trucksess M. W., S. Nesheim, R. M. Eppley (1984): *Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol.* J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67; 1, 40-45.

(19) Rood H. D., W. B. Buck, S. P. Swanson (1988): *Gas chromatographic screening method for T-2 toxin,* DAS DON, and related trichothecenes in feeds. J.Assoc. Off. Anal.Chem., 71; 3, 493-498.

(20) Rood H. D., W. B. Buck, S. P. Swanson (1988): *Diagnostic screening method for the determination of trichothecene exposure in animals.* J.Agric. Food Chem., 36: 74-79.

(21) Kientz C. E., A. Verweij (1986): *TMS and TFA of a number of trichothecenes followed mby gas chromathographic analysis mon fused silica capillary columns.* J. Chromatogr., 355: 229-240.

(22) Krishnamurthy T., E. W. Sarver (1986): *Mass spectral investigations on trichothecenes mycotoxins.* III. Synthesis, characterization and application of pentafluorpropionyl and trifluoroacetyl esters of simple trichothecenes. J.Chromatogr., 355: 253-264.

(23) Mirocha C. J., R. A. Pawlosky, K. Chatterjee, S. Watson, W. Hayes (1983): *Analysis for Fusarium toxins in various samples implicated in biological warfare in Sautheast Asia.* J.Assoc. Off.Anal. Chem., 66; 6, 1485-1499.

(24) Gareis M., J. Bauer und Brigitte Gedek (1985): *Fusarientoxine in Futtermitteln.* Nachweis und Vorkommen von trichothecene. Tierrztl. Praxs., 1; 8-19.

(25) Žust J., A. Vengušt, U. Pestevšek, N. Klemenc, Zvonka Kabaj, (1989): *Kontaminacija stočne hrane mikroorganizmima.* Krmiva, 31; 5-6, 93-103.

(26) Kabaj-Tomšič, Z. (1991): *Analiza trihotecenov v koruzi.* Magistersko delo, Ljubljana.

(27) Vesonder R. F., A. Ciegler, A. H. Jensen (1973): *Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn.* Appl. Microbiol., 26; 6, 1008-1010.

(28) Cote L. M., J. D. Reynolds, R. F. Vesonder, W. B. Buck, S. P. Swanson, R. T. Coffei, D. C. Brown (1984): *Survey of vomitoxin - contaminated feed grains in midwestern United States and associated health problems in swine.* J.Am. Vet. Med. Assoc., 184; 2, 139-192.

(29) Hagler W. M., K. Ticzkowska, P. B. Hamilton (1984): *Simultaneus occurrence of deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxin in 1982 scabby wheat from the midwestern United States.* Appl. Environ. Microbiol., 47; 1, 151-154.

(30) Jelinck C. F., A. E. Pohland, and G. E. Wood (1989): *Worldwide occurrence of mycotoxins in food and feeds - An update.* J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72; 2, 223-230.

(31) Bauer J. (1982): *Mycotoxicosen in der tierischen Production Bedentung und Diagnose.* Berl. Mnch. Tierrztl. Wschr. 95; 301-307.

(32) Hamid A. M., A. Hamid (1983): *Occurrence of vomitoxin in Egyptian foods and feeds.* Int. mycotoxin. conf. Food and drug administration, Cairo.

(33) Lacey J., ed. (1985): *Trichothecenes and other mycotoxins.* Chichester; J.Willey & Sons.

(34) Balzer I., C. Bogdanić, S. Pepeljnjak (1978): *Rapid thin layer chromathographic method for determining aflatoxin B_1, ochratoxin A and zearalenone in corn.* J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 61; 584-584.

(35) Pepeljnjak S., Z. Cvetinić (1981): *Ohratoksogenost sojeva Aspergillus ochraceus vrste s područja endemske nefropatije.* Vet. arh., 51; 101-103.

ANU BiH АНУ БиХ

UČESTALOST I TOKSIKOGENOST SOJEVA *Aspergillus versicolor* NA PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE

ZDENKA CVETNIĆ I STJEPAN PEPELJNJAK

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za mikrobiologiju, Zagreb

Apstrakt. U toku osmogodišnjih mikoloških ispitivanja distribucije spora plijesni u zraku, u tlu, na bilju u vegetaciji te uzorcima uskladištenih žitarica i suhomesnatih proizvoda swakupljenih iz skladišta i smočnica individualnih domaćinstava na području R. Hrvatske pretraženo je 1295 uzoraka i utvrđeno je 5.7-46.3% uzoraka kontaminiranih plijesnima roda Aspergillus.

Vrsta *A. versicolor* u pretraženim uzorcima tla nije dokazana, dok se na bilju u vegetaciji javila u 0.3% (1/260), odnosno u 6.6 % (1/15) od ukupno utvrđenih Aspergillus vrsta. U zraku je ova vrsta bila prisutna u 4.9% (15/305), odnosno u 27.7% (15/54), u skladištima u 0.7% (2/285), odnosno 1.6% (2/124) i smočnicama u 3.8% (15/395), odnosno 8.2% (15/183) uzoraka. Intenzitet kontaminacije uzoraka sa *A. versicolor* bio je od 1-5 (maksim.5).

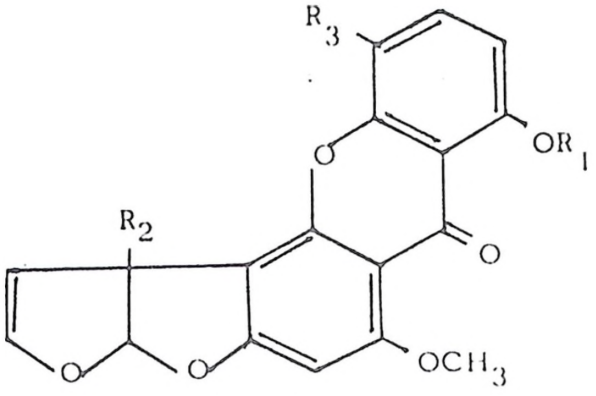
Biosintezom na vlažnoj pšeničnoj prekrupi ispitana je toksikogena sposobnost tvorbe sterigmatocistina (ST) i aflatoksina (AF) 25 sojeva *A. versicolor*.

Multitoksinskom TLC metodom utvrđeno je 32% (8/25) producenata sterigmatocistina u koncentracijama 4.0-480.0 mg ST/kg. Najtoksikogeniji soj izoliran je iz zraka. Nijedan ispitani soj nije tvorio aflatoksine.

UVOD

Među mnogobrojnim plijesnima koje svojim toksičnim metabolitima (mikotoksinima) mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi i životinja vrsta *Aspergillus versicolor* iz roda Aspergillus posebno je zanimljiva zbog mogućnosti tvorbe sterigmatocistina (ST) i aflatoksina (AF).

Molekula sterigmatocistina sastoji se od ksantonske jezgre (dibenzopiran) na koju su vezana dva furanska prstena (slika 1) (1).



$C_{18}H_{12}O_6$

R_1 –H

R_2 –H

R_3 –H

Slika 1. Kemijska struktura sterigmatocistina

Postoji sličnost u kemijskoj građi molekula sterigmatocistina i aflatoksina B_1, a visoka reaktivna bifuranska struktura odgovorna je za mnoga farmakološka svojstva obaju toksina.

Sterigmatocistin je toksična supstancija sa karcinogenim i mutagenim svojstvima, koja su dokazana na brojnim pokusnim životinjama (2, 3). Njegova toksikogenost slična je učincima koje izazivaju aflatoksini, samo manje izražena. Prema navodima autora Schroeder i Kelton (4), srednja letalna doza (LD_{50}) intraperitonealno) sterigmatocistina za štakore iznosila je 60 mg/kg tjelesne težine, a LD_{50} aflatoksina B_1 bila je 6 mg/kg tjelesne težine. U pokusima na pačićima aflatoksin B_1 se pokazao više od 100 puta djelotvorniji od sterigmatocistina u nastajanju hiperplazije žučnih kanalića (1, 4). Međutim, tvorba sterigmatocistina u odnosu na tvorbu aflatoksina je znatno kvantitativno veća, pa se u literaturi navode podaci o prinosu sterigmatocistina i do 12 g/kg supstrata (5, 6).

Sposobnost tvorbe sterigmatocistina, uz *A. versicolor* vrstu, imaju brojne druge vrste unutar rodova Aspergillus (*A. glaucus gr.*, *A. flavus* i *A. parasiticus*, *A. nidulans*), Penicillium (*P. luteum*) i Bipolaris (*B. sorokiniana*) (4, 6).

Polazeći od saznanja mogućeg toksikogenog učinka sterigmatocistina, cilj našeg istraživanja je bio utvrditi učestalost *A. versicolor* vrste u uzorcima zemlje, zraka, bilja u vegetaciji, uskladištenih žitarica i suhomesnatih proizvoda, te utvrditi toksikogenost sojeva ove vrste u postupku biosinteze in vitro.

MATERIJAL I METODE

Tokom mikoloških ispitivanja distribucije spora plijesni na širem području Republike Hrvatske pretraženo je ukupno 1295 uzoraka. Ispitano je 50 uzoraka različitih vrsta tla sakupljenih sa livada, polja, vrtova i dvorišta. Na geografski različitim lokacijama sakupljeno je i mikološki pretraženo 305 uzoraka zraka.

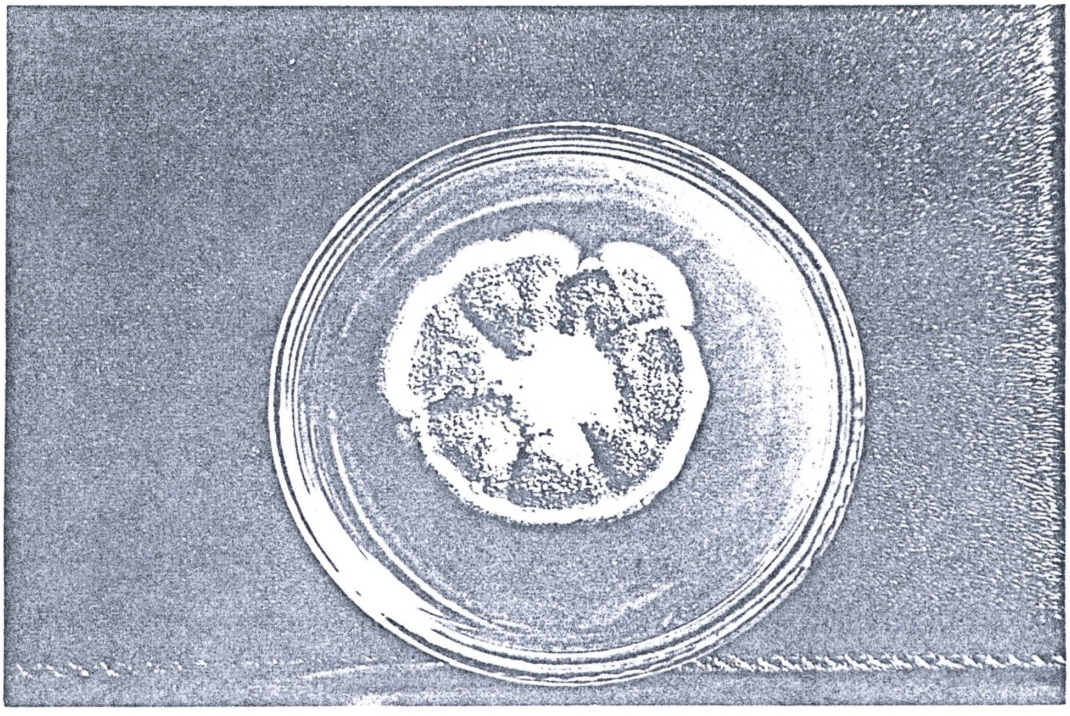
U razdoblju ljetnih mjeseci za mikološka ispitivanja bilja u vegetaciji sabrano je sa njiva 260 uzoraka klasja žitarica prije žetve, listova kukuruza, djeteline, raznog povrća, okolnog bilja i trava na kojima nije bilo vidljivih znakova kvarenja.

Biosintezom na vlažnoj pšeničnoj prekrupi (25 g, 40 % vlage u 250 ml Erlenmayer bocama) ispitana je sposobnost tvorbe sterigmatocistina (ST) i aflatoksina (AF) 25 sojeva *A. versicolor*. Sterilna pšenična prekrupa (121°C/1 sat) inokulirana je sa 1 ml suspenzije oko 10^6 spora.

Kvalitativna i polukvantitativna determinacija sterigmatocistina provedena je metodom tankoslojne kromatografije (TLC) prema Stack i Rodricks (9).

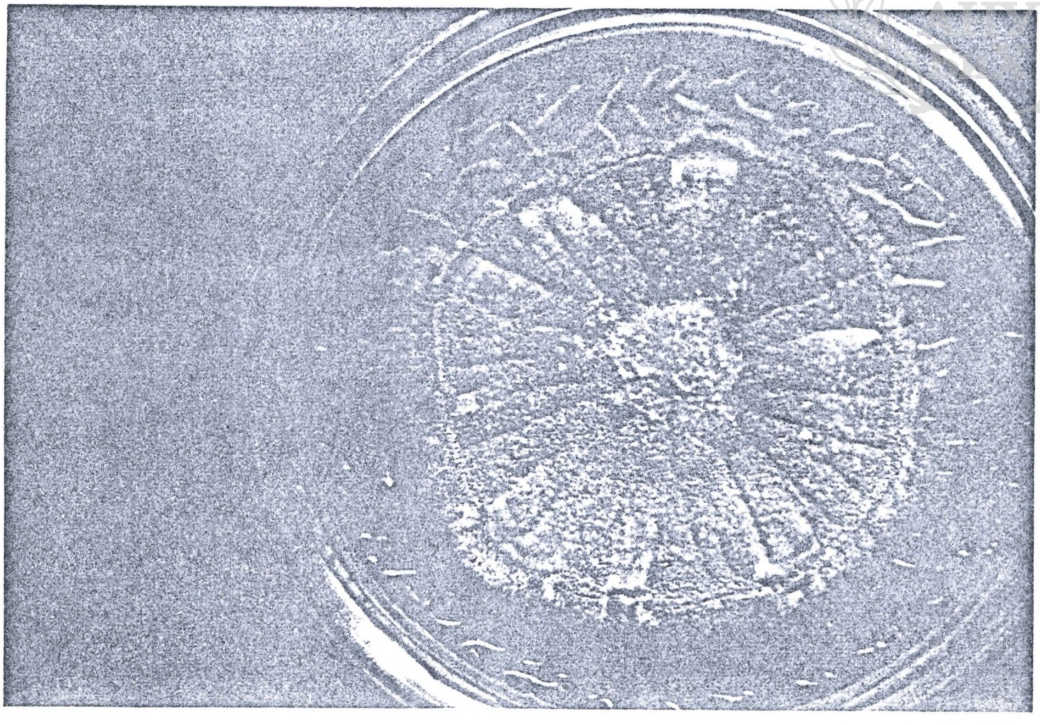
Kao test kultura plijesni uzet je soj *A. versicolor* T–37 dobiven od dr. P. Lepom (Acad. of Agricul. Sci. of Germany).

Ekstrakcija toksina iz biomase vršena je pomoću acetonitrila i otopine kalijeva klorida (9+1) te vode sa kloroformom. Kloroformski ekstrakti uzoraka upareni su do suha i resuspendirani u 0,2 ml klorofrma te nanešeni na silika gel H kromatografske ploče u količini 1 μl, 5 μl i 10 μl, te su uspoređivane Rf vrijednosti i svojstva fluoroscencije sa standardnom sterigmatocistina (ST Carol ROTH–D 75) u koncentraciji 50 μg/ml.



Sl. 1 – Kolonija A. versicolor producent sterigmatocistima (10 dana rasta na cropek podlozi na 27°C)

Sl. 2 – Karakterističan oblik kolonije A. versicolor: nepravilno, radijalna izbrazdana kolonija sa pahuljičastim centrom i baršunastim rubovima, nakon 20 dana na cropek podlozi



ANU BiH

Biosintezom na vlažnoj pšeničnoj prekrupi (25 g, 40% vlage u 250 ml Erlenmayer bocama) ispitana je sposobnost tvorbe sterigmatocistina (ST) i aflatoksina (AF) 25 sojeva *A. versicolor*. Sterilna pšenična prekrupa (121°C/1 sat) inokulirana je sa 1 ml suspenzije oko 10^6 spora.

Kvalitativna i pokukvantitativna determinacija sterigmatocistina provedena je metodom tankoslojne kromatografije (TLC) prema Stack i Rodricks (9).

Kao test kultura plijesni uzet je soj *A. versicolor* T-37, dobiven od dr. P. Lepom (Acad. of Agricul. Sci. of Germany).

Ekstrakcija toksina iz biomase vršena je pomoću acetonitrila i otopine kalijeva klorida (9+1) te vode sa kloroformom. Kloroformski ekstrakti uzoraka upareni su do suha i resuspendirani u 0,2 ml kloroforma, te nanešeni na silika gel H kromatografske ploče u količini 1 μl, 5 μl i 10 μl. Zatim su uspoređivane Rf vrijednosti i svojstva fluorescencije sa standardom sterigmatocistina (ST Carol ROTH-D 75) u koncentraciji 50 μg/ml.

Kao razvijač upotrebljen je sistem otapala kloroform : aceton : heksan (85+15+20).

Promatranjem kromatograma pod UV svjetlom valne dužine 365 nm, sterigmatocistin se pojavljuje kao cigla crvena fluorescentna točka kod Rf cca 0.6. Potvrdni test proveden je prskanjem kromatograma 20% etanolnom otopinom $AlCl_3$ i žarenjem ploče 10 min. na 100°C. Ponovnim promatranjem pod UV svjetlom sterigmatocistin daje svijetložutu fluorescenciju. Za svaki pozitivni nalaz uz ovaj test proveden je i postupak dvodimenzionalne kromatografije (10).

REZULTATI I DISKUSIJA

Utvrđivanjem distribucije spora plijesni roda Aspergillus s posebnim osvrtom na vrstu *A. versicolor* mikološkim pretragama većeg broja različitih uzoraka utvrđene su aspergile u 29.6% (384/1295) uzoraka. Od ukupnog broja izoliranih aspergila, *A. versicolor* vrsta činila je 8.5% (33/384), odnosno 2.5% (33/1295) u odnosu na broj pretraženih uzoraka.

U pretraženim uzorcima tla, iako su aspergile dokazane u 16.0% (8/50), vrsta *A. versicolor* nije utvrđena (tablica 1).

Aspergile nisu bile česte ni na uzorcima bilja u vegetaciji i javile su se u 5.7% (15/260) uzoraka, a *A. versicolor* vrsta u 6.6% (1/15), odnosno u 0.3% (1/260) od ukupno mikološki pretraženih uzoraka.

Spore aspergila u zraku činile su 17.7% (54/305) i zauzimale su peto mjesto po učestalosti iza rodova Cladosporium, Penicillium, Alternaria i Absidia. *A. versicolor* vrsta relativno je često izolirana iz zraka u 27.7% (15/54) odnosno u 4.9% (15/305) ukupnog broja uzoraka, a slijedila je plijesan *A. glaucus* (11/3%).

Tablica 1. NALAZ ASPERGILA U OKOLIŠU, SKLADIŠTIMA, SMOČNICAMA

Uzorci	Broj ispitanih uzoraka	Rod Aspergillus		Vrsta			
				Aspergillus		versicolor	
		n	%	n	%[1]	%[2]	IK
Tlo	50	8	16.0	-	-	-	-
Bilje u veget.	260	15	5.7	1	6.6	0.3	1
Zrak	305	54	17.7	15	27.7	4.9	1
Skladišta:							
Grah	65	40	61.5	2	5.0	3.0	1
Kukuruz	65	13	20.0	-	-	-	-
Pšenica, zob	85	33	38.8	-	-	-	-
Krmne smjese	35	14	40.0	-	-	-	-
Kikiriki	25	16	64.0	-	-	-	-
Soja	20	8	40.0	-	-	-	-
Ukupno:	285	124	43.5	2	1.6	0.7	1
Smočnice:							
Slanina	160	56	35.0	8	14.2	5.0	1-4
Šunka	130	72	55.3	5	6.9	3.8	1-5
Kobasice	80	37	46.2	2	5.4	2.5	1
Pršut	25	18	72.0	-	-	-	-
Ukupno	395	183	46.3	15	8.2	3.8	1-5
Ukupno svih uzoraka:	1295	384	29.6	33	8.5	2.5	1-5

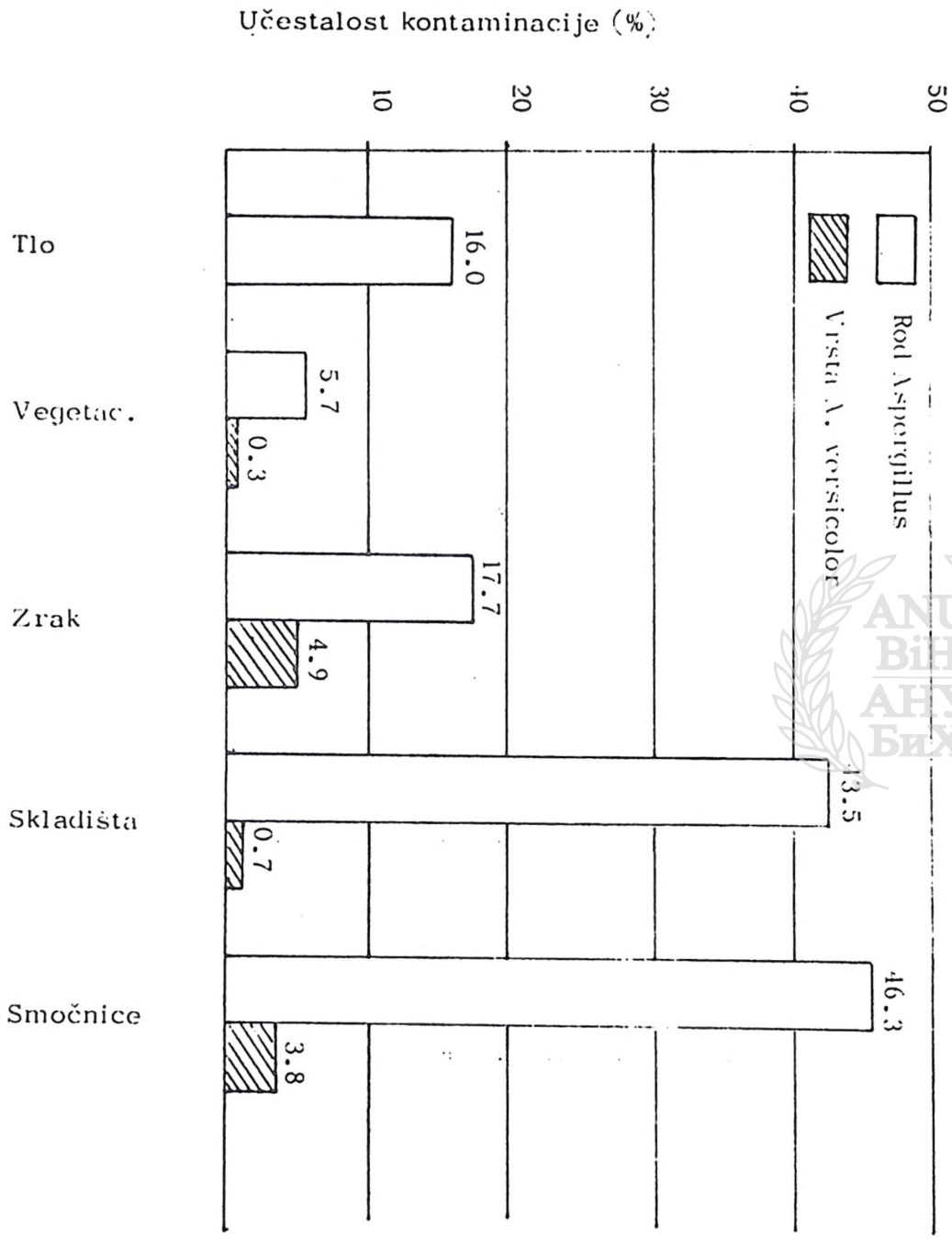
Učestalost pojavljivanja plijesni iz roda Aspergillus u skladištima iznosila je 43.5% (124/285) a najveća je bila na uzorcima graha 61.5% (40/65) i uzorcima kikirikija 64.0% (16/25) od sveg uskladištenog zrnevlja. Vrsta *A. versicolor* dokazana je samo na grahu u 5.0% (2/40), odnosno u 3.0% (2/65) od ukupno pretraženog uskladištenog graha.

Na uzorcima suhomesnatih prerađevina iz smočnica učestalost aspergila iznosila je 46.3% (183/395), a na uzorcima šunke 55.3% (72/130) i uzorcima pršuta 72.0% (18/25) aspergile su dominirale, međutim sa pršuta nije izoliran nijedan soj *A. versicolor* vrste. Na drugim uzorcima ova plijesan javila se u 8.2% (15/183) odnosno 3.8% (15/395).

Na graf. 1 prikazan je nalaz plijesni roda Aspergillus i vrste *A. versicolor* u odnosu na broj pretraženih uzoraka. Plijesni roda Aspergillus dominirale su u skladištima i smočnicama, a vrsta *A. versicolor* u zraku (graf. 1).

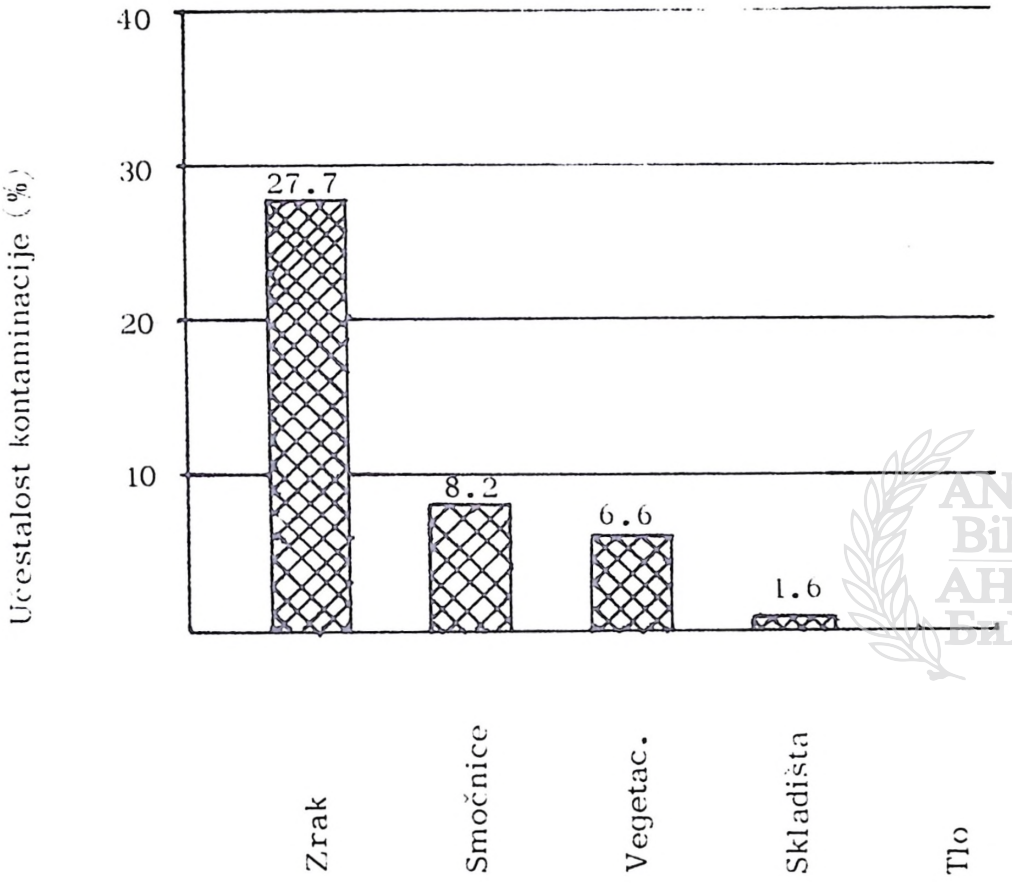
Učestalost *A. versicolor* vrste u odnosu na ukupan broj utvrđenih aspergila prikazana je na graf. 2.

Vrsta *A. versicolor* dominirala je u zraku (27.7%), a najniža učestalost dokazana je u skladištima (1.6%), dok iz uzoraka tla nije izolirana.



Graf.1. Učestalost plijesni roda *Aspergillus* i vrste *A. versicolor* u odnosu na broj ispitanih uzoraka

ANU BiH
АНУ БиХ



Graf.2. Učestalost *A. versicolor* vrste u odnosu na ukupan broj izoliranih aspergila

Toksikogena sposobnost tvorbe sterigmatocistina i aflatoksina B_1 B_2 G_1 i G_2 provedena je na petnaest sojeva *A. versicolor* izoliranih iz zraka i deset sojeva izoliranih iz uzoraka slanine, šunke i kobasica. Sposobnost tvorbe sterigmatocistina (sterigmatocistinogenost) imalo je 32.0% (8/25) sojeva u rasponu koncentracije 4.0-480.0 mg ST/kg. Nijedan ispitani soj nije tvorio aflatoksine (tablica 2).

Tablica 2. STERIGMATOCISTOGENOST SOJEVA *Aspergillus versicolor*

Porijeklo sojeva	Broj ispitanih sojeva	Produkcija toksina		Broj i % toksikogenih sojeva		Sterigmatocistin
		ST	AF			mg/kg
Zrak	15	+	-	6	40.0	4.0-480.0
Slanina	5	+	-	1	20.0	16.0
Šunka	3	-	-	-	-	-
Kobasica	2	+	-	1	50.0	120.0
T-37	/	+	-	/	/	420.0
Ukupno	25	(+-)	-	8	32.0	4.0-480.0

T-37 referentni soj

Rezultati mikoloških pretraga uzoraka tla sa različitih i geografski udaljenih područja širom svijeta ukazuju na varijabilnost učestalosti plijesni u tlu.

U našim nalazima vrste rodova Rhizopus, Absidia, Mucor i Fusarium su najčešće izolirane plijesni. Najučestalije vrste roda Aspergillus su *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans* i *A. terreus*.

Na bilju u vegetaciji i raznim vrstama usjeva prije žetve dominiraju uglavnom "plijesni polja" sa rodovima Fusarium, Alternaria i Cladosporium.

Slične rezultate dobili smo u našim ranijim istraživanjima, gdje su ove plijesni bile zastupljene u uzorcima od 20.0-100.0% (5, 9). Aspergillus vrste u 5.7% i *A. versicolor* u 0.3% pokazuju da su one rijetko prisutne na bilju u vegetaciji, dok su učestalije u skladištima i smočnicama kao tzv. "skladišne plijesni".

Plijesni roda Aspergillus često su prisutne u zraku širom svijeta i mogu se smatrati tzv. "univerzalno dominantnim" vrstama uz vrste iz rodova Alternaria, Cladosporium, Penicillium, Fusarium i neke druge (11). Literaturni podaci ukazuju na relativno česti nalaz aspergila u zraku, od 2.8% u zraku Barcelone (12) do 79.0% u zraku Kartuma (Sudan) (13). Zanimljiv je nalaz učestalosti aspergila u 95.0% uzoraka zračne prašine u Taifu (Saud. Arabija), gdje je dokazano 13 vrsta, među kojima su dominirale *A. niger*, *A. flavus*, *A. sydowi* i *A. versicolor* (14).

Pojavljivanje spora plijesni u zraku ima sezonski karakter, pa je tako varijacija učestalosti nalaza aspergila češća u zimskom razdoblju (12, 15).

Naši nalazi aspergila u 17.7% ukazuju na osrednju učestalost spora ovih plijesni u zraku, a vrsta *A. versicolor* u 4.9% uzoraka zauzima prvo mjesto po učestalosti u odnosu na izolate sa bilja u vegetaciji, (0.3%) uskladištenih žitarica (0.7%) i uzoraka iz smočnica (3.8%).

Mikološka ispitivanja uzoraka uskladištenih žitarica, krmnih smjesa za tov, zrna kikirikija i soje pokazuju visoku učestalost kontaminacije uzoraka tzv. "skladišnim plijesnima", prije svega vrstama roda Penicillium (78.0%) i Aspergillus (43.5%). Nalaz *A. versicolor* u 0.7% uzoraka ukazuje na relativno nisku učestalost

ove plijesni u skladištima. Od ukupno 285 raznih uskladištenih uzoraka, ova vrsta dokazana je u dva uzorka graha. Kontaminacija uzoraka iz skladišta češća je vrstama *A. flavus* (15.0%) i *A. ochraceus* (10.8%) (16).

Sličnu dominantnu mikrofloru "skladišnih plijesni" Penicillium (86.0%) i Aspergillus (70.0%) pokazala su naša ranija istraživanja mikološke kontaminacije uzoraka iz smočnica (17). Niža učestalost Aspergillus vrsta (46.3%) u ovom istraživanju ukazuje samo na varijabilnost pojavljivanja onih plijesni u smočnicama, a nalaz *A. versicolor* vrste u 3.8% uzoraka suhog mesa u odnosu na učestalost u skladištu (0.7%) ili na bilju u vegetaciji (0.3%) ukazuju da su suhomesnati proizvodi češće kontaminirani ovom vrstom plijesni, a što može biti od značaja s obzirom na moguću toksikogenost.

U literaturi nalazimo podatke o relativno visokom postotku toksikogenih sojeva. Lepom i Kloss (18) su izolirali sa uzoraka sijena i slame tokom zime *A. versicolor* u 14.5% uzoraka. Testiranjem 19 sojeva, svi su tvorili sterigmatocistin u koncentracijama većim od 500 mg/kg. Također Orth (19) nalazi 60.0% producenata sterigmatocistina od 90 ispitanih sojeva *A. versicolor* izoliranih iz stočne hrane.

Naši rezultati 32.0% toksikogenih sojeva ukazuju na široki raspon u stupnju toksikogenosti. Prema količinama stvorenog toksina možemo sojeve *A. versicolor* svrstati u slabe (4.0 mg ST/kg) i dobre (480.0 mg ST/kg) proizvođače sterigmatocistina.

Izvještaje o visokotoksikogenim sojevima i prinosu sterigmatocina od 5-12 g/kg supstrata iznose Steyn i Rabie (5) te Rabie i sur. (6). Postignuti prinos dobiven je biosintezom na cijelom zrnu kukuruza na 27°C kroz 22 dana.

Vlažna pšenična prekrupa kao kruti substrat u biosintezi sterigmatocistina također se u literaturi navodi kao vrlo pogodan substrat na kojem je dobiven prinos od 6267.0 μg ST/ g substrata. U odnosu na kukuruzno brašno, ječam, rižu i neke tekuće kemijski definirane hranjive podloge, veći prinos (9600.0 μg ST/g) postignut je na krušnim mrvicama (20). Svi dobiveni rezultati postignuti su u optimalnim laboratorijskim uvjetima.

S obzirom na moguću kontaminaciju hrane (ljudi i životinja) sa *A. versicolor* plijesni i poznatu patogenost sterigmatocistina, ovaj toksin spada u mogući rizični faktor za zdravlje ljudi i životinja.

ZAKLJUČAK

- Na osnovu provedenih mikoloških analiza 1295 uzoraka tla, bilja u vegetaciji, zraka, uskladištenih žitarica i suhomesnatih proizvoda, plijesni roda Aspergillus javile su se u rasponu 5.7-46.3%, a dominirale su na uzorcima iz skladišta (43.5%) i smočnica (46.3%).

- Vrsta *A. versicolor* sa 4.9% bila je najčešća u zraku, a nije izolirana ni iz jednog uzorka tla.

- Provedenom biosintezom utvrđeno je 32.0% (8/25) *A. versicolor* sojeva proizvođača sterigmatocistina. Sposobnost tvorbe ovog toksina različita je u pojedinih sojeva i kreće se od 4.0 mg-480.0 mg ST/kg pšenične prekrupe.

- Najbolji proizvođač sterigmatocistina izoliran je iz zraka i proizveo je 480.0 mg ST/kg, dok su sojevi iz suhomesnatih proizvoda tvorili između 16.0 i 120.0 mg ST/kg.

Nijedan soj *A. versicolor* nije dokazan kao producent aflatoksina.

FREQUENCY AND TOXICOGENICITY OF *Aspergillus versicolor* STRAINS ON THE AREA OF REPUBLIC CROATIA

S u m m a r y

Mycological analyses of 1295 samples of soil, plants in vegetation, air, stored grains and dried meat collected in R. Croatia showed 5.7-46.3% of samples to be contaminated by moulds of genus Aspergillus. The most frequently occurrence of Aspergillus spp were in the samples of stored grains (43.5%) and the samples of dried meat products (46.3%). *Aspergillus versicolor* species was predominant in the samples of air (4.9%) with contamination intensity of 1-5 (max.5).

A biosynthetic procedure on sterile moist crushed wheat was provided on 25 *A. versicolor* strains. The strains tested for sterigmatocystin and aflatoxin production were isolated from the air, bacon, smoked ham and sausages.

The identity and quantity of sterigmatocystin in the extracts were determined by thin-layer-chromatography (TLC).

Out of 25 *A. versicolor* strains 8/25 (32.0%) produced sterigmatocystin (conc.. ST 4.0-480.0 mg/kg). The strongest producer was isolated from the air.

Out of all examined strains no one produced aflatoxins.

L I T E R A T U R A

(1) Hamasaki, T., Yuichi, H. (1977): *Sterigmatocystin and related compounds*. In: Rodricks, J.V. et al. (eds). Mycotoxins in human and animal health, Pathotox Publishers, INC, Illinois, pp 597-607.

(2) Purchase, I. F. H., Van der Watt, J. J. (1970): *Carcinogenicity of sterigmatocystin*. Food Cosmetol. Toxicol., 8, 289-295.

(3) Van der Watt, J. J. (1974): *Sterigmatocystin*. In I.F.H. Purchase (ed), Mycotoxins, Elsevier, Amsterdam, p. 369-382.

(4) Schroeder, H. W., Kelton, W. H. (1975): *Production of sterigmatocystin by some species of the genus Aspergillus and its toxicity to chicken embryos.* Appl. Microbiol., 30, 589-591.

(5) Steyn, M., Rabie, C. J. (1975): *Production of sterigmatocystin.* J. of the AOAC, 58, 622-623.

(6) Rabie, C. J., Lübben, A., Steyn, M. (1976): *Production of sterigmatocystin by Aspergillus versicolor and Bipolaris sorokiniana on semisynthetic liquid and solid media.* Appl. Environ. Microbiol., 32, 206-208.

(7) Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z. (1985): *Plijesni bilja u vegetaciji na nefropatičnom i anefropatičnim područjima SR Hrvatske.* Acta Biologica Iugoslavica, Ser. B, Mikrobiologija, 22, 51-57.

(8) Raper, K. B., Fennell, D. J. (1965): *The Genus Aspergillus.* The Will. and Wilk. Co., Baltimore.

(9) Stack, M., Rodricks, J. V. (1971): *Method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin.* J. of the AOAC, 54, 86-90.

(10) Van Egmond, H. P., Paulsch, W. E., Deijll, E., Schuller, P. L. (1980): *Thin layer chromatographic method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin in cheese.* J. of the AOAC, 63, 110-114.

(11) Al-Doory, Y., Domson, J. P., Howard, W. A., Sly, R. M. (1980): *Air borne fungi and pollens of the Washington, D.C., metropolitan area.* Ann. Allerg., 45, 360-367.

(12) Calvo, M. A., Guarro, J., Suarez, G., Ramirez, C. (1980): *Air borne fungi in Barcelona city (Spain).* III. The genus Aspergillus Link. Mycopathol., 71, 41-43.

(13) Abdalla, M. H. (1988): *Prevalence of airborne Aspergillus flavus in Kartoum (Sudan). Air spora with reference to dusty weather and inoculum survival in simulated summer conditions.* Mycopathol., 104, 137-141.

(14) Abdel-Hafez, S. I. I. (1985): *Survey of airborne fungus spores of Taif, Saudi Arabia.* Mycopathol., 88, 39-44.

(15) Larsen, L. S. (1981): *A three-year-survey of microfungi in the air of Copenhagen 1977-79.* Allerg., 36, 15-22.

(16) Cvetnić, Z. (1987): *Raširenost i toksogenost Aspergillus flavus i Aspergillus ochraceus vrsta na području SR Hrvatske.* Disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet.

(17) Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S. (1986): *Distribucija i nalaz toksogenih vrsta plijesni na suhomesnatim proizvodima.* Vet. arhiv, 56, 75-82.

(18) Lepom, P., Kloss, H. (1988): *Production of sterigmatocystin by Aspergillus versicolor isolated from roughage.* Mycopathol., 101, 25-29.

(19) Orth, R. (1977): *Occurrence and estimation of sterigmatocystin producing strains of Aspergillus versicolor in foodstuffs.* Zesz. Probl. Postepow. Nauk Roln., 189, 25-33.

(20) Bennett, J. W., Henderberg, A., Grossman, K. (1989): *Sterigmatocystin production on complex and defined substrates.* Mycopathol., 105, 35-38.

POJAVA ZNATNIH KOLIČINA AFLATOKSINA M_1 U HLOROFORMSKOM EKSTRAKTU KES SUPSTRATA NAKON KULTIVACIJE PLESNI *Aspergillus flavus* MP_1

MARIJA ŠUTIĆ I MILENA NIKOLIĆ

Poljoprivredni fakultet, Zemun
Institut bezbjednosti Beograd

Apstrakt. *Asp. flavus* MP_1 u tekućoj podlozi sa dodatkom kvaščeva ekstrakta pokazao je najveću biomasu pri temperaturi od 30°C i pH 3,5. Najbolji uslovi za stvaranje aflatoksina B_1, G_1, B_2 i G_2 bili su pri temperaturi od 25°C i pH 5,5. Najbolji uslovi za stvaranje AFM_1 utvrđeni su pri temperaturi od 30°C i pH 3,5.

Aflatoksini predstavljaju porodicu visokotoksičnih kancerogenih mikotoksina proizvedenih sekundarnim metabolitskim dejstvom plesni *Aspergillus flavus* ili *Aspergillus paraziticus*. Kao što je poznato, aflatoksin B_1 je među njima najtoksičniji, a plesni ga proizvode kod većine sojeva u najvećoj količini. Prema većini autora, mali broj plesni proizvođača aflatoksina ima sposobnost za stvaranjem većih količina aflatoksina M_1. Aflatoksin M_1 otkriven je kod sisara koji su za ishranu koristili hranu u kojoj se nalaze ovi toksini i predstavljaju njihov metabolitski produkt, koji se može identifikovati u mleku, urinu i mišićnom tkivu. U ovom radu izneti su neki ekološki faktori koji imaju uticaja na stvaranje povećanih količina aflatoksina M_1.

MATERIJAL I METOD RADA

Organizam: *Aspergillus flavus* MP_1 iz kolekcije Marije Šutić (1), Institut za mikrobiologiju, Poljoprivredni fakultet, Zemun.

Inokulum proizvedenog organizma formiran je na sladnom agaru inkubacijom na 25°C u trajanju od 6 dana radi dobrog formiranja spora. Suspenzija spora u fiziološkom rastvoru dobijena je tehnikom brisa.

Za rad je upotrebljena tečna podloga, koja se kod prethodnih ispitivanja pokazala najbolja sa stanovišta produkcije aflatoksina i biomase (3), ali sa duplo većom količinom kvaščevog ekstrakta. Sastav podloge je: 4% kvaščevog ekstrakta i 20% saharoze.

Po 20 ml podloge razliveno je u 21 erlenmajer i sterilisano na 115°C u vremenu od 15 minuta; pH-vrednost podloge podešena je dodavanjem sterilne 10% HCl. Količina kiseline, zbog nemogućnosti sterilnog merenja, određena je u "slepom" uzorku, a zatim je u aseptičnim uslovima obavljeno dodavanje utvrđenih količine kiseline radi regulisanja željenih pH-vrijednosti. U svih 18 erlenmajera dodat je po 1 ml suspenzije spora.

Uslovi kultivacije

Kultivacija je obavljena na temperaturi od 20, 25 i 30°C u trajanju od 10 dana. Nakon isteka tog vremena izvršeno je biološko inaktiviranje spora toplotom.

Ekstrakcija toksina

Ekstrakcija se obavlja tako što se u ohlađeni supstrat doda 100 ml hloroforma, posle čega se obavlja mešanje u trajanju od 1 minuta. Ovaj supstrat se filtrira kroz fiter-papir tipa Carl Schleicher S Schül No. 388. Filtrat se tretira još dva puta sa po 100 ml hloroforma. Sakupljeni hloroformski ekstrakt se uparava do suva i rastvara u 5 ml mešavine benzolacetonitrila (98+2) i kao takav se koristi za analizu. Micelija se suši na temperaturi od 85°C u trajanju od 6 sati do konstantne težine (3).

Analiza

Za analizu je primenjena tankoslojna hromatografija. U radu su korišćene kvantitativne Al-ploče DC-Karten SI 20x20 cm. Reidel De-Haen Aktiengeselischaft, Seelze-Hannover. Radi pouzdanije detekcije aflatoksina M_1 korišćena je dvodimenzionalna TLC. Na obeleženu ploču 20x20 cm (sl. 1) nanese se 20 μl uzorka i 2,4,6 μl standarda ili odgovarajuća količina standarda. Ploča se razvija u rastvoru I: voda-metanol-etar (1+4+95) u "prvom" pravcu. Nakon razvijanja, ploča se suši a zatim razvija u "drugom" pravcu u rastvaraču 2-propanol-aceton-hloroform (3+10+87). Količina aflatoksina M_1 određuje se vizuelnom procenom koncentracije (4). Postignuti efekti razdvajanja su prikazani na sl. 1 i 2.

Aflatoxini B_1, B_2, G_1 i G_2 detektovani su pomoću TLC-metode jednodimenzionalnom hromatografijom (sl. 1.).

DISKUSIJA

Dobijeni rezultati ukazuju na odnos između aflatoksina B_1 i aflatoksina M_1. Tamo gde su uslovi za sintezu AT B_1 nepovoljni stvaraju se veće količine AT M_1. Takođe se na osnovu dobijenih rezultata uočava da količina stvorenih AT B_1 i B_2 nije upravo proporcionalna količini stvorene biomase, što naročito dolazi do izražaja na temperaturi od 30°C.

REZULTATI

Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1.

Temperatura °C	20			25			30		
pH	5,5	4,5	3,5	5,5	4,5	3,5	5,5	4,5	3,5
Biomasa g/100ml	1,0	2,0	2,3	2,5	2,7	2,8	2,6	2,7	3,0
ATM_1 g/100ml	0,03	0,03	0,03	0,03	0,12	0,17	0,03	0,17	0,28
ATB_1 g/100ml	3,0	2,5	0,5	4,0	2,5	0,1	2,5	1,5	0,5
ATG_1 g/100ml	t	t		t	t		t	t	
ATB_2 g/100ml	4,2	2,0	0,5	5,0	2,5	0,1	4,0	2,0	0,5
ATG_1 g/100ml	0,50	0,25	0,01	0,50	0,25	tt	0,50	0,25	0,10

ZAKLJUČAK

Kod ispitivanja soja *Asperqillus flavus* MP_1 utvrđeno je da su najbolji uslovi stvaranje biomase na temperaturi od 30°C pri pH 3,5. Najbolji uslovi za stvaranje aflatoksina B_1, G_1, B_2 i G_2 su na temperaturi od 25°C pri pH 5,5. najbolji uslovi za stvaranje AT M_1 su na temperaturi od 30°C pri pH-vrednosti 3,5.

PRODUCTION OF SIGNIFICANT QUANTITIES OF AFLATOXIN M_1 IN CHLOROFORM EXTRACTS IN YEASTS SUBSTRATE BY *Asp. flavus* MP_1 STRAIN CULTIVATION

Summary

The authors investigated optimal growth conditions for *Asp. flavus* (strain MP_1, from the Institute collection) and determined that the best medium was yeast extract. The greatest biomass was produced at the temperature of 30°C and pH value of 3,5. The best conditions for production of AFB_1, G_1, B_2 and G_2 were at the temperature of 25°C and pH 5,5. The most favorable conditions for AFM_1 were determined at the temperature of 30 °C and the pH value of 3,5.

LITERATURA

(1) M. F. Dutton, K. Erlich and J. W. Bannett (1985): *Biosynthetic Relationship among Aflatoxins B_1, B_2 and M_2.* Applied and Environmental Microbiology, Vol. 49, No. 6: 1392-1395.

(2) Vladimir Betina (1984): *Mycotoxins,* Elsevier.

(3) Šutić, Marija, Ayers, J. C. Koehler, P. E. (1972): *Identification and aflatoxin production of molds isolated from country cured hams.* Appl. Micr., 23(3): 656-658.

(4) M. Nikolić (1991): *Uticaj ekoloških faktora na stvaranje biomase i biosintezu aflatoksina.* Nauka i bezbjednost, III savjetovanje, Beograd.

(5) Arun Sharma, S. R. Padwal-Desai and G. B. Nadkarni (1985): *Applied and Env.* Microb., 49(1): 79-82.

(6) Second Worksop on Mycotoxin Analysis (1985): National Research Center, Cairo.

ANU BiH АНУ БиХ

NEKI EFEKTI T-2 TOKSINA NA *rec* MUTANTE *Escherichia coli*

SONJA DULETIĆ

Institut za botaniku Biološkog fakulteta PMF, Beograd

Apstrakt. Efekat T-2 toksina na DNK bakterija je ispitivan korišćenjem divljeg tipa *E. coli* i različitih mutanata defektnih u rekombinaciji i postreplikativnoj reparaciji (*rec* sojevi). Toksičnost T-2 toksina je testirana delovanjem različitih doza na preživljavanje bakterija. Osim toga, pošto je poznato da agensi koji oštećuju DNK dovode do SOS odgovora, ispitivan je i potencijal T-2 toksina za indukciju SOS funkcija kod *rec*$^+$ i *rec*F sojeva, što je praćeno preko jedne od SOS funkcija - ćelijske filamentacije.

Prema dobijenim rezultatima se može zapaziti da T-2 toksin u ispitivanim koncentracijama dovodi do malog broja prekida u DNK ili da se oni brzo repariraju.

1. UVOD

Zbog sve većeg zagađivanja životne sredine hemijskim i fizičkim agensima, među kojima su i mikotoksini značajni prirodni polutanti, (a za neke od njih je saopšteno da su mutageni i kancerogeni), razvijeni su brojni testovi za brzu detekciju mutagenih agenasa. U ovim testovima često se primenjuju različiti mikroorganizmi koji su zbog svojih osobina—malih dimenzija, brzog rasta, haploidnog genoma, veoma pogodni za proveru mutagenosti i potencijalne kancerogenosti hemijskih jedinjenja. Testovi se zasnivaju na promenama genotipa i otkrivanju mutanata koji nastaju posle delovanja hemijskih agenasa, pri čemu su bakterijski sojevi kojima nedostaju mehanizmi reparacije DNK mnogo osetljiviji od normalnih sojeva.

U literaturi se mogu naći podaci da su za detekciju aktivnosti mikotoksina (među njima i T-2 toksina), osim kultura sisarskih ćelija i sisarskih organizama (Bamburg i Strong, 1971; Schoental i Joffe 1974; Ueno, 1984; Anderson i sar., 1989), korišćeni i neki mikroorganizmi - *S. typhimurium* (Ueno i sar., 1978); *B. subtilis* (Ueno i Kubota, 1976) i druge bakterije (Burmeister i Hesseltine, 1970). Tako je, npr., među brzim testovima za odre-

divanje toksičnosti i mutagenosti različitih agenasa, korišćen Rec test sa *B. subtilis* za detekciju mikotoksina (Ueno i Kubota, 1976).

Tokom ovog rada vršena su ispitivanja dejstva T-2 toksina na preživljavanje odabranih *rec* mutanata *E. coli* i njegov potencijal za indukciju SOS funkcija, što je praćeno preko ćelijske filamentacije.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. BAKTERIJSKI SOJEVI

U eksperimentalnom radu su korišćeni sojevi bakterije *Escherichia coli* K12 navedeni u Tabeli 1.

Tabela 1. BAKTERIJSKI SOJEVI

Soj	Genotip	Poreklo
AB1157	F⁻ *thi*-1 *his*-4 *pro*A2 *arg*E3 *thr*-1 *leu*B6 *ara*-14 *lac*Y1 *gal*K2 *xyl*-5 *mtl*-1 *rps*L31 *sup*E44 *tsx*-33	K. B. Low
AB2470	kao AB1157 ali *rec*B21	K. B. Low
DL130	kao AB1157 ali *rec*C22	A. Taylor
DL131	kao AB1157 ali *rec*F143	A. Taylor
DL 132	kao AB1157 ali *rec*B21*rec*F143	A. Taylor
SP254	kao AB1157 ali *rec*N262	M. Radman
AB2463	kao AB1157 ali *rec*A13	K. B. Low

ANU BiH АНУ БиХ

2.2. HRANLJIVE PODLOGE

2.2.1. *Medijum za održavanje bakterija*

Za održavanje bakterijskih sojeva korišćen je: LA-Luria agar, koji na 1000 ml destilovane vode sadrži: 5 g NaCl, 5 g ekstrakta kvasca, 10 g kazein hidrolizata i 15 g agara.

2.2.2. *Medijumi za testiranje dejstva T-2 toksina na bakterijske sojeve*

Za rast bakterija korišćen je:

- *LB-Luria broth*, bogati medijum koji na 1000 ml destilovane vode sadrži: 5 g NaCl, 5 g ekstrakta kvasca i 10 g kazein hidrolizata i
- *LA-Luria agar.*

Za određivanje titra bakterija razblaženja su pravljena u $MgSO_4$ 10^{-2}M.

2.3. BOJENJE BAKTERIJSKIH PREPARATA

Za bojenje preparata je korišćena bazna boja metilensko plavo. Priprema: 0,3 g metilenskog plavog se rastvora u 30 ml etanola i rastvoru se dodaje 100 ml destilovane vode.

2.4. STANDARD T-2 TOKSINA

U toku ovih istraživanja dejstva T-2 toksina na bakterije korišćen je standard T-2 toksina iz *Fusarium* sp., čija je anhidrovana molekulska težina 466,5 (SIGMA I SERVA), pri čemu su razblaženja pravljena u apsolutnom etanolu.

2.5. ISPITIVANJE DEJSTVA T-2 TOKSINA NA BAKTERIJSKE SOJEVE

2.5.1. Tretiranje T-2 toksinom za određivanje preživljavanja

Prekonoćne kulture bakterija su razblažene i inkubirane na 37°C uz aeraciju (180 o/min). U logaritamske kulture bakterija (O.D.610=0,2-0,25) dodavan je T-2 toksin finalne koncentracije 0, 25, 50, 100 i 200 μg/ml. Inkubacija je vršena 10 odnosno 40 minuta na 37°C uz aeraciju, posle čega je određivan titar bakterija pravljenjem razblaženja u $MgSO_4$ 10^{-2}M i zasejavano na LA podlogu po 0,1 ml odgovarajućih razblaženja. Zatim su bakterije inkubirane preko noći na 37°C. Potom je izvršeno prebrojavanje izraslih kolonija i titar bakterija određivan:

$$\frac{\text{srednja vrijednost x 10}}{\text{razblaženje}}.$$

2.5.2. *Merenje filamentoznog rasta*

Poslje dodavanja određenih koncentracija T-2 toksina u logaritamske kulture, bakterije su inkubirane na 37°C uz aeraciju (180 o/min). U određenim vremenskim intervalima su uzimani uzorci, prenošeni na mikroskopske pločice, fiksirani i bojeni metilenskim plavim. Posmatranje i merenje bakterijskih ćelija (najmanje 100 ćelija u uzorku) je vršeno pomoću "Amplival" optičkog mikroskopa pri uvećanju od 400x.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

Iz literature je poznato da T-2 toksin oštećuje DNK (Ueno, 1977; Agrelo i Schoental, 1980; Lafarge-Frayssinet, 1981; Kiessling 1986), pa smo korišćenjem divljeg tipa *E. coli* K12 i različitih mutanata defektnih u rekombinaciji i postreplikativnoj reparaciji (*rec* sojevi) pokušali da detaljnije ispitamo efekat ovog mikotoksina na DNK. Testirali smo toksičnost T-2 toksina ispiti-

vanjem delovanja različitih doza na preživljavanje bakterija, kao i tip oštećenja na DNK molekulu. Ukoliko bi T-2 toksin dovodio do prekida u molekulu DNK, očekivali bismo da rekombinacija bude uključena u reparaciju nakon delovanja toksina. Poređenjem preživljavanja mutanata sa različitim defektima u rekombinacionoj reparaciji jednolančanih ili dvolančanih prekida pokušali smo da bliže odredimo da li T-2 toksin prvenstveno dovodi do jedno - ili dvolančanih prekida DNK. Osim toga, pošto je poznato da agensi koji oštećuju DNK dovode do SOS odgovora (Walker, 1985) ispitivali smo i potencijal T-2 toksina za indukciju jedne od SOS funkcija - ćelijske filamentacije, koju smo koristili kao meru nivoa SOS indukcije.

Na osnovu studija konjugacione rekombinacije kod *E. coli*, nađeno je da postoje tri alternativna puta rekombinacije i postreplikativne reparacije: RecBC(D)-zavisan, RecF-zavisan i RecE-zavisan put (Clark, 1974; Wang i Smith, 1984), pri čemu sva tri puta zahtevaju prisustvo funkcionalnog RecA proteina, koji je produkt *rec*A gena. Ovaj protein je neophodan za homolognu rekombinaciju kod *E. coli*, a uz to reguliše i indukciju SOS odgovora (Armengod, 1982; Walker, 1985). RecBC(D) put je konstitutivan i kod divljeg soja se 99% rekombinacije odvija RecBC(D) putem (Clark, 1973). *rec*B, *rec*C i *rec*D geni kodiraju subjedinice enzima egzonukleaze V (RecBCD enzima).

*Rec*B i *rec*C mutanti su nevarijabilni, defektni u rekombinaciji i osetljivi na agense koji oštećuju DNK (Clark, 1973).

U odsustvu Exo V (kod *rec*B, *rec*C mutanata) dodatne mutacije u sbcB i sbcA genima mogu dovesti do uspostavljanja rekombinacije aktiviranjem RecF, odn. RecE puteva rekombinacije (Clark, 1974; Walker, 1985). Za funkcionisanje RecF puta su, osim produkta recA gena, neophodni i produkti *rec*F, *rec*N, *rec*J, *ruv*, *rec*O, *rec*Q, i *uvr*D (*rec*L) gena (Walker, 1984; Smith, 1988). Pojedinačne mutacije u genima RecF puta imaju malog efekta na konjugacionu rekombinaciju u *rec*BC$^+$ sojevima, ali mutanti pokazuju različitu osetljivost na agense koji oštećuju DNK. Tako su npr. *rec*F mutanti osetljivi na agense koji oštećuju DNK i defektni u rekombinaciji plazmida i λ fag-profag rekombinaciji (Armengod, 1981). RecN mutanti su osetljivi na mitomicin C i jonizujuće zračenje, dok je osetljivost na UV-zračenje neznatno povećana u odnosu na divlji soj (Picksley i sar., 1984). Različita osetljivost mutanata u genima koji pripadaju RecF putu je posledica njihovog različitog udela u reparaciji pojedinih tipova lezija na DNK. Prema tome, pretpostavlja se da je glavna uloga RecF puta u reparaciji DNK. Većina gena ovog puta je pod SOS regulacijom, pa se put aktivira pri oštećenjima DNK, u toku indukcije SOS odgovora. Studiranjem efekata UV-zračenja na različite *rec* mutante *E. coli* nađeno je da je RecBC put potreban u reparaciji dvolančanih prekida na DNK (koji nastaju od nerepariranih jednolančanih prekida), a da je RecF put uglavnom odgovoran za popunjavanje jednolančanih prekida u novosintetisanoj DNK.

3.1. EFEKAT T-2 TOKSINA NA PREŽIVLJAVANJE *rec* MUTANATA

U toku ovog rada je ispitivan efekat T-2 toksina (koncentracija 0-100 μg/ml) na preživljavanje izogenih sojeva *E. coli* koji poseduju mutacije u različitim *rec*

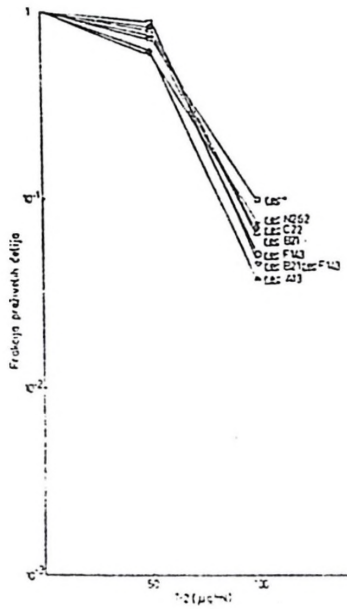
genima i pokazuju različitu efikasnost reombinacionih puteva u reparaciji indukovanih DNK oštećenja.

Rezultati dobijeni ispitivanjem preživljavanja *rec* mutanata posle tretiranja rastućim koncentracijama T-2 toksina u trajanju od deset minuta su prikazani na sl. 1. Zapaža se da se sa povećanjem koncentracije T-2 toksina smanjuje preživljavanje svih ispitivanih bakterijskih sojeva. Svi rec sojevi pokazuju nešto slabije preživljavanje od *rec*$^+$ soja. RecA mutant, defektan u homologoj rekombinaciji, postreplikativnoj i SOS-inducibilnoj reparaciji pokazuje povećanu osetljivost u odnosu na sve ispitivane sojeve, mada se ne zapaža velika razlika u preživljavanju između *recA* soja i divljeg soja, dok ostali *rec* mutanti pokazuju intermedijerno preživljavanje u odnosu na njih. Koncentracija T-2 toksina od 50 μg/ml nema značajniji toksični efekat na ispitivane bakterijske sojeve, već se tek sa koncentracijom od 100 μg/ml smanjuje njihovo preživljavanje. Ovakva priroda krive, gde se zapaža manja osetljivost bakterijskih ćelija do koncentracije od 50 μg/ml, može ukazivati na to da su oštećene druge komponente u ćeliji koje pri tretiranju većim dozama T-2 toksina povećavaju osetljivost ćelija.

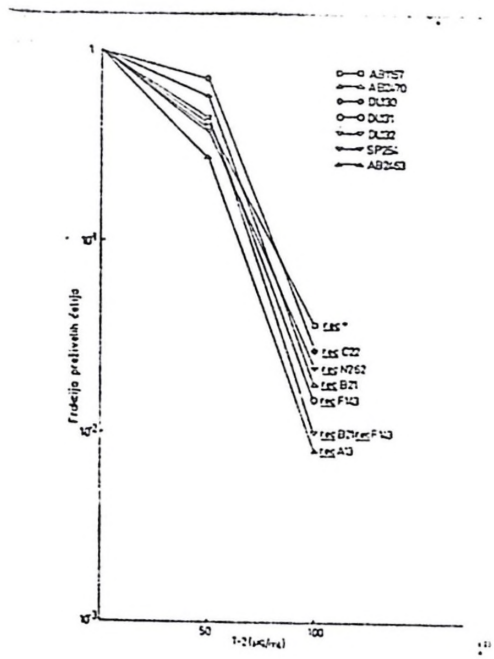
Da bi se bolje ispoljio efekat T-2 toksina, uzimani su uzorci nakon tretiranja u trajanju od 40 min, a rezultati su prikazani na sl. 2. Posle produženog delovanja T-2 toksina, preživljavanje svih ispitivanih sojeva se smanjuje, a najveću osetljivost pokazuju *recA* i *recBrecF* sojevi, defektni u homologoj rekombinaciji i postreplikativnoj reparaciji. Kod svih sojeva se zapaža, kao i kod 10-minutnog tretiranja, blago opadanje preživljavanja do koncentracije od 50 μg/ml i naglo opadanje do koncentracije od 100 μg/ml.

Preživljavanje *rec* mutanata posle delovanja T-2 toksina koncentracije od 100 μg/ml je sumirano na sl. 3. Među sojevima koji pokazuju intermedijernu osjetljivost na T-2 toksin najosjetljiviji je *recF* mutant, koji je defektan u reparaciji DSG (daughter strand gaps). Nešto manje osetljivi od *recF* soja su *recB* i *recC* sojevi, koji su defektni u konstitutivnoj reparaciji dvolančanih prekida DNK i veoma osetljivi na bleomicin i UV-zračenje (Simić i sar., 1990), kao i *recN* soj, defektan u SOS inducibilnoj reparaciji dvolančanih prekida. Pošto u literaturi postoje podaci da T-2 toksin izaziva jednolančane prekide DNK (Laffarge-Frayssinet i sar., 1981), možda se nešto povećana osetljivost sojeva koji nose *recF* mutaciju može objasniti njihovim defektom u reparaciji jednolančanih prekida. U eksperimentima sa eukariotskim organizmima dobijena su ozbiljna oštećenja DNK (jednolančani prekidi) limfoidnih organa pacova, i to posle kratkog izlaganja dejstvu T-2 toksina, dok na hepatičnoj DNK nisu konstatovana oštećenja (Laffarge-Frayssinet i sar., 1981). Schoental i Joffe (1974) su takođe, pri indukovanju lezija kod Rodentia, dobili najveća oštećenja DNK u limfoidnim tkivima, kao i u plućima i digestivnom traktu.

Prema preživljavanju ispitivanih sojeva, vjerovatno da rekombinacija nije značajna kao mehanizam reparacije nakon delovanja T-2 toksina. Može se pretpostaviti da formiranje prekida u molekulu DNK nije primarni mehanizam delovanja ovog toksina ili da se oni posle formiranja brzo repariraju, pa nisu mogli da se



Sl. 1. Kriva preživljavanja *rec* sojeva tretiranih T-2 toksinom u trajanju od 10 min



Sl. 2. Kriva preživljavanja *rec* sojeva tretiranih T-2 toksinom u trajanju od 40 min

АНУ ВіН АНУ БиХ

zapaze kroz smanjenje preživljavanja. Moguće je da se prekidi brzo repariraju na neki drugi način (reparativnom resintezom), pa se ne indukuje reparacije rekombinacijom. Moguće je da T-2 toksin nema direktno dejstvo na molekul DNK, ili da inhibicijom sinteze proteina inhibira i sintezu enzima koji učestvuju u reparaciji, pa oštećenja ne mogu da se repariraju, pri čemu bi trebalo ispitati molekularni mehanizam njegovog dejstva.

3.2. ĆELIJSKA FILAMENTACIJA INDUKOVANA T-2 TOKSINOM U *rec* SOJEVIMA

U našim eksperimentima smo određivali potencijal T-2 toksina za indukciju SOS funkcija kod *rec*$^+$ i *rec*F sojeva, što je praćeno preko jedne od SOS funkcija - ćelijske filamentacije.

Fiziološki odgovori koji se javljaju u ćeliji posle delovanja različitih agenasa koji oštećuju DNK ili zaustavljaju replikaciju DNK, formiranjem SOS signala dovode do indukcije SOS funkcija, među kojima je i ćelijska filamentacija.

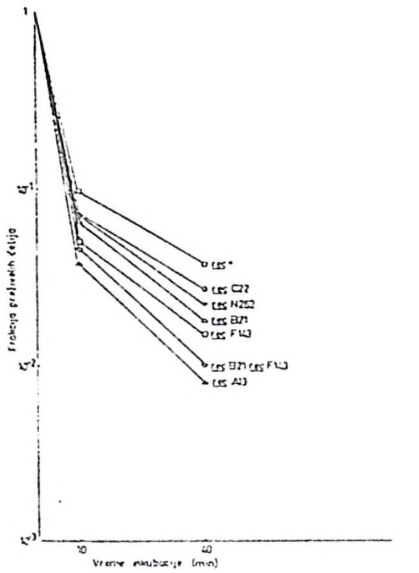
SOS regulacioni sistem je kontrolisan produktima *rec*A i *lex*A gena, i u neindukovanoj ćeliji LexA protein djeluje kao represor velikog broja gena, uključujući i sopstveni i *rec*A gen. LexA protein u neindukovanoj ćeliji održava sintezu RecA proteina na niskom nivou. Kada dođe do oštećenja DNK, formira se SOS indukujući signal koji aktivira bazalnu količinu RecA proteina. Aktivirani RecA protein razlaže LexA represor, što dovodi do povećane sinteze RecA proteina i drugih genskih produkata (Walker, 1985). Posle reparacije oštećenja na DNK, nestaje SOS indukujući signal i nagomilava se LexA represor koji se vezuje za SOS gene, čime se ćelija vraća u neindukovano stanje (Walker, 1985).

Jedan od gena koji je pod kontrolom LexA represora je *sfi*A (*sul*A) gen, čiji je produkt odgovoran za inhibiciju ćelijske deobe pri čemu se kao posljedica javlja filamentozni rast bakterijskih ćelija (Huisman i D'Ari, 1983).

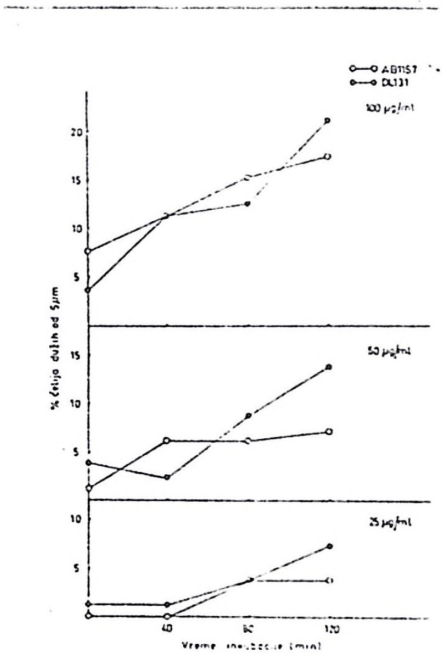
Na slici 4 su prikazani rezultati ovih eksperimenata. Zapaža se veće izdu-živanje ćelija kod *rec*F soja u odnosu na divlji tip na svim koncentracijama, mada je procenat filamenata mali u poređenju sa procentom izdu-živanja ćelija pri delovanju nekih potentnih SOS-indukujućih agenasa, kao što je npr. bleomicin (Knežević-Vukčević i sar., 1987). Sa povećanjem koncentracije T-2 toksina konstatovan je porast dužine filamenata kod oba soja, tako da je najveći procenat filamenata nađen na koncentraciji T-2 toksina od 100 μg/ml. Auffray i Boutibonnes (1986) su tokom ispitivanja genotoksičnosti nekih mikotoksina koristeći *E. coli* u SOS spot testu našli da je T-2 toksin negativan kao SOS-indukujući agens i da je jedini detektovani efekat bio toksični, što se manifestovalo odsustvom rasta oko filtera sa T-2 toksinom.

Ueno i sar. (1978) su u Ames-ovom testu sa S. *typhimurium* konstatovali da T-2 toksin ne pokazuje mutagenost.

SOS-indukcija dobijena u našim eksperimentima nije značajna, što ponovo navodi na pretpostavku da T-2 toksin nije izazvao brojna oštećenja u DNK ili da su se ta oštećenja brzo reparirala, pa nisu indukovala SOS-odgovor.



Sl. 3. Kriva preživljavanja *rec* sojeva tretiranih T-2 toksinom koncentracije 100 μg/ml



Sl. 4. Ćelijska filamentacija indukovana T-2 toksinom

ANU BiH АНУ БиХ

4. ZAKLJUČAK

Testiranjem efekta T-2 toksina na preživljavanje *rec* mutanata i ispitivanjem njegove sposobnosti da indukuje SOS-odgovor dobijene su indikacije da T-2 toksin u ispitivanim koncentracijama dovodi do malog broja prekida u DNK ili da se oni brzo repariraju i da je slab SOS-induktor.

SOME T-2 TOXIN EFFECTS ON *rec* MUTANTS OF *Escherichia coli*

Summary

T-2 toxin effects on bacterial DN were investigated by using bacterial strains, derivatives of *E. coli* K12.

Since T-2 toxin is known to induce DNA damages in eucaryotic cells, the effect of different concentrations (50 and 100 μg/ml) of T-2 toxin on bacterial survival was tested.

Exposure of *E. coli* to agents that damage DNA or interfere with DNA replication results in the induction of a diverse set of physiological responses termed SOS functions. These responses include, among others, inhibition of cell division which leads to filamentation. Various T-2 toxin concentrations (25, 50 and 100 μg/ml) for inducing SOS functions in *rec*$^+$ and *rec*F strains were studied.

The results obtained indicate that T-2 toxin in the used concentrations leads to a small number of DNA breaks which are relatively rapidly repaired.

LITERATURA

Agrelo, C. E., Schoental, R. (1980): *Synthesis of DNA in human fibroblasts treated with T-2 toxin and HT-2 toxin (The trichothecene metabolites of Fusarium species) and the effects of hydroxyurea.* Toxicol. Lett., 5, 155-160.

Anderson, D. W., Black, R. M., Lee, C. G., Pottage, C., Rickard, R. L., Sandford, M. S. , Webber, T. D., Williams, N. E. (1989): *Structure-activity studies of trichothecenes: citotoxysity of analogues and reaction products derived from T-2 toxin and neosolaniol.* Journal of Medicinal Chemistry, 32, 555-562.

Armengod, M. E. (1981): *Role of the recF gene of Escherichia coli K12 in recombination.* Mol. Gen. Genet., 181, 497-504.

Armengod, M. E. (1982): *RecF-dependent recombination as a SOS function.* Biochimie, 64, 629-632.

Zahvalnica: Eksperimentalni deo rada je urađen na Katedri za mikrobiologiju Instituta za botaniku Biološkog fakulteta PMF-a Univerziteta u Beogradu, Veoma sam zahvalna prof. dr Dragi Simić i dr Jeleni Knežević-Vukčević za pažnju, stručnu pomoć i korisne sugestije u toku rada i konačne obrade rezultata.

Auffray, Y., Boutibonnes, P. (1986): *Evaluation of the genotoxic activity of some mycotoxins using Escherichia coli in the SOS spot test.* Mutation Res., 171, 79-82.

Bamburg, J. R., Strong, F. M. (1971): *12,13-Epoxytrichothecenes.* U: Microbial toxins (S. Kadis, A. Ciegler and S. J. Ajl eds.) VII, 207-292, Academic Press, New York.

Burmeister, H. R., Hesseltine, C. W. (1970): *Biological assays for two mycotoxins produced by Fusarium tricinctum.* Appl. Microbiol., 20, 437-440.

Clark, A. J. (19739: *Recombination deficient mutants of E. coli and other bacteria.* Annu. Rev. Genet., 7, 67-86.

Clark, A. J. (1974): *Progress toward a metabolic interpretation of genetic recombination of Escherichia coli and bacteriophage lambda.* Genetics, 78, 259-271.

Huisman, O., D'Ari, R. (1983): *Effect of suppressors of SOS mediated filamentation on sfiA operon expression in Escherichia coli.* J. Bacteriol., 153, 169-175.

Kiessling, K. H. (1986): *Biochemical mechanism of action of mycotoxins.* Pure & Appl. Chem. 58, 327-338.

Kneževič-Vukčevič, J., Vuković, B., Simić, D. (1987): *Role of rec genes in SOS-induced inhibition of cell division in Escherichia coli.* Mutation Res., 192, 247-252.

Laffarge-Frayssinet, C., Decloitre F., Mousset, S., Martin, M., Frayssinet (1981): *Induction of DNA single-strand breaks by T-2 toxin, a trichothecene metabolite of Fusarium. Effect on lymphoid organs and liver.* Mutation Res., 88, 115-123.

Picksley, S. M., Attfield, P. V., Lloyd, R. G. (1984): *Repair of DNA double-strand breaks in Escherichia coli K-12 requires a functional recN product.* Mol. Gen. Genet., 195, 267-274.

Schoental, R., Joffe, A. Z. (1974): *Lesions induced in rodents by extracts from cultures of Fusarium poae and F. sporotrichioides.* J. Pathol.112, 37-42.

Smith, G. R. (1988): *Homologous recombination in procaryotes.* Microbiol. Rev., 52, 1-28.

Simić, D., Vuković-Gačić, B., Kneževič-Vukčevič, J. (1990): *Participation of rec genes of Escherichia coli K-12 in W-reactivation of UV-irradiated phage Lambda.* Mutation Res., 243, 159-164.

Ueno, Y., Kubota, K. (1967): *DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of Bacillus subtilis.* Cancer Res., 36, 445-451.

Ueno, Y., (1977): *Mode of action of trichothecenes.* Pure & Appl. Chem., 49, 1737-1745.

Ueno, Y., Kubota, K., Ito, T., Nakamura, Y. (1978): *Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in Salmonella typhimurium.* Cancer Res., 38, 536-542.

Ueno, Y. (1984): *Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes.* Fund. Appl. Toxicol., 4, 124-132.

Walker, G. C. (1984): *Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia coli.* Microbiol. Rev., 48, 60-93.

Walker, G. C. (1985): *Inducible DNA repair systems.* Ann. Rev. Biochem., 54, 425-457.

Wang, T. V., Smith, K. C. (1984): *RecF-dependent and recFrecB-independent DNA gap-filling repair processes transfer dimer-containing parental strands to daughter strands in Escherichia coli K-12 uvrB.* J. Bacteriol., 158, 727-729.

UTICAJ T-2 TOKSINA NA ZDRAVLJE KOKOŠAKA, NOSIVOST I INKUBACIJU JAJA

ŠANDOR Š. TOBIAŠ, ISIDOR RAJIĆ

Veterinarski zavod "Subotica", Subotica
Veterinarski fakultet, Beograd

Apstrakt. U eksperimentu autori su ispitivali uticaj na proizvodnju i zdravstveno stanje kokošaka T-2 toksina dodatog u krmne smeše za nosilje u količini 1 mg, 5 mg i 10 mg u kg.

Na osnovu dobijenih rezultata izvedenog ogleda utvrđeno je da je T-2 toksin u svim upotrebljenim koncentracijama doveo do pada proizvodnje i do stvaranja nekrotičnih promena na jeziku i na sluzokoži usne duplje. Upotreba većih količina T-2 toksina u hrani (5 mg i 10 mg/kg) prouzrokovala je jednu klinički manifestnu intoksikaciju, a na patoanatomskoj obdukciji kod tih kokoši ustanovljena je atrofija jetre i atrofija genitalnih organa.

U V O D

Prisustvo mikotoksina u hrani za živinu ima veliki naučni, medicinski i ekonomski značaj. Mikotoksini povećavaju mortalitet, smanjuju proizvodnju jaja i mesa i povećavaju konverziju hrane.

Procenjuje se da postoji oko 100.000 vrsta gljivica plesni, od kojih preko 220 vrsta ima sposobnost produkcije toksina i toksičnih metabolita. Sposobnost stvaranja mikotoksina neke plesni zavisi od njene genetske predispozicije, ali, s druge strane, i od spoljašnjih faktora.

Prema izveštajima nekih autora, plesni u svom prvom razvojnom stadijumu obavljaju primarni metabolizam s naglašenim anaboličkim procesima, sintetizirajući za svoj rast i razvoj potrebna organska jedinjenja (proteine, aminokiseline, ugljenehidrate, masti). Ovi primarni metaboliti nisu toksični. Kod plesni koje se približavaju kraju svog razvoja pojavljuju se vegetativne ćelije koje obrazuju koni-

dijume, umesto anaboličnih preovladavaju katabolički procesi, a posledica toga je stvaranje sekundarnih metabolita. Mikotoksini su uglavnom ovakvi sekundarni metaboliti sastavljeni od jednostavnih jedinjenja koja obično sadrže C, H, O, a samo neki N i Cl. To su etilalkohol, kumarini, pireni, trihoteceni, makrolidi, peptidi i drugi. Upravo zbog hemijske razlike, mikotoksini ispoljavaju selektivno dejstvo na pojedina tkiva, odnosno nervno, kožno, bubrežno, krvno i polne organe.

Mikotoksini su srodni antibioticima, koje proizvode neke gljivice plesni baš kao i mikotoksine. Međutim, dok su antibiotici korisni u humanoj i veterinarskoj medicini, mikotiksini su opasni i štetni. Oni deluju na organizam direktno oštećujući organe i organske sisteme, ili indirektno poremećujući sintezu belančevina, a time dovode do smanjenja otpornosti organizma.

Dejstvo mikotoksina se ispoljava u akutnom, subakutnom i hroničnom obliku. Klinička slika mikotoksikoza živine zavisi od vrste mikotoksina, vrste i kategorije živine, količine mikotoksina u hrani i dužine ishrane kontaminiranom hranom.

Za naše geografsko i klimatsko područje izuzetno veliki ekonomski i medicinski značaj imaju fuzario-toksini. Svi toksični metaboliti Fusarium plesni mogu se podeliti na fuzario-toksine sa estrogenim dejstvom (F-2, alfa-zearalenol, beta-zearanelol itd.) i na trihotecene (T-2, toksin, DAS, DON, nivalenol, HT-2 itd.).

Trihoteceni pripadaju velikoj grupi hemijskih jedinjenja, koja obuhvataju do 70 mikotoksina.

Invadiranost hraniva i krmnih smeša ovako brojnim fuzario-toksinima je vrlo velika. Kukuruz i krmne smeše za živinu mogu da budu invadirani i preko 60% uzoraka, zavisno od godine i geografskog područja.

Cilj ovoga rada je da pobliže izuči uticaj T-2 toksina dodatog u krmne smeše na zdravstveno stanje i proizvodnju kokošaka nosilja.

MATERIJAL I METODE RADA

Ogled je izveden po grupno kontrolnom sistemu. Sto nosilja hibridne linije SSL i deset petlova podeljeno je u 10 grupa. U toku ogleda, u trajanju od 28 dana, kokoške su hranjene krmnim smešama istog sastava, s tim što je smješa za K grupu bila bez mikotoksina, a u krmne smješe za ogledne grupe dodat je T-2 toksin i to 1 mg u kg kod I, II i III grupe, 5 mg u kg kod IV, V i VI grupe i 10 mg u kg kod VII, VIII i IX grupe.

Ogledni uzorak potrebnog T-2 toksina proizveden je u laboratoriji Instituta za unapređenje poljoprivrede u Budimpešti.

Soj Fusarium sporotrichioides biotip 216 izolovan je iz krmne smeše za živinu. Nakon prethodnog umnožavanja na selektivnoj hranljivoj podlozi, Fusarium soj inokulisan je u sterilisanu podlogu sačinjenu od pirinča uz dodatak glukoze i inkubiran tri nedelje. U toku prve i treće sedmice inkubiranje je vršeno na

20-22°C, dok je u drugoj nedelji podloga držana na temperaturi 5-8°C. Nakon završenog inkubiranja i umnožavanja, substrat je osušen na temperaturi od 60°C i samleven. Metodom gasne hromatografije određena je koncentracija T-2 toksina.

Radi praćenja telesnog prirasta, kokoške su merene pojedinačno na početku ogleda i na kraju svakog sedmodnevnog perioda. Prilikom merenja registrovan je i utrošak hrane za svaku grupu. Prikupljanje i registrovanje snesenih jaja vršeno je svakodnevno. Sva proizvedena jaja koja su po obliku, veličini i kvalitetu odgovarala za nasad uložena su u inkubator. Lampiranje jaja izvršeno je 8. dana inkubiranja. U toku lampiranja neoplođena jaja su izdvojena i registrovan je njihov broj. Jaja u inkubatoru su ostala do 18. dana, a tada su premeštana u ležionik. Posle izleženja, 21. dana inkubiranja, izvršeno je brojanje zdravih, vitalnih pilića, a isto vreme evidentiran je i broj uginulih embriona kao i broj avitalnih pilića.

Na kraju ogleda kokoške su žrtvovane. Izvršena je patoanatomska sekcija. Registrovane su patomorfološke promene, a istovremeno uzeti i uzorci tkiva promenjenih organa za histološko ispitivanje.

DOBIJENI REZULTATI SA DISKUSIJOM

Dobijeni rezultati izvedenog ogleda jasno ukazuju da je unošenje 1 mg, 5 mg i 10 mg T-2 toksina u kg krmne smeše dovelo do opadanja TM kokošaka, do smanjenja utroška hrane po hranidbenom danu i do jakog pada nosivosti (tabela 1). Statističke analize su pokazale da se smanjenje tih proizvodnih pokazatelja nalazi u negativnoj i visoko signifikantnoj korelativnoj zavisnosti od količine T-2 toksina u krmnim smešama.

Opadanje dnevne konzumacije hrane u toku T-2 toksikoze, u stručnoj literaturi opisano je od strane nekih autora (Kovács, 1980; Bitay i sar., 1981; Pálfy i Kupai, 1986; Tuttle, 1986). Ovi autori ističu da T-2 toksin, isto kao i drugi fuzario-toksini iz grupe trihotecena, poseduje jedan faktor (refusal of feed factor, faktor odbijanja), koji kod domaćih životinja dovodi do odbijanja hrane. Mehanizam dejstva refusal factora nije još razjašnjen, ali zahvaljujući postojanju tog faktora mortalitet je kod T-2 toksikoze mnogo manji.

U toku T-2 toksikoze do smanjenja TM nosilja i do pada nosivosti dolazi verovatno zbog smanjene dnevne konzumacije hrane, što povlači za sobom i smanjenje količine dnevno konzumiranih proteina i drugih hranljivih materija koje su neophodne za podmirenje uzdržnih i produktivnih potreba nosilja. U novije vreme takođe je dokazano da T-2 toksin u ćelijama inhibira sintezu proteina i dezoksiribonukleinskih kiselina (Kovács, 1980, Gedek, 1980). Ako se tome dodaju teške atrofične promene na polnim organima kokoši, koje se javljaju u toku T-2 toksikoze, onda etiologiju pada nosivosti uopšte nije teško protumačiti.

Tabela 1. PROIZVODNI REZULTATI KOKOŠAKA

Grupe kokošaka	K	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Dodato T-2 toksina, mg/kg	-	1	1	1	5	5	5	10	10	10
					Broj kokoši					
Na početku ogleda	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Na kraju ogleda	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
					Prosečna TM, kg					
Na početku ogleda	1,91	1,94	1,89	1,88	1,94	1,93	1,92	1,92	1,92	1,91
Index	100	101,57	98,95	98,43	101,57	101,05	100,52	100,52	100,52	100
Na kraju ogleda	2,01	1,88	1,84	1,96	1,69	1,76	1,75	1,55	1,65	1,57
Index	100	93,53	91,54	97,51	84,08	87,56	87,06	77,11	82,09	78,11
					Utrošak hrane po hranidbenom danu 1-28. dana					
Utrošak hrane, kg	0,139	0,110	0,125	0,124	0,064	0,083	0,083	0,041	0,052	0,039
Index	100	79,14	89,93	89,21	46,04	59,71	59,71	29,50	37,41	28,06
					Broj snesenih jaja i intenzitet nosivosti 1-28. dana					
Broj jaja	256	208	223	224	78	102	82	52	61	54
Nosivost, %	91,43	74,29	79,64	80,00	27,87	36,43	29,29	18,57	21,79	19,29
Indeks	100	81,25	87,10	87,50	30,48	39,84	32,04	20,31	23,83	21,10

Tabela 2. PROCENAT NEOPLOĐENIH JAJA

Grupa kokošaka	Periodi ogleda, dana				
	I 1-7.	II 8-14.	III 15-28.	Prosečno 1-28.	Index
K	5,0	2,5	7,5	5,0	100
I	7,5	6,7	50,0	22,7	454,6
II	5,0	13,3	45,0	21,8	436,4
III	17,5	23,3	55,0	32,7	654,6
IV	2,5	33,3	80,0	18,2	363,6
V	2,5	13,8	60,9	20,7	413,0
VI	15,0	23,8	80,0	26,8	535,2
VII	15,0	10,0	100,0	17,3	346,2
VIII	10,0	22,02	100,0	18,9	377,4
IX	17,5	33,3	100,0	20,5	409,0

АНУ ВиН АНУ БиХ

Tabela 3. PROCENAT IZLEŽENJA

Grupa kokošaka	Periodi ogleda, dana				
	I 1-7.	II 8-14.	III 15-28.	Prosečno 1-28.	Index
K	87,5	92,5	80,0	86,6	100
I	87,5	86,6	40,0	70,0	80,8
II	87,5	80,0	52,0	66,4	76,7
III	77,5	53,3	35,0	55,5	64,1
IV	90,0	52,4	0	71,2	82,2
V	92,5	82,8	26,0	72,8	84,1
VI	77,5	66,7	10,0	64,8	74,8
VII	80,0	80,0	0	76,9	88,8
VIII	82,5	55,5	0	71,7	82,8
IX	72,5	33,3	0	45,5	52,5

T-2 toksin, u uslovima ovih istraživanja, imao je negativan uticaj i na oplođenost jaja (tabela 2). Depresivan efekat T-2 toksina naročito je jako ispoljen u periodu od 15-28. dana, gde je povećanje broja neoplođenih jaja bilo statistički visoko značajno ($P<0,01$) i nalazilo se u pozitivnoj, visoko signifikantnoj korelativ-

Tabela 4. ZAVISNOST PROCENATA IZLEŽENJA OD NIVOA T-2 TOKSINA U HRANI

Pokazatelji	Periodi ogleda, dana			
	I 1-7.	II 8-14.	III 15-28.	Prosečno 1-28.
Prosječna izvodljivost,%	83,50	68,31	24,35	68,14
Stand. greška regres.	5,50	15,45	13,42	10,45
Koefic. korelacije	-0,45	-0,52	-0,86	-0,23
Koefic. determinacije,%	19,97	27,04	73,61	5,18
F-test kod regresije	2,48 NS	2,39 NS	12,13 **	0,44 NS
a	86,90	80,07	52,33	71,17
b	-0,71	-2,45	-5,83	-0,64
t-test za b	1,29 NS	1,02 NS	4,74**	0,67 NS

** visoko signifikantno ($P<0,01$)
NS nije signifikantno ($P>0,05$)

noj zavisnosti sa količinom T-2 toksina u hrani. U ostalim periodima, kao i u proseku za ceo eksperiment, ovo povećanje je manje i bez statističke značajnosti ($P>0,05$).

Iz podataka tabele 3 se vidi da je broj izloženih pilića bio najveći u K grupi kokošaka, dok je u oglednim grupama prisustvo T-2 toksina u hrani dovelo do smanjenja procenta izleženja.

Između količine T-2 toksina u hrani i procenata izleženja postajala je negativna korelativna zavisnost (tabela 4). Koeficijent korelacije je iznosio -0,45 u prvom periodu, -0,52 u drugom, -0,86 u trećem i -0,23 u prosjeku za ceo eksperiment, a koeficijent determinacije istim redosledom 19,97%, 27,04%, 73,61% i 5,18%. Utvrđeni F-test kod regresije kao i t-test za koeficijent b pokazali su da je ova korelativna zavisnost statistički visoko značajna u trećem periodu ($P<0,01$), a u ostalim periodima, kao i u proseku za ceo ogled, ona je statistički nesignifikantna ($P>0,05$).

Činjenica da je T-2 toksin svoje najjače depresivno dejstvo na sposobnost izleženja i na oplođenost jaja ispoljio u periodu od 15-28. dana je dokaz kumulativne sposobnosti tog mikotoksina u organizmu. Na ovu sposobnost T-2 toksina ukazuje Sarkisov (1971) kao i Pálfy i Kupai (1986).

Mada u toku ogleda nijedna kokoš nije uginula, ipak su kokoške koje su u hranu primale 5 i 10 mg/kg T-2 toksina već u drugoj nedelji ogleda počele pokazivati znakove trovanja. Klinički simptomi konstatovani u ovom eksperimentu bili su: anoreksija, somnolencija, nakostrešenost perja, mršavost, cijanoza krste i podbradnjaka, bolnost u ustima. Ovi znaci navode se u radovima nekih istraživača (Mesterházy i sar., 1972; Bitay i sar., 1981; Kralj i sar., 1987).

Međutim, u ovim radovima opisani su i simptomi, kao povećana žeđ, povećano uginuće i potkožni edemi na prednjem delu tela, koji u našim ispitivanjima nisu primećeni.

Na patoanatomskoj sekciji u kokoši svih oglednih grupa zapažena je nekroza vrha jezika i nekrotične lezije sluznice usne duplje. Povećana, drobljiva, masno infiltrovana jetra ustanovljena je u kokoši I, II i III grupe. Međutim, kod kokošaka koje su hranom primale 5 i 10 mg/kg T-2 toksina jetra je bila atrofična. Histološom analzom ustanovljena je masna distrofija njenih ćelija. Testesi kod petlova bili su izrazito smanjeni, atrofični, a mikroskopski je evidentirana atrofija epitela semenih kanalića. Jajnici kod nosilja takođe su bili atrofični, a histološki nalaz je ukazao na atrofiju ovarijalnih folikula.

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata izvedenog ogleda mogu se izvući sledeći zaključci:

1) T-2 toksin u svim upotrebljenim koncentracijama (1 mg, 5 mg i 10 mg u kg hrane) doveo je u kokoši nosilja do pada proizvodnje. Smanjenje proizvodnih

pokazatelja nalazilo se u statistički visoko signifikantnoj korelativnoj zavisnosti od količine T-2 toksina u hrani;

2) T-2 toksin kod kokoši svih oglednih grupa doveo je do nekroze vrha jezika i do stvaranja nekrotičnih lezija na sluzokoži usne duplje. Intenzitet nekrotičnih promena bio je srazmeran količini T-2 toksina u hrani;

3) Veće količine T-2 toksina (5 i 10 mg u kg hrane) prouzrokovale su jednu klinički menifestnu intoksikaciju sa znacima anoreksije, somnolencije, cijanoze kreste i podbradnjaka i bolnosti sluzokože usne duplje;

4) Pod dejstvom 5 i 10 mg T-2 toksina u kg hrane došlo je do atrofije jetre sa masnom distrofijom hepatocita i do atrofije genitalnih organa.

THE EFFECT OF T-2 TOXIN ON HEALTH, EGG PRODUCTION AND EGG INCUBATION IN LAYING HENS

Summary

The authors tested in experiments the effect of T-2 toxin, added to layer diet in the amount of 1 mg, 5 mg and 10 mg/kg respectively, on production and health status of laying hens.

The results of the trial showed that T-2 toxin in all concentrations it was used depressed the production and caused necrotic changes on tongue and mucosa in oral cavity. Higher concentrations (5 mg and 10 mg/kg, respectively) of T-2 toxin caused clinical intoxication and the postmortal pathoanatomical examination revealed in those hens atrophy of liver and of genital organs.

LITERATURA

Bitay, Z., Glávits, R., Sándor, Gabriella, Balázs, K. (1981): *Pecsenyecsirkék T-2 mikotoxikózisának gyakorlati elöfordulása.* Magyar Állatorvosok Lapja, 36; 491-495.

Gedek Brigitte (1980): *Kompendium der medizinischen Mykologie.* Paul Porey Verlag, Berlin und Hamburg.

Kovács F. (1980): *Állathigiénia.* Mez. Kiadó, Budapest.

Kralj, M., Danica Marjanović, Dubravka Beker, Ankica Nemanić, Blanka Mitrović, Branka Mršić, Bubić, A., Čuljak, K. (1987): *Epizootska pojava otrovanja mikotoksinima iz hrane u hibrida lakih pasmina nesilica jaja za konzum.* VI Kongres veterinara i veterinarskih tehničara Jugoslavije. Zagreb, 353-367.

Mesterházy, A., Palyusik, M., Rotko, Cecilia (1972): *A takarmányok gombás fertőzöttségének és a fertőzött takarmányok etetésének következményei.* Mez. Kiadó, Budapest, 91-98.

Pálfy, Katalin, Kupai, J. (1986): *Egészséges takarmányt za üzembe.* Mez. Kiadó, Budapest, 25-44.

Sarkisov, A. Ch. (1971): *Mycotoxikozisok*. Magyar Állatorvosok Lapja, 26: 317-323.
Tuttle, W. L. (1986): *Mold problems in animals production*. Savjetovanje "Župa '86", 4-20.

ANU BiH АНУ БиХ

EKSPERIMENTALNA INTOKSIKACIJA KUNIĆA MIKOTOKSINOM T-2

S. TOPOLKO, M. ŽURIĆ, MIROSLAVA MUNK I VERA AUSLENDER-UJEVIĆ

Veterinarski institut, Zagreb

Apstrakt. Kunići su tijekom 21 dana hranjeni ječmom koji je sadržavao T-2 toksin u koncentraciji 0,7 mg/kg (2. grupa) i 1,4 mg/kg (3. grupa). Kod manjeg broja kunića 3. grupe, već 5. dan od početka hranjenja zapažena je pojava proljeva, sa izrazitim znacima žedi. Hematološkim pretragama u kunića 3. grupe ustanovljen je pad broja eritrocita za 28% u odnosu na kontrolne životinje. Izrazita leukopenija ustanovljena je u kunića 2. i 3. grupe u kojih je broj leukocita bio smanjen za 50%, odnosno 54%. Ukupne bjelančevine seruma kao i bilirubin, značajno su povišeni u kunića 3. grupe. Aktivnost aminotransferaze (ALT i AST) nije se značajnije promijenila u obje grupe u odnosu na kontrolu. Aktivnost alkalne fosfataze (AP) u kunića 2. grupe bila je za 92%, a u 3. grupe za 45% povišena u odnosu na kontrolnu grupu.

Patoanatomskim i patohistološkim pretragama crijeva u žrtvovanim kunićima 3. grupe, ustanovljena je kataralno hemoragična upala tankog crijeva. U svega tri životinje 2. grupe takve promjene ustanovljene su u znatno blažem stupnju. Umjerena difuzna degeneracija hepatocita u obliku mutnog bubrenja kao i degenerativne promjene u tipu vakuolarne degeneracije stanica proksimalnih tubula bubrega, ustanovljene su u kunića 3. grupe. Takve promjene izostale su u kunića 2. grupe.

U V O D

T-2 toksin pripada skupini trihotecenskih mikotoksina, koji posjeduju epoksidni prsten, pa su označeni kao 12,13 epoxytrichotheceni. Najčešće ih produciraju pripadnici slijedećih rodova plijesni: *Fusarium, Myrothecium, Stachybotrys, Trichoderma* i *Trichothecium* (U e n o, 1975). Danas je poznato preko 40 trihotecenskih mikotoksina koji nastaju na poljoprivrednim kulturama tijekom vegetacije, žetve i uskladištenja (M i r o c h a i sur., 1976). Sposobnost laboratorijske biosinteze T-2 toksina podložna je velikim varijabilnostima ovisno o starosti sojeva, sastavu hranjive podloge, vlagi, toplini i različitim dodacima koji stimuliraju biosintezu (U e n o, 1975; Aleksandra B o č a r o v - S t a n č i ć i sur., 1986; T o p o l k o i Miroslava

Munk, 1988). Premda je T-2 toksin kemijski stabilan u kunićjem organizmu, pod utjecajem alkalne sredine dolazi do hidrolitičke transformacije u HT-2 toksin, T-2 triol i T-2 tetraol, koji se u najvećoj mjeri izlučuju putem fecesa (Vanyi i sur., 1988).

T-2 toksin pokazuje izrazitu citotoksičnost prema brzo dijelećim stanicama sluznice želuca i crijeva kao i prema limfoidnom i hematopoetskom tkivu (Saito i sur., 1974). Taj mikotoksin djeluje imunosupresivno, posredstvom toksičnog djelovanja na imunokompetentni sustav (Wiskott, 1978; Ankica Nemanič i sur., 1989). T-2 toksin umanjuje sposobnost migracije neutrofila, a time i učinkovitost fagocitoze makrofaga. (Büttner i Bauer, 1988; Niyo i sur., 1988). Sinteza staničnog proteina u prisutnosti T-2 toksina može biti znatno poremećena, budući se vezuje uz DNA i RNA staničnih membrana, koje ponekad može i lizirati (Gyongyossy-Issa, Khachatourians, 1984; 1985).

Eksperimentalnu intoksikaciju pilića T-2 toksinom izazvali su Wyatt i sur., (1972) i Vengušt i sur., (1989), pri čemu su ustanovili zaostajanje u rastu i smanjeni prirast u tovu. Razudbom su ustanovili opsežna krvarenja i nekroze na unutarnjim organima.

Wyatt i sur. (1975) izvještavaju o pojavi intoksikacije T-2 toksinom u nesilica, u kojih je došlo do znatnog pada nosivosti i pojave jaja s tankom ljuskom. Eksperimentalnu T-2 mikotoksikozu u svinja istražio je Pang (1987). Intravenoznom aplikacijom toksina, izazvao je degenerativne i nekrotične promjene na unutarnjim organima. Peroralnom aplikacijom filtrata kultura *F. poae* i *F. sporotrichioides* u zamorčadi i kunića izazvana je leukopenija i krvarenje na sluznici crijeva i u drugim organima (Joffe, 1974). U štakora koji su jeli kukuruz kontaminiran T-2 toksinom ustanovljene su hemoragične i nekrotične promjene u crijevima, jetri i bubrezima (Kosuri i sur., 1971). Značajna biokemijska aktivnost T-2 toksina u štakora i kunića, nakon i/v aplikacije manifestirala se padom aktivnosti AP kao posljedica hepatotoksičkog djelovanja toksina (Chan i Gentry, 1984).

MATERIJAL I METODE

Istraživanja su izvršena na kunićima pasmine Hyla, prosječne težine 2,5 kg. Kunići su podijeljeni u tri grupe; u prvoj (kontrola) bila su 3 kunića, a u drugoj i trećoj bilo je po 10 kunića. Kunići su tijekom 21 dana hranjeni kontaminiranim ječmom, grupa II 0,7 ppm a grupa III sa 1,4 ppm T-2 toksina, dok je kontrolna grupa hranjena nekontaminiranim ječmom. U prekrupljeni ječam sve tri grupe životinja dodan je vitaminsko mineralni dodatak. Mikotoksin T-2 dobiven je biosintezom dvaju sojeva Fusarium sporotrichioides, koji su uzgajani 8 dana na 27°C a nakon toga 20 dana na 7-8°C, na grubo prekrupljenom ječmu s 50% vlage. Identifikacija T-2 toksina vršena je TLC metodom, a kvantifikacija je izvršena direktno s tankog sloja denzitometrijskim mjerenjem "Camag" scanerom. Tijekom pokusa provedene su kliničke i hematološke pretrage kao i biokemijske analize krvnog

seruma. Na žrtvovanim kunićima na kraju pokusa izvršene su patoanatomske i patohistološke pretrage.

Za hematološke i enzimološke pretrage krv je uzimana punkcijom srca 1, 14. i 21. dan. Hemoglobin je određivan metodom po Sahliju; eritrociti i leukociti brojeni su u Neu Baucrovoj komorici. Alkalna fosfataza te transaminaze (ALT i AST) rađene su prema metodama koje preporučuje Komitet za enzimologiju Internacionalne federacije kliničkih kemičara. Bilirubin je rađen po metodi Jendrasik-Gross, a ukupni proteini biuretskom reakcijom.

REZULTATI I RAZMATRANJE

Klinički nalaz

U tri kunića 3. grupe zapažen je proljev već peti dan od početka pokusa. Izmetine su bile kašastog izgleda i mazive konzistencije, a dlake okolo analnog otvora bile su uprljane i slijepljene. Do kraja pokusa intenzitet proljeva bivao je čas jači čas slabiji, s povremenom prisutnošću sluzi u izmetu. U tri kunića iste grupe zapaženi su samo povremeno znaci laganog proljeva, dok u četiri kunića nisu zapaženi nikakvi znaci proljeva tijekom pokusa. Uzorci izmetina testirani su u tri navrata na prisutnost tragova krvi, pa je pozitivan nalaz potvrđen u tri kunića s jačim znacima proljeva. Kunići 2. grupe, kao i kontrolni, imali su normalno formirane izmetine, a nisu uočene nikakve druge poremetnje zdravlja.

Potrebno je posebno istaknuti izrazite znakove žeđi u životinja 3. grupe, pa su te životinje popile tri puta veću količinu vode u odnosu na kontrolne. Životinje 2. grupe, utrošile su samo neznatno više vode od kontrolnih. Utrošak hrane u životinja 3. grupe u prosjeku je iznosio 164 g/dan/kunić, a tjelesna težina na početku pokusa bila je u prosjeku 2480 g, odnosno 2260 g na završetku pokusa.

Očevidno je da su kunići 3. grupe tijekom pokusa prosječno oslabili za 220 g. Kunići 2. grupe imali su prosječni dnevni utrošak hrane 143 g/dan, a početna prosječna težina kunića iznosila je 2560 g, a na kraju pokusa bili su u prosjeku teški 2520 g, što je neznatni gubitak tjelesne težine od 40 g/kunić. Kontrolni kunići ostvarili su u prosjeku prirast od 40 g/kunić, a utrošak hrane iznosio je 150 g/kunić/dan.

Rezultati hematoloških pretraga

Eritrociti u životinja 2. grupe, 14. dan pokusa bili su povećani za 7%, dok su 21. dan pokusa pokazivali smanjeni broj za oko 13% u odnosu na kontrolnu grupu. U životinja 3. grupe tendencija smanjenja broja eritrocita za 2% ustanovljena je već 14. dan a 21. dan taj pad iznosi 28% u odnosu na kontrolnu grupu. Razlike između srednjih vrijednosti nisu statistički značajne.

Smanjenje broja leukocita za 12% ustanovljeno je u životinja 2. grupe već 14. dan, s daljom tendencijom pada za 50%, 21. dan pokusa u usporedbi s životinjama kontrolne grupe. U treće grupe životinja leukopenija je bila još izraženija,

pa je 14. dan iznosila 15% a 21. dan broj leukocita u usporedbi s kontrolnom grupom životinja bio je smanjen za 54%. Razlika srednjih vrijednosti leukocita kontrolne grupe i treće grupe 21. dan eksperimenta, je statstički značajna ($P<0,005$).

Koncentracija hemoglobina u životinja 2. grupe bila je 14. dan 4% veća, a 21. dan za 6% manja od srednje vrijednosti kontrolne grupe. U životinja 3. grupe srednja vrijednost konc. hemoglobina 14. dan bila je nepromijenjena u odnosu na kontrolnu, dok je 21. dan za 7% bila manja od kontrolnih životinja. Razlike između srednjih vrijednosti nisu statistički značajne.

Tablica 1. HEMOGRAM KUNIĆA TRETIRANIH MIKOTOKSINOM T-2

	Hemoglobin g/l - dan			Eritrociti 10^{12}/l - dan			Leukociti 10^{9}/l - dan		
	1.	14.	21.	1.	14.	21.	1.	14.	21.
I. Kontrolna grupa	n 3 Min. 91 Max. 141 M. 123 S.D. 15,99 m_M 6,06 K.V. 13			3 2,69 5,94 4,47 1,03 0,39 167,8			3 7,85 15,20 11,00 2,96 1,12 26,91		
II. Grupa životinja 0,7 mg/kg T-2	n 3 3 Min. 112 109 Max. 142 119 M. 128 115 S.D. 12,40 4,51 m_M 7,17 2,61 K.V. 9,69 3,92			3 3 3,93 2,87 5,54 5,09 4,77 3,90 0,66 0,91 0,75 0,53 27,25 23,33			3 3 7,0 4,30 14,10 6,10 9,70 5,50 1,80 0,83 1,04 0,48 18,56 15,09		
III. Grupa životinja 1,4 mg/kg T-2	n 3 3 Min. 111 91 Max. 133 128 M. 124 114 S.D. 9,42 16,39 m_M 5,44 9,47 K.V. 7,60 14,38			3 3 3,32 2,55 5,40 4,10 4,36 3,23 0,86 0,64 0,50 0,37 19,72 19,81			3 3 7,90 3,70 11,90 6,50 9,40 5,00 1,80 1,16 1,04 0,67 19,15 23,20		

Rezultati biokemijskih analiza seruma

Aktivnost alanin aminotransferaze (ALT) u serumu kontrolne grupe kunića bila je 23,4 ± 8,1 IU/l. U 2. grupi kunića aktivnost ALT 14. dan bila je 22,6% a 21. dan 15,4% iznad srednje vrijednosti aktivnosti ALT kontrolne grupe. Aktivnost ALT u životinja 3. grupe bila je 14. dan 27,3% niža, a 21. dan 11,1% viša od srednje vrijednosti aktivnosti ALT kontrolne grupe. Razlike između srednjih vrijednosti statistički nisu značajne.

Aktivnost aspartat aminotransferaze (AST) kontrolne grupe životinja bila je 17±7,8 IU/l. U 2. grupi životinja aktivnost AST 14. dan bila je 57% viša, a 21. dan

11,8% niža od srednje vrijednosti aktivnosti AST kontrolne grupe. Aktivnost AST u životinja 3. grupe bila je 14. dan 17,6% a 21. dan 5,3% niža od srednje vrijednosti AST kontrolne grupe. Razlike aktivnosti između srednjih vrijednosti, nisu statistički značajne.

Aktivnost alkalne fosfataze (AP) u serumu životinja kontrolne grupe bila je 42,6±13,4 IU/l. U životinja 2. grupe aktivnost AP 14. dan bila je 25,0%, a 21. dan 92,0% iznad aktivnosti AP kontrolne grupe. Razlika aktivnosti AP srednje vrijednosti kontrolne grupe i 2. grupe 21. dan eksperimenta, bila je statistički značajna ($P<0,005$). Aktivnost AP u životinja 3. grupe 14. dan eksperimenta bila je 13,8% niža, a 21. dan 45,0% viša od srednje vrijednosti aktivnosti kontrolne grupe. Razlike između srednjih vrijednosti statistički nisu značajne.

Koncentracija ukupnih bjelančevina u krvnom serumu životinja kontrolne grupe bila je 43,2±15,1 g/l. U životinja 2. grupe koncentracija ukupnih bjelančevina 14. dan eksperimenta bila je 14%, a 21. dan 26,6% iznad srednje vrijednosti bjelančevina kontrolne grupe. Razlika između srednje vrijednosti nije statistički značajna. U životinja 3. grupe koncentracija bjelančevina 14. dan pokusa bila je 46,0% a 21. dan 45,0% iznad srednje vrijednosti kontrolne grupe. Razlika između srednjih vrijednosti koncentracije bjelančevina kontrolne grupe i 3. grupe 21. dan pokusa, bila je statistički značajna ($P<0,005$).

Koncentracija ukupnog bilirubina kontrolne grupe životinja bila je 4,5±1,96 μmol/l. U životinja 2. grupe 14. dan pokusa bilirubin je bio 4,%, a 21. dan 62,0% iznad srednje vrijednosti koncentracije kontrolne grupe. Razlike srednje vrijednosti, statistički nisu značajne. U životinja 3. grupe koncentracija bilirubina 14. dan pokusa bila je skoro 38%, dok je 21. dan bila čak 53% iznad srednje vrijednosti kontrolne grupe. Razlika između srednjih vrijednosti koncentracije bilirubina kontrolne i 3. grupe 21. dan pokusa bila je statistički značajna ($P<0,01$).

Patoanatomski i patohistološki nalaz

Razudbom kunića III grupe u 9 od 10 pokusnih životinja, ustanovljen je katar želuca i kataralno hemoragična upala tankog crijeva. U sadržini tankih crijeva nekih životinja bili su prisutni tragovi krvi. U kunića II grupe ustanovljen je katar želuca i crijeva, u svega tri životinje bila je prisutna hemoragična upala crijeva lakšeg stupnja.

Patohistološkim pretragama organa kunića III grupe, uočena je lagana do umjerena difuzna degeneracija hepatocita u smislu mutnog bubrenja. U pojedinačnim epitelnim stanicama proksimalnih tubula bubrega nađene su degenerativne promjene u tipu mutnog bubrenja pa do vakuolarne degeneracije stanica. U limfnim folikulima slezene ustanovljen je veoma mali broj limfocita, dok u nekim folikulima potpuno nedostaju. Sluznica želuca ponešto je stanjena, a u donjoj trećini uočene su lagane degenerativne promjene stanica. U sluznici tankog crijeva svih životinja II grupe ustanovljena je lagana do umjerena hemoragična upala s prisutnošću eritrocita na površini sluznice kao i u lumenu crijeva.

Tablica 2. STATISTIČKA PROCJENA REZULTATA BIOKEMIJSKIH ANALIZA U SERUMIMA KUNIĆA

		Uzorci krvnog seruma - dan eksperimenta		
		1.	14.	21.
		A L T (IU/l)		
1. grupa kunića (kontrola)	n	10		
	Min.	9		
	Max.	37		
	M.	23,4		
	S.D.	8,1		
	m_M	2,7		
	K.V.	34,6		
2. grupa kunića 1,4 mg/kg T-2	n		10	10
	Min.		23	23
	Max.		35	31
	M.		28,7	27
	S.D.		4,9	4
	m_M		2,9	2,8
	K.V.		17,2	14,8
3. grupa kunića 1,4 mg/kg T-2	n		10	10
	Min.		10	17
	Max.		24	34
	M.		17	26
	S.D.		7	5,5
	m_M		5	1,7
	K.V.		41,2	21,1
		A S T (IU/l)		
1. grupa kunića (kontrola)	n	10		
	Min.	7		
	Max.	31		
	M.	17		
	S.D.	7,8		
	m_M	2,4		
	K.V.	45,9		
2. grupa kunića 0,7 mg/kg T-2	n		10	10
	Min.		22	14
	Max.		33	16
	M.		26,7	15
	S.D.		4,6	1
	m_M		2,7	0,7
	K.V.		17,2	6,7
3. grupa kunića 1,4 mg/kg T-2	n		10	10
	Min.		13	9
	Max.		15	25
	M.		14	16,1
	S.D.		1	4,6
	m_M		0,7	1,4
	K.V.		7,1	28,6

ANU ВіН АНУ БиХ

(Tablica 2 — nastavak)

		Uzorci krvnog seruma - dan eksperimenta		
		1.	14.	21.
		A P (IU/l)		
1. grupa kunića (kontrola)	n	10		
	Min.	24		
	Max.	61		
	M.	42,6		
	S.D.	13,4		
	m_M	4,2		
	K.V.	31,4		
2. grupa kunića 0,7 mg/kg T-2	n		10	10
	Min.		41	74
	Max.		52	92
	M.		53,3	81,7
	S.D.		9,8	7,6
	m_M		5,8	4,5
	K.V.		18,4	9,3
3. grupa kunića 1,4 mg/kg T-2	n		10	10
	Min.		24	37
	Max.		52	96
	M.		36,7	61,8
	S.D.		11,6	32,4
	m_M		6,8	10,1
	K.V.		31,6	52,4
		Ukupne bjelančevine seruma g/l		
1. grupa kunića (kontrola)	n	10		
	Min.	22		
	Max.	70		
	M.	43,2		
	S.D.	15,1		
	m_M	4,7		
	K.V.	34,9		
2. grupa kunića 0,7 mg/kg T-2	n		10	10
	Min.		38	35
	Max.		64	68
	M.		49,3	54,7
	S.D.		10,9	14,2
	m_M		6,4	8,3
	K.V.		22,1	25,9
3. grupa kunića 1,4 mg/kg T-2	n		10	10
	Min.		61	54
	Max.		65	70
	M.		63	62,5
	S.D.		2	4
	m_M		1,4	1,2
	K.V.		3,2	6,4

ANU BiH АНУ БиХ

(Tablica 2 — nastavak)

		Uzorci krvnog seruma - dan eksperimenta		
		1.	14.	21.
		Bilirubin μmol/l		
1. grupa kunića (kontrola)	n	10		
	Min.	2,7		
	Max.	8,4		
	M.	4,5		
	S.D.	1,9		
	m_M	0,6		
	K.V.	43,5		
2. grupa kunića hranjena s 0,7 mg/kg T-2	n		10	10
	Min.		4,2	6,5
	Max.		5,2	8,8
	M.		4,7	7,3
	S.D.		0,4	1,1
	m_M		0,1	0,3
	K.V.		8,5	15,1
3. grupa kunića hranjena s 1,4 mg/kg T-2	n		10	10
	Min.		4,8	6,5
	Max.		7,7	8,4
	M.		6,2	6,9
	S.D.		1,4	0,9
	m_M		0,4	0,3
	K.V.		23,4	13,0

Patohistološke promjene u životinja II grupe, po tipu procesa, identične su s promjenama na organima životinja III grupe, ali znatno slabijeg intenziteta, a u nekih životinja potpuno su izostale. Posebno treba istaknuti da su patohistološke promjene na bubrezima životinja II grupe potpuno izostale za razliku od nalaza u životinja III grupe.

ZAKLJUČAK

Krmiva kontaminirana relativno niskim koncentracijama T-2 toksina (0,7-1,4 mg/kg), nakon 21 dan hranjenja, mogu u kunića izazvati kataralno hemoragičnu upalu tankog crijeva. Suptoksične koncentracije T-2 toksina izazvale su u kunića kliničke i hematološke poremetnje zdravlja.

U eksperimentalnih kunića obiju grupa, hematološkim pretragama ustanovljena je izrazita leukopenija.

Patohistološkim pretragama kunića 3. grupe ustanovljene su lagane degenerativne promjene u jetri i u stanicama proksimalnih tubula bubrega, kao i znatno smanjenje limfocita u limfnim folikulima slezene. Početna tjelesna težina kunića 3. grupe smanjena je za 8,87%, a u 2. grupe za 1,56%, dok su kunići kontrolne grupe ostvarili prirast od oko 40 g/kunić, na kraju pokusa.

ANU BiH АНУ БиХ

EXPERIMENTAL RABBITS INTOXICATION WITH T-2 MYCOTOXIN

S u m m a r y

Rabbits were in the course of 21 days fed with barley contaminated with T-2 toxin in concentration od 0,7 mg/kg (group 2) and 1,4 mg/kg (group 3); group 1 was the control one. In smaller number of rabbits in group 3 allready on 5th day from the beginning of feeding was noted diarrhoea, with pronounced symptoms of thirst. By haematological examinations in the rabbits of group 3 it was determined a fall in number of erythrocytes (28% in relation to group 1). Expressive leucopenia was found in the groups 2 and 3, where the number of leucocytes was lessened by 50% and 54%, respectively. Total serum proteins and bilirubin were significantly elevated in the rabbits of the group 3. The activity of transaminases (ALT and AST) was not significantly altered in both groups in relation to the control group. Activity of alcaline phosphatase (AP) in the rabbits of the group 2 was higher for 92%, and in group 3 for 45% in relation to the control group.

Pathological anatomic and histological examinations of intestines of sacrified animals in the group 3 determined catarrhal haemorrhagic inflamation in the small intestine. In 3 animals only in the group 2 there were determined alike changes but in milder degree. Mild diffuse degeneration of hepatocytes (as opaque intumescention), as well degenerative changes (as vacuolar degeneration) of the cells of proximal tubules in kidneys were determined in the rabbits of the group 3. Such changes could not be found in the rabbits of the group 2.

L I T E R A T U R A

Bočarov-Stančić, Aleksandra, Đ. Jovanović, Maria Muntañola-Cvetković (1986): *Biosinteza DAS i T-2 toksina kod izolata roda Fusarium sa poljoprivrednih kultura iz Jugoslavije*. II simpozium o mikotoksinima Sarajevo 1986, ANUBiH, Odjeljenje medicinskih nauka, Knjiga 12, 129-145.

Büttner, M., J. Bauer (1988): *The effects of dietary T-2 toxin on the NK-Cell activity and on the reactivation of pseudorabies virus in NNRI mice*. J. Vet. Med., B 35, 421-430.

Chan, P. K. C. and P. A. Gentry (1984): *LD 50 values and serum biochemical changes induced by T-2 toxin in rats and rabbits*. Toxicology and applied pharmacology, 73, 402-410.

Gyongyossy-Issa, Mic, G. G. Khachatourians (1985): *Interaction of T-2 toxin and murine lymphocytes and the demonstration of a threshold effect on macromolecular synthesis*. Biochem. Biophys. Acta, 844, 167-173.

Gyongyossy-Issa, Mic, G. G. Khachatourians (1984): *Interaction of T-2 toxin with murine lymphocytes*. Biochem. Biophys. Acta. 803, 197-202.

Joffe, A. Z. (1974): *Toxicity of Fusarium poae and F. sporotrichioides and its relation to alimentary toxic aleukia*. Mycotoxins (I F H Purchase Ed.), Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 263-281.

Kosuri, N. R., E. B. Smalley, R. E. Nichols (1971): *Toxicologic studies of Fusarium tricinctum (Corda) Snyder et Hansen from moldy corn*. Am. J. Vet. Res., 32, 1843-1850.

Mirocha, C. J., S. V. Pathre, B. Schauerhamer, C. M. Christensen (1976): *Natural occurrence of Fusarium toxins in feedstuff.* Appl. Environ. Microbiol., 32, 553-556.

Nemanič, Ankica, H. Mazija, Z. Bidin (1989): *Imunosupresivno djelovanje suptoksične količine T-2 toksina.* III simpozium o mikotoksinima Sarajevo 1989, ANUBiH, Odjeljenje medicinskih nauka, Knjiga 14, 31-37.

Niyo, K. A., J. L. Richard, Y. Niyo, L. H. Tiffany (1988): *Effect of T-2 mycotoxin ingestion on phagocitosis of Aspergillus fumigatus conidia by rabbit alveolar macrophages and on hematologic, serum biochemical and pathologic changes in rabbits.* Am. J. Vet. Res., 49, 1766-1773.

Pang, F. V. (1987): *T-2 mycotoxicosis in swine following topical application intravascular administration and inhalation exposure.* Dissertation Abst. International, cit. Vet. Bulletin, 57, 4288.

Saito, M., and K. Ohtsubo (1974): *Trichothecene toxins of Fusarium species.* Mycotoxins (IFH Purchase Ed.) Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 263-281.

Topolko, S., Miroslava Munk (1989): *Utjecaj vitaminsko mineralnih dodataka na biosintezu T-2 toksina.* III simpozium o mikotoksinima, Sarajevo, 1989, ANUBiH, Odjeljenje medicinskih nauka, Knjiga 14, 31-35.

Ueno, Y., M. Sawano, K. Ishii (1975): *Production of trichothecene mycotoxins by Fusarium species in shake culture.* Appl. Microbiol., 30, 4-9.

Vanyi, A., A. Bata, S. Fekete, J. Tamas (1988): *Study of the metabolism and excretion of T-2 toxin, a trichothecene fusariotoxin in rabbits.* Acta Vet. Hungarica, 36, 213-220.

Vengušt, A., J. Žust, Z. Kabaj, P. Vospernik, U. Pestevšek (1989): *Ispitivanje toksičnosti T-2 toksina na brojlerskim pilićima.* III simpozium o mikotoksinima, Sarajevo 1989, ANUBiH, Odjeljenje medicinskih nauka, Knjiga 14, 23-29.

Wiskott, U. (1978): *Untersuchungen über die immunosuppressive Wirksamkeit von Fusarientoxinen.* Diss. Med. Vet. Universität München, cit. J. Vet. Med., B 35, 421-430.

Wyatt, R. D., B. A. Weeks, P. B. Hamilton, H. R. Burmeister (1972): *Severe oral lesions on chickens caused by ingestion of dietary fusariotxin T-2.* Appl. Microbiol., 24, 251-257.

Wyatt, R. D., J. A. Doerr, P. B. Hamilton, H. R. Burmeister (1975): *Egg production shell thickness and other physiological parameters of laying hens affected by T-2 toxin.* Appl. Microbiol., 29, 641-645.

UPOREĐIVANJE DVA RAZLIČITA POSTUPKA EKSTRAKCIJE T-2 TOKSINA IZ TEČNE FERMENTACIONE PODLOGE UPOTREBLJENE ZA KULTIVACIJU TOKSIKOGENIH FUSARIA

ALEKSANDRA BOČAROV-STANČIĆ, P. RADOŠEVIĆ I J. BOŽO

Tehnološki institut "Servo Mihalj", Zrenjanin
Vojnomedicinska akademija, Beograd

Apstrakt. Pet toksinogenih sojeva *Fus. sporotrichioides* uzgajano je na polusintetskoj tekućoj podlozi APYA (50 g/l saharoze, 1 g/l peptona, 1 g/l autolizata kvasca tri dana na temperaturi od 28°C, na rotirajućoj mućkalici (220 obrtaja/minut). T-2 toksin je ekstrahiran iz fermentativne podloge na dva načina: (1) pomoću etilacetata i (2) pomoću uglja. U ovom slučaju ugalj u prahu je stalno mešan sa filtratom kulture, filtriran, ispran dejoniziranom vodom i tada potopljen u etanolu.

U svim slučajevima dobivene su veće količine T-2 toksina istim sojem plesni upotrebom organskog otapala (etilacetata), ali je ekstrakcija sa ugljem u prahu davala čistije pripravke T-2 toksina.

U V O D

U naučnoj literaturi je opisan veći broj postupaka za proizvodnju T-2 toksina u čistoj kulturi. Jedan od najčešće korišćenih je kultivacija toksikogenih izolata *Fusarium spp.* na vlažnom sterilisanom zrnu žitarica. Mada se na ovaj način mogu postići visoki prinosi T-2 toksina, proces je dugotrajan (4-6 nedelja), zahteva nisku temperaturu (8-12°C) (Smalley i Strong, 1974; Joffe i Yagen, 1977) i prečišćavanje toksina je dosta komplikovano usled prisustva većeg broja interferirajućih supstanci. Fermentacija u sintetičkim ili polusintetičkim podlogama (Gregory i sar., 1952; Ueno i sar., 1973) ima veći broj prednosti: kraću kultivaciju (do 5 dana), višu temperaturu (25-28°C), prisustvo pratećih materija u mnogo manjem obimu i mogućnost preciznijeg definisanja faktora koji mogu uticati na prinos ovog trihotecena (aeracija npr.).

Međutim, čistoća preparata T-2 toksina ne zavisi samo od uslova kultivacije mikroorganizma producenta već u velikoj meri i od primenjenog postupka ekstrakcije.

Shodno tome, cilj ovog rada je bio poređenje dve metode ekstrakcije T-2 toksina iz prefermentisane proizvodne podloge: 1) organskim rastvaračem, tj. etilacetatom i 2) aktivnim ugljem kao specifičnim adsorbensom.

MATERIJAL I METODE

Mikroorganizmi

U ovom istraživanju je upotrebljeno 5 izolata *Fusarium sporotrichioides*: ITM-391 (leg. A. Bottalico), ITM-496 (leg. A. Bottalico), M-1-1 (leg. Y. Ueno), KF-38/1 (leg. Y. Chelkowski) i R-2301 (leg. Y. Bauer), dobijenih ljubaznošću prof. dr M. Muntañola-Cvetković. Kod ovih kultura je već prethodno bilo dokazano da posjeduju sposobnost biosinteze T-2 toksina pri kultivaciji na čvrstim prirodnim podlogama (Bočarov-Stančić i sar., 1986, a i Bočarov-Stančić i Muntañola-Cvetković, 1988), kao i pri submerznoj kultivaciji (Ueno i sar., 1975; Bočarov-Stančić i Muntañola-Cvetković, 1988). Štok kulture organizama su čuvane na krompir-saharoznom agaru (KSA) na 4°C i subkultivisane su na istoj podlozi tokom 7 dana na 28°C.

Podloga

Tečna podloga (SPAK) sa 50 g/l saharoze (Merck), 1 g/l peptona-1 (Torlak) i 1 g/l autolizata kvasca-NAV (Ohly Gmbh) (pH 6,0) je korišćena za biosintezu T-2 toksina.

Uslovi kultivacije

Erlenmajer tikvice od 500 ml sa 250 ml podloge su sterilisane tokom 25 minuta na 120°C. Količina inokuluma je iznosila 5% v/v. Kultivacija je obavljena tokom 3 dana na 28°C i rotacionoj mućkalici (220 o/min.). Broj ponavljanja je iznosio tri.

Analize

Biomasa mikroorganizama je odvojena od prefermentisane podloge filtriranjem kroz Filtrak 388 filter papir. Suva težina micelije je determinisana sušenjem do konstantne težine na 105°C i meren je pH. Sirovi toksin je izolovan: 1) ekstrakcijom iz 100 ml filtrata pomoću etilacetata (3 x 50 ml) u levkovima za odvajanje i 2) ekstrakcijom iz 100 ml filtrata pomoću 1 g aktivnog uglja (Merck) (Ueno i sar., 1975). U poslednjem slučaju, nakon jednog sata mućkanja na 28°C i 220 o/min., ugalj je odvojen filtriranjem na vakuumu kroz Filtrak 388 i ispran sa 20 ml destilovane vode. Aktivni ugalj sa adsorbovanim T-2 toksinom je zatim potopljen

tokom noći u 20 ml metanola, profiltriran i još jednom ispran sa 10 ml metanola tokom jednog sata uz stalno mešanje, pa su obe metanolske frakcije na kraju objedinjene. Sirovi T-2 toksin je uparen do suva, rastvoren u 1000 μl hloroforma i količina mu je određena tankoslojnom hromatografijom na pločama (Kiselgel G; 0,25 mm) razvijanim u smeši hloroform-metanol (95+5 v/v). Razvijene ploče su prskane 25% sumpornom kiselinom i zagrevane 10 minuta na 130°C. Kvantifikacija toksina je izvršena vizuelnim poređenjem pod UV-svetlom sa poznatim količinama standarda T-2 toksina. Naknadno je izvršeno ponovno pranje aktivnog uglja vakuum filtracijom acetonom i metanolom, a T-2 toksin je u filtratu određen na prethodno navedeni način.

Tabela br. 1 PRINOS T-2 TOKSINA KOD IZOLATA Fusarium sporotrichioides U ZAVISNOSTI OD PRIMENJENOG POSTUPKA EKSTRAKCIJE

Kultura	Ekstr.	pH	Suvi ostatak (g/100 ml)	Prinos T-2	
				(mg/l)	(%)
ITM-496	1	4,07	0,529	15	100
	2			0	0
ITM-391	1	3,56	0,480	150	100
	2			105	70
M-1-1	1	3,37	0,358	300	100
	2			185	61
KF-38/1	1	3,97	0,549	135	100
	2			95	70
R-2301	1	3,95	0,365	120	100
	2			88	73

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati prikazani u tabeli 1 pokazuju znatan pad pH vrednosti tokom kultivacije u SPAK: od početnih 6,2 do 3,56-4,07, što je izrazitije nego u našim prethodnim istraživanjima (Bočarov-Stančić i Muntañola-Cvetković, 1988). Uočena pojava je verovatno posledica povećane aeracije primenjene u sadašnjem istraživanju. Naime, umesto uobičajenih 200 o/min, korišćenjem 220 o/min. postignut je ne samo veći pad pH i povećanje biomase mikroorganizama (suva masa micelija od 3,58-5,49 g/l) nego i brži ulazak u stacionarnu fazu kada se po pravilu (Ueno i sar., 1974) naglo povećava biosinteza T-2 toksina. Shodno tome, proces fermentacije je skraćen sa 5 dana, kada je, prema Ueno i sar. (1975) i našim ranijim istraživanjima (Duletić i sar., 1988), produkcija T-2 toksina mak-

simalna za svega tri dana kultivacije. Takođe, upotrebom metode ekstrakcije etil-acetatom postignuti prinosi istog mikotoksina od 15-300 mg/l su u većini slučajeva viši nego kod istih sojeva fusaria kultivisanih u SPK, 28°C, 200 o/min., tokom 5 dana. Npr. *F. sporotrichoides* M-1-1 (poznati producent T-2 toksina) je u uslovima našeg eksperimenta biosintetisao 300 mg/l sirovog T-2, prema Ueno i sar. (1975) 151 mg/l, a prema našem prethodnom ispitivanju, 120 mg/l (Bočarov-Stančić i Muntañola-Cvetković, 1988).

Dobijeno povećanje prinosa T-2 toksina se, međutim, ne može objasniti isključivo povećanjem aeracije. Naime, izvršena je jedna manja modifikacija originalne podloge (50 g/l saharoze + 1 g/l peptona + 1 g/l ekstrakta kvasca = SPK) koja, prema Ueno i sar. (1975), obezbeđuje sve neophodne elemente za produkciju visokih nivoa trihotecena. Ekstrakt kvasca (iz SPK) je zamenjen autolizatom kvasca s obzirom da je usled odsustva termičkog tretmana poslednji sigurno bogatiji izvor aminokiselina i drugih faktora rasta, što su i dokazala naša prethodna istraživanja (Bočarov-Stančić i sar., 1989 a).

U postupku dobijanja što čistijih preparata T-2 toksina iz prefermentisane produkcione podloge, od velikog je značaja sama ekstrakcija kao korak koji prethodi prečišćavanju. Iz tog razloga upotrebljen je, pored ranije korišćenog postupka sa organskim rastvaračima (Bočarov-Stančić i sar., 1986; Bočarov-Stančić i sar., 1989,) postupak baziran na primeni aktivnog uglja, koji su koristili Ueno i sar. (1975) u slučaju rada sa desetolitarskim količinama tečne podloge. Izvesne modifikacije su izvršene samo u smislu da je produženo vreme adsorpcije i desorpcije toksina, dok su svi ostali parametri ostali nepromenjeni. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1, vidi se da su u svim slučajevima (ekstr. 2) dobijeni niži prinosi T-2 toksina: od 27-39% nego pri upotrebi etilacetata (ekstr. 1). Uočeno sniženje bi se moglo možda izbeći posebnom obradom aktivnog uglja i povećanjem količine metanola kao desorpcionog sredstva, što je i dokazano naknadnim eluiranjem T-2 toksina sa aktivnog uglja kada su dobijeni prinosi 100%.

Submerzna kultivacija producenata T-2 toksina je odabrana s obzirom da se, prema podacima iz literature (Ueno i sar., 1979), čisti T-2 toksin i drugi trihoteceni mogu dobiti jednostepenom kolonskom hromatografijom, dok je pri njihovoj stacionarnoj kultivaciji neophodno prečišćavanje dvostepenom kolonskom hromatografijom.

COMPARISON OF TWO DIFFERENT EXTRACTION METHODS FOR T-2 TOXIN FROM LIQUID FERMENTATION MEDIUM USED FOR TOXICOGENIC FUSARIA CULTIVATION

Summary

Five toxicogenic strains of *Fusarium sporotrichioides* were cultivated in semi-synthetic liquid medium SPYA (sucrose 50 g/l, peptone-1 1 g/l; yeast autolisate 1 g/l) for 3 days at 28°C on a rotary shaker (220 rpm).

T-2 toxin was extracted from fermentation medium in two ways: 1) by the mean of ethylacetate, and 2) by the mean of active charcoal. In the latter case powdered charcoal was mixed continuously with culture filtrate, filtrated, washed with deionized water, and than immersed in methanol.

In all cases higher yields of T-2 toxin were obtained in the same fungal strain by the use of organic solvent (ethylacetate), but the extraction method with powdered charcoal yielded cleaner T-2 toxin preparations.

LITERATURA

Bočarov-Stančić, A., Duletić, S., Franić-Mihajlović, D. (1989 a): *Uticaj sastava hranjive podloge na biosintezu T-2 toksina kod toksikogenih izolata Fusarium sporotrichioides*. VI kongres mikrob. Jug., Maribor, Zbornik povzetkov, 105.

Bočarov-Stančić, A., Duletić, S., Muntañola-Cvetković, M. (1989 b): *Uticaj vještačkog održavanja kultura roda Fusarium na njihov toksikogeni potencijal*. Poseb. izd. ANUBiH, LXXX, Odjelj. med. nauka, 14, 37-42.

Bočarov-Stančić, A., Jovanović, Đ., Muntañola-Cvetković, M. (1986 a): *Biosinteza DAS i T-2 toksina kod izolata roda Fusarium sa poljoprivrednih kultura iz Jugoslavije*. Poseb. izd. ANUBiH, LXXX, Odjelj. med. nauka, 12, 129-145.

Bočarov-Stančić, A., Muntañola-Cvetković, M. (1988): *Ispitivanje biosinteze T-2 toksina u čistoj kulturi u različitim laboratorijskim uslovima*. Arh. hig. rada toksikol., 39, 227-233.

Bočarov-Stančić, A., Muntañola-Cvetković, M., Oberan, Lj. (1986 b): *Proizvodnja DAS i T-2 toksina kod izolata roda Fusarium sa pšenice*. Poseb. izd. ANUBiH, LXXX, Odjelj. med. nauka, 12, 147-160.

Duletić, S., Bočarov-Stančić, A., Muntañola-Cvetković, M. (1988): *Ispitivanje uticaja ekoloških faktora na biosintezu T-2 toksina kod odabranih sojeva Fusarium sporotrichioides*. IV kongr. ekol. Jug., Ohrid, Plen. ref. i saopštenja, 492-493.

Gregory, K. F., Allen, O. N., Richer, A. J., Peterson, W. T. (1952): Am. J. Bot., 39, 405.

Joffe, C. J., Yagen, B. (1977): *Comparative study of the yield of T-2 toxin produced by Fusarium poae, F. sporotrichioides, and F. sporotrichioides var. tricinctum from different sources*. Mycopathologia, 60, 93-97.

Smalley, E. B., Strong, F. M. (1974): *Toxic trichothecenes*. U: Micotoxins (I. F. H. Purchase ed.), Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 199-228.

Ueno, Y., Sato, N., Ishii, K., Sakai, K., Tsumada, H., Enomoto, M. (1973). *Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of Fusarium species*. Appl. Microbiol., 25, 699-704.

Ueno, Y., Sawano, M., Ishii, K. (1975): *Production of trichothecene mycotoxins by Fusarium species in shake culture*. Appl. Microbiol., 30, 4-9.

ANU
ВіН
АНУ
БиХ

REZULTATI PREGLEDA MOKRAĆE I FECESA SVINJA NA PRISUSTVO OHRATOKSINA A

ZORAN MAŠIĆ, ISIDOR RAJIĆ, SAVA PAVKOV, MIHAJLO MRĐEN

Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad
Veterinarski fakultet, Beograd

Apstrakt. Ohratoksin A iz organizma svinja izlučuje se u obliku metabolita ili u nepromenjenom stanju mokraćom i fecesom. U radu su prikazani rezultati izlučivanja ohratoksina A mokraćom i fecesom kod svinja nakon peroralnog unošenja ohratoksina A u koncentracijama od 5,97, 3,10 i 1,06 mg/kg hrane. U sva tri eksperimenta je utvrđeno da se ohratoksin A izlučivao većim količinama fecesom 0,059, 0,043, 0,031 mg/kg nego mokraćom (0,045, 0,038, 0,025 mg/l).

Organizam svinja u odnosu na druge životinje ima određenih specifičnosti u pogledu apsorpcije, distribucije i vremena poluraspada ohratoksina A. Smatra se da je kod većine životinja primarno mesto apsorpcije ohratoksina A proksimalni deo tankih creva, duodenum i naročito jejunum, što ukazuju i Kumagai i Aibara (5). Resorbovani deo ohratoksina A vezuje se nespecifično za albumine krvnog seruma. Novija saznanja Stojkovića i sar. (7) ukazuju na serumski protein male molekulske težine koji vezuje ohratoksin A gotovo na receptorskom nivou. Resorbovani ohratoksin A kod svinja ima vreme poluraspada od 88,8 časova, kako to navode Galtier i sar. (4). Fuchs i sar. (2) navode da je kod miševa glavni put eliminacije ohratoksina A iz organizma hepatobilijarni put, a samo delimično se ohratoksin izlučuje preko bubrega urinom. Storen i sar. (6) navode da se kod peroralno unetog ohratoksina A, urinom izluči 27% kao α ohratoksin, 12% ohratoksin A i 1-2% (4R) -4- hidroksiohratoksina A, dok se fecesom izlučuje u obliku α ohratoksina i ohratoksina A.

MATERIJAL I METODE RADA

Ispitivanja su izvedena u tri ogleda na svinjama prosečne starosti 2,5 meseca. Svinje su u obroku dobijale različite količine ohratoksina A, i to 5,97, 3,10 i 1,06 mg/kg hrane. Eksperimentalno hranjenje je trajalo 28 dana. Feces svinja, u kome je određivan ohratoksin A, uziman je petnaestog dana od početka ogleda, a urin

svinja je uzorkovan na kraju ogleda, i to direktno iz mokraćne bešike nakon klanja životinja. Određivanje ohratoksina A u mokraći i fecesu izvršeno je modifikovanom TLC metodom po Balzeamu i sar. (1).

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. PROSEČNE KONCENTRACIJE OHRATOKSINA A U MOKRAĆI I FECESU SVINJA

Ogled	n	Količina ohratoks. A mg/kg hra.	Količina ohratoksina A	
			mokraća mg/l	feces mg/kg
prvi	7	5,97	0,045	0,059
drugi	5	3,10	0,038	0,043
treći	7	1,06	0,025	0,031

Galtier i sar. (4) i Galtier i Alvimerie (3) navode da se peroralnim unošenjem ohratoksina A u organizmu svinja apsorbuje oko 65%, a ostatak toksina se pod uticajem intestinalne mikroflore hidrolizuje. Hidrolizacijom nastaje L-fenilalanin i netoksična 7-karboksilin 5-hloro-8-hidroksil 3,4 dihidro-3-metilizokumarična kiselina (α ohratoksin). U našim eksperimentima nismo bili u mogućnosti da određujemo α ohratoksin, tako da se izneti podaci odnose na utvrđeni ohratoksin A u mokraći i fecesu. U svim ogledima utvrdili smo nešto veće izlučivanje ohratoksina A iz organizma fecesom nego mokraćom, što nije u saglasnosti sa rezultatima Storena i sar. (6), koji navode da se kod pacova izlučuje veća količina ohratoksina mokraćom nego fecesom.

ZAKLJUČAK

Peroralnim unošenjem različitih koncentracija ohratoksina A u organizam svinja utvrđeno je veće izlučivanje toksina fecesom nego mokraćom.

THE RESULTS OF PIGS URINE AND FAECES EXAMINATIONS ON THE PRESENCE OF OCHRATOXIN A

Summary

Ochratoxin A from the pig organism is excreted through the urine an faeces as the metabolites or unchanged. Authors refer the results of ochratoxin A excretion through the urine and faeces after peroral aplication of ochratoxin in concentrations of 5,97, 3,10 and 1,06 mg/kg of feed. In all three experiments excretion of ochratoxin A was greater through the faeces (0,059, 0,043 and 0,031 mg/kg) than by urine (0,045, 0,038 and 0,025 mg/1).

LITERATURA

(1) Balzer, I., Bogdanić, Č., Pepeljak, S. (1978): *Rapid the Layer chromatographic method for determining aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenon in corn.* J. Assoc. off Anal. Chem., 61, 3, 584-585.

(2) Galtier, P., Alvinerie, M. (1976): *In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras.* Annis Rech. Vet. 7,91.

(3) Galtier, P., Alvimerie, M. and Charpenteau, J. L. (1981): *The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens.* FD Cosmet. Toxico., vol. 19, pp 735, 735-738.

(4) Fucas, R., Habazin-Novak, V., Radić, B., Peraica, M., Plestina, R. (1986): *Distribucija ohratoksina A u životinjama.* Simpozijum o mikotoksinima ANUBiH, knjiga LXXX, Odelj. med. nauka, knjiga 12, 89-92.

(5) Kumagai, S., and Aibara (1982): *Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the Rat.* Toxicol. Appl. Pharmacol., 64, 94-102.

(6) Storen, O., Helgerud, P., Holm, H., Størmer: *Formation of (4R)-4-hydroxyohratoxin A and ochratoxin from ochratoxin A by rats*, Procedings V IUPAC-Simposium, Wienna, 321-324.

(7) Stojković, R., Hult, K., Gamulin, S. and Plestina, R. (1984): *High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents.* Biochemistry international, 9, (1), 33-38.

ANU BiH АНУ БиХ

ANU
ВіН
АНУ
БиХ

DJELOVANJE ZEARALENONA NA HUMANOM IZOLIRANOM URETERU

SEID HUKOVIĆ I NEDIM HUKOVIĆ

Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog falaulteta, Sarajevo,

Apstrakt. Ispitivan je zearalenon na izolovanom kontrahirajućem humanom ureteru. Utvrđeno je da zearalenon, ovisno od doze, povećava efekt stimulacije unutrašnjih nerava. Zearalenon, osim estrogenog, odgođenog djelovanja, ima i direktni neposredni efekt. Brzi, neposredni efekt proizlazi iz njegovog djelovanja na membranske receptore.

ANU BiH АНУ БиХ

U V O D

Zearalenon je fuzariamikotoksin (F2), koji ima pretežno djelovanje na organe genitourinarnog trakta. Rijetka je prilika da se djelovanje mikotoksina može ispitivati na humanim izoliranim organima iz genitourinarnog trakta. Takva mogućnost postoji ako se dobije komadić humanog uretera zdravog davaoca prilikom transplantacije bubrega. (K a p i ć et al., 1990; H u k o v i ć, 1991). Uticaj mikotoksina, posebno zearalenona, je ispitivan na životinjskim model-sistemima. (H u k o v i ć, 1991).

Zearalenon djeluje estrogeno. Kao mikotoksin ima ekonomsko i medicinsko značenje. Spada među mikotoksine koji stvaraju najviše problema u našoj zemlji (B o č a r o v - S t a n č i ć et al., 1986). Medicinsko mu je značenje toksikološko i farmakoterapijsko. Kao toksin dolazi u obzir u humanoj medicini u vezi sa ishranom, a kao farmakoterapeutik dolazi u obzir njegov sintetski analog zearanol koji je četiri puta djelotvorniji od zearalenona (R e y n o l d s, 1989; *Task Force Report*, 116, 1989). Upotrebljava se kao estrogen, anabolik i kancerostatik kod adenoma prostate.

Izrada ovog rada je omogućena od strane Javnog fonda za nauku BiH preko Društvenog cilja 14.

Cilj ovog rada je pokazati efekt zearalenona na izolovanom humanom ureteru dobivenom od zdravog donora bubrega. Zadatak je stimulirati motorne nerve izolovanog uretera, dodavati zearalenon u raznim koncentracijama i registrovati modificirajući efekt mikotoksina na izazvanim kontrakcijama.

MATERIJAL I METODE

Za vrijeme transplantacije bubrega u Zavodu za transplantaciju organa u Sarajevu potrebno je skratiti ureter većeg davaoca manjem primaocu. Tom prilikom se odreže komad uretera da se smanji opasnost od presavijanja i eventualnog začepljena. Taj komadić uretera se odbacuje. Umjesto da se taj komadić odbaci, može se dati u laboratorij da posluži za eksperimente na izoliranim humanim organima. Upotreba takvog izoliranog zdravog humanog tkiva nema nikakve etičke zapreke, jer se radi o tkivu koje se inače odbacuje.

U laboratoriji se dobije komadić uretera veličine 1-1,5 cm, koji je jako kontrahiran. Ureter se pažljivo fiksira u posudu za izolirane organe i poveže sa izometrijskim transducerom. Ureter se suspendira u posudu za izolirane organe koja sadrži 20 ml Tyrodeove otopine zagrijane na 32°C i aerirane kisikom. U lumen se uvede platinska elektroda za transmuralnu stimulaciju. Stimulira se svake minute u trajanju od jedne sekunde sa sljedećim električnim parametrima: 10 Hz, 1 mS, 10 mA. Posuda se više puta ispire tokom adaptacije uretera i njegove relaksacije. Relaksaciju treba nekada čekati više sati.

Nakon relaksacije organa, počne se sa električnom stimulacijom i registracijom izometrijskih kontrakcija. Pošto se dobiju kontrolne kontrakcije, injicira se zearalenon. Zearalenon je netopiv u vodi, pa se prvo otapa u propilenglikolu. Injicira se 0,2 ml, a u tom volumenu je tolika koncentracija da u posudi bude 12,5, 25 ili 50 μg/ml. Zearalenon se ostavlja u posudi do 10 min, posuda se ponovo ispire i registruju kontrakcije nakon ispiranja.

Analiza efekta se vrši tako da se uporeduje visina kontrakcija, prije, za vrijeme i poslije zearalenona. Promatra se promjena visine izazvanih kontrakcija i bazalne linije. Ukoliko se mjeri visina kontrakcija od kontrolne bazalne linije do vrha kontrakcije, onda se dobije tzv. apsolutna visina, a ako se mjeri od promijenjene bazalne linije, onda se dobije relativna visina kontrakcija.

REZULTATI

Efekt stimulacije unutrašnjih nerava humanog uretera

Jednakomjerni električni nadražaji u jednominutnim intervalima izazivaju konstantne visine kontrakcija izolovanog humanog uretera. Nakon 100-200 izazvanih kontrakcija počinju ispadati pojedine kontrakcije, mada im visina nije bitno promijenjena. Nakon ispiranja posude, događa se ponekad da se izazove kontrak-

cija koja nije u direktnoj vezi sa stimulusom. Ovakve izazvane reakcije uretera, izometrijske kontrakcije, pogodne su za analizu djelovanja zearalenona.

Efekti zearalenona na izoliranom humanom ureteru

Zearalenon, ovisno od doze, djeluje povećavajući efekt stimulacije nerava. Isto tako djeluje povećavajući efekt dodatnog acetilholina.

Zearalenon u koncentraciji od 12,5 μg/ml sasvim malo povećava efekt stimulacije endogenih nerava. U većim koncentracijama efekt zearalenona je veći. Nakon ispiranja, povećane kontrakcije se sporo vraćaju prema kontrolnim vrijednostima. Davanje vehikuluma u istoj dozi ne mijenja reakcije izolovanog humanog uretera.

DISKUSIJA

Zearalenon povećava efekt stimulacije endogenih nerava izolovanog humanog uretera. Povećanje je tim veće što je veća doza, tj. postoji odnos između doze i reakcije. Nakon ispiranja zearalenona, kontrakcije se vraćaju na kontrolni nivo, što znači da se radi o efektu zearlenona.

Zearalenon je mikotoksin koji ima estrogeno djelovanje, ali koje se manifestira nakon nekoliko sati. Brzo djelovanje pokazano u ovom radu je vjerovatno posljedica djelovanja na membranske receptore. Zearalenon može doći u organizam čovjeka iz hrane. Prisutnost mikotoksina u hrani životinja i ljudi je dokazana. (Ožegović et al., 1986; Ožegović i Hlubna, 1977; Hlubna i Ožegović, 1986). Pregled o opasnosti zearalenona za ljudsko zdravlje izradila je grupa kanadskih autora (Kuiper-Goodman et al., 1987). Radi se o estrogenom i kancerogenom djelovanju, od čega ovo poslednje može biti rezultat estrogenog djelovanja. Sa druge strane estrogeni, a među njima zearalenol, mogu djelovati u terapiji kao kancerostatici samo kod tumora prostate.

Zearalenon, estrogeni mikotoksin, djeluje odgođeno, posredno, estrogeno, ali ima i direktno, neposredno i brzo djelovanje. Pomenuto brzo djelovanje odnosi se na povećanje efekta stimulacije izolovanog humanog uretera. Spada u mikotoksine za koje se traže nova istraživanja (Hesseltine, 1986). Za sada mu se pripisuju ekonomski značaj, a u budućnosti će imati sve već ekološki i medicinski značaj.

THE EFFECT OF ZEARALENONE ON THE ISOLATED HUMAN URETER

Summary

Zearalenon was injected in the isolated organ bath containing isolated and transmuraly stimulated human ureter. Zearalenon increased the effect of the intrinsic nerve stimulation.

LITERATURA

Bocarov-Stančić, A., Muntañola-Cvetković, M. i Oberan, Lj. (1986): *Sposobnost raznih izolata Fuzarium graminearum za biosintezu zearalenona pod određenim laboratorijskim uslovima.* Zbornik radova Drugog simpozija o mikotoksinima. Posebna izdanja, ANUBiH, 80, 105-119.

Hesseltine, C. W. (1986): *Global significance of mycotoxins.* Str. 1-8. U: Steyn, P. S. and Vieggaar, R. (ed.): Mycotoxins and phycotoxins. Elsevier, Amsterdam.

Hlubna, D. i Ožegović, L. (1986): *Rezultati istraživanja mikotoksina (Aflatoksin B_1, ohratoksin A i zearalenona) u Bosni i Hercegovini.* Zbornik radova Drugog simpozija o mikotoksinima. Posebna izdanja, ANUBiH, 80, 65-71.

Huković, N. (1991): *Uticaj zearalenona na glatkomišićne organe genito-urinarnog trakta in-vitro.* Zbornik radova IV simpozija o mikotoksinima. Posebna izdanja, ANUBiH CIII, Odjaljenje medicinskih nauka, knj. 17, str. 103-108..

Kapić, E., Mulabegović, N., Raiman, I., Potkonjak, D., Bošković, S. and Huković, S. (1990): *The isolated human ureter as a model-system in pharmacology.* Iugosl. Physiol Pharmacol. Acta, 25, 123-126.

Kuipper-Goodman, T., Scott, P. M. and Watanabe, H. (1987): *Risk assesment of mycotoxin zearalenon.* Reg. Toxicol. Pharmacol., 7, 253-306.

Ožegović, L. i Hlubna, D. (1977): *Plijesni i njihovi toksini u hrani ljudi i životinja.* Izolati. Veterinaria XXVI, 2-3, 183-188.

Ožegović, L., Šola, J. Hadžiabdić, E. (1986): *Mikroflora i broj spora plijesni u gramu hrane u smjesama za perad i ekonomičnost u proizvodnji u peradarstvu.* Zbornik radova Drugog simpozija o mikotoksinima. Posebna izdanja, ANUBiH, 80, 59-65.

Reynolds, J. E. E. (1989): *Martindale, The extra pharmacopoea,* 29 izdanje, The pharmaceutical press, London.

Cast Report, 116 (1989): *Mycotoxins economic and health risks.* Council for agricultural sciences and technology.

UTICAJ ZEARALENONA NA GLATKOMIŠIĆNE ORGANE GENITO-URINARNOG TRAKTA IN VITRO

NEDIM HUKOVIĆ

Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog falaulteta, Sarajevo

Apstrakt. Zearalenon mijenja reaktibilnost glatkomišićnih organa injiciran in vivo ili apliciran in vitro. Na izoliranom uterusu djeluje smanjujući osjetljivost prema endogenim i egzogenim neurotransmitorima, smanjuju se uz to spontane kontrakcije, njihova frekvencija i veličina. Reakcije duktus deferensa su više pojačane na endogene i egzogene neurotransmitore, dok su reakcije izoliranog mokraćnog mjehura manje pojačane pod uticajem in vivo apliciranog zearalenona. Zearalenon može imati toksikološki i terapijski značaj u humanoj medicini.

U V O D

Fuzariotoksin (F2), zearalenon i njemu slični spojevi spadaju u estrogene supstance čije je estrogeno djelovanje nešto slabije od stilbestrola, ali ipak dovoljno da djeluje u ppm koncentracijama (Kurtz and Mirocha, 1978). Danas se smatra da zearalenon kao mikotoksin izaziva najviše problema u zemlji (Bocarov-Stančić, 1986). Prisutnost mikotoksina u hrani životinja i ljudi je činjenica, te je tako zearalenon dokazan u ispitivanim uzorcima hrane (Ožegović et al., 1986; Ožegović i Hlubna, 1977; Hlubna i Ožegović, 1986).

Zearalenon kao estrogen ima odgođeno, indirektno, posredno djelovanje, što znači treba da prođe izvjesno vrijeme da se utvrdi njegovo estrogeno djelovanje, bar nekoliko sati. Postoje ranije tvrdnje da zearalenon može in vitro djelovati direktno, neposredno i brzo, ali za takve tvrdnje treba više dokaza (Huković, 1982; Huković i Mulabegović, 1982). Utvrđeno je ranije in vitro da penitrem A, citrinin i zearalenon povećavaju efekt stimulacije nerava glatkomišićnih

Izrada ovog rada je omogućena sredstvima Javnog fonda za nauku BiH preko Društvenog cilja 14.

organa, dok aflatoksin i ohratoksin djeluju inhibitorno (Huković i Mulabegović, 1982).

Cilj ovog rada je utvrditi djelovanje zearalenona apliciranog in vivo i in vitro. Djelovanje treba dokazati na glatkim mišićima organa iz genitourinarnog trakta, na izoliranim organima uzetim sa njima pripadajućim vanjskim motornim nervima, na tzv. izoliranim inerviranim organima (IIO). Zadatak je da se na izoliranom mokraćnom mjehuru, duktus deferensu i uterusu kontrolnih i tretiranih eksperimentalnih životinja utvrdi promjena visine izazvanih kontrakcija pod uticajem izvana dodatog acetilholina i zearalenona.

MATERIJAL I METODE

Ispitivanja su vršena na izoliranim organima uzetim od muških i ženskih štakora prosječne težine od 150 grama. Životinje su dobivene iz vivarija u Novom Sadu. Jedan dio životinja je injiciran zearalenonom 24, 36 i 72 sata prije žrtvovanja. Toksin je otopljen u propilenglikolu i injiciran u volumenu od 0,2 ml i u dozi od 5 mg/kg težine životinje. Drugi dio životinja je samo injiciran sa 0,2 ml propilenglikola, koji nije sadržavao zearalenon (kontrole).

Preparirani su sljedeći izolirani organi sa njihovim vanjskim motornim nervima: mokraćni mjehur, duktus deferens i uterus. Mokraćni mjehur je model-sistem za holinergičnu neurotransmisiju, koja je dijelom rezistentna na atropin. Na stimulaciju pripadajućih nerava reagira jakim mikcionim kontrakcijama. Duktus deferens je model-sistem za adrenergičnu neurotransmisiju. Uterus je model sistem da se ustanovi djelovanje zearalenona na ženski genitalni organ. Stimulisani su vanjski i unutrašnji nervi uterusa. Vanjski nervi se uvlače u bipolarnu elektrodu i, skupa sa elektrodom, stavljaju u posudu za izolirane organe. Organi su suspendirani u 20 ml Tyrodeove otopine, koja je zagrijana na 32 stepena C i aerirana kisikom. Organi se vežu za izometrijski transducer.

Motorni nervi se stimuliraju svake minute u trajanju od jedne sekunde sa električnim stimulusima sljedećih parametara: 10 mA, 1mS, 10 Hz. Posuda se prethodno ispire više puta. Nakon dodavanja zearalenona in vitro, posuda se ispira više puta. Nakon što se dobiju kontrolne kontrakcije, injicira se zearalenon ili acetilholin (mikromolarna koncentracija). Pošto zearalenon nije topiv u vodi, prvo se rastvori u propilenglikolu, a onda se injicira u volumenu od 0,2 ml, tako da je u posudi 12, 25 ili 50 μg/ml. Stvori se suspenzija. Nakon određenog vremena posuda se ispire. Druga vrsta eksperimenta je kada se stimuliraju nervi organa životinja koje su prethodno za života tretirane zearalenonom. Tu se ispituje efekt stimulacije nerava i dodavanjem acetilholina ili zearalenona da se ustanovi promjena osjetljivosti na endogeni i egzogeno dodati transmitor, odnosno zearalenon.

Analiza se vrši uporedivanjem rezultata dobivenih na kontrolnim i tretiranim organima. Isto tako se uspoređuju rezultati dobiveni prije i poslije dodavanja zearalenona.

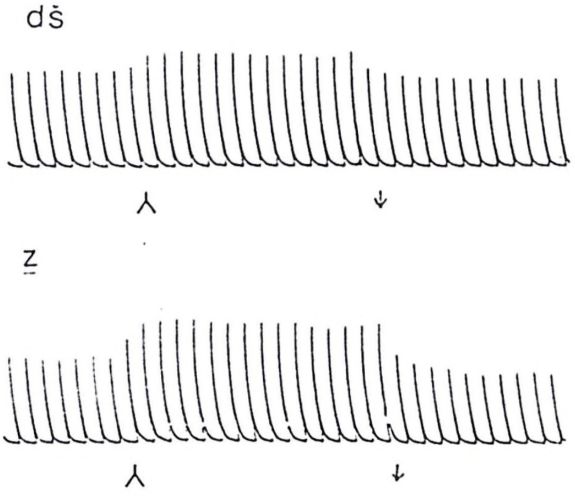
REZULTATI

Djelovanje zearalenona na kontrolnim organima

Efekt stimulacije pelvičkih motornih nerava na mokraćnom mjehuru je mikciona kontrakcija. Kontrakcije se mogu ponavljati svake minute nekoliko sati, a da se visina izazvanih kontrakcija bitno ne promijeni. Dodavanjem zearalenona u posudu za izolirane organe u koncentracijama, 12, 25 ili 50 μg/ml nije signifikantno mijenjan efekat stimulacije pripadajućeg nerva. Dodavanjem vehikuluma u istom volumenu se nije mijenjao oblik ni intenzitet reakcija mokraćnog mjehura. Na duktus deferensu stimulacija hipogastričkih motornih nerava izaziva kontrakcije koje se mogu ponavljati više puta. Dodavanjem zearalenona u posudu za izolirane organe koncentracijama u posudi za izolirane organe, 12, 25 ili 50 μg/ml malo mijenja reakciju na stimulaciju motornog hipogastričkog nerva. Kontrolni uterus koji je također stimuliran preko hipogastričkih vanjskih i unutrašnjih nerava ima spontane kontrakcije. Kontrakcije, ipak, imaju veze sa stimulacijom nerava. Dodavanje zearalenona u gore navedenim dozama je donekle mijenjalo efekte stimulacije nerava. Zearalenon smanjuje efekt stimulacije nerava i smanjuje jačinu i broj spontanih kontrakcija. Svi pomenuti nalazi in vitro nisu signifikantni, jer se ne mogu uvijek ponoviti. Razlog je vjerovatno netopivost zearalenona u vodi i nekonstatna koncentracija na receptoru.

Uticaj prethodno in vivo injiciranog zearalenona

Ukoliko se prethodno životinji još za života injicira zearalenon, pa se ispituje efekt endogeno i egzogeno dodatih transmitora ili zearalenon, može se us-



Slika 1. Kontrakcije izoliranog duktus deferensa štakora izazvane električnom stimulacijom adrenergičkog motornog nerva. Kod znaka λ je dodat acetilholin 10^{-6} g/ml. Kod znaka f posuda je isprana. Gore kontrolni organ, dole organ uzet od životinje prethodno tretirane zearalenonom

tanoviti da zearalenon mijenja reaktibilnost organa. Nakon što se in vivo injicirao zearalenon, na takvim organima se ispituje efekt stimulacije motornih nerava uz ponovno dodavanje zearalenona ili acetilholina in vitro. Ponovno injiciranje zearalenona in vitro će imati vidljiv efekt jedino na uterusu u smislu smanjenja povećanja djelovana električne stimulacije nerava. Smanjene su spontane kontrakcije i efekt stimulacije pripadajućeg motornog nerva.

Kontrakcije izoliranog duktus deferensa štakora izazvane električnom stimulacijom adrenergičkog motornog nerva. Kod znaka je dodat acetilholin 10-6 g/ml. Kod znaka ! posuda je isprana. Gore kontrolni organ, dole organ uzet od životinje prethodno tretirane zearalenonom.

Na drugim ispitivanim izoliranim organima-mokraćnom mjehuru i duktus deferensu (sl. 1) efekt prethodno injiciranog zearalenona se može registrovati kao povećanje efekta stimulacije pripadajućih nerava i povećanje efekta dodatoga acetilholina. U odnosu na kontrolne efekte acetilholin jače djeluje na prethodno tretiranim organima. Uterus međutim nije senzibilisan prethodno injiciranim zearalenonom na djelovanje acetilholina. Efekt stimulacije nerava je manji i efekt dodatog acetilholina je manji.

DISKUSIJA

Zearalenon kao mikotoksin sa izrazitim estrogenim djelovanjem mijenja reakciju ispitivanih izoliranih glatkomišićnih organa iz genituurinarnog trakta. Promjena se može registrovati na nekim organima nakon in vitro i nakon in vivo injiciranog zearalenona. Ukoliko su organi uzeti od životinja koje su prethodno in vivo tretirane zearalenonom, onda se može registrovati povećanje reakcije na nervnu stimulaciju i na dodani acetilholin, dakle povećava se osjetljivost na endogene i egzogene neurotransmitore. Uterus je izuzetak, jer na kontrolnim izoliranim uterusima se registruju snažne spontane ontrakcije, mada imaju veze sa električnom stimulacijom. Uterus uzet od životinja koje su prethodno in vivo tretirane zearalenonom je neuporedivo mirniji, vrlo malih i rijetkih spontanih kontrakcija, ali znatno slabije reagira na efekte stimulacije nerava ili dodatog acetilholina.

Zearalenon kao fuzarijatoksin (F2) spada među ekonomski najvažnije mikotoksine. Mnogo je važniji u toksikološkim negativnom nego u pozitivnom terapijskom smislu. U negativnom smislu je posebno značajan u svinjogojstvu. Kod ženki izaziva hiperestrogenizam, a kod mužjaka feminizaciju. Sa druge terapijske strane zearalenol, koji je reducirana forma zearalenona, ima četiri puta veću estrogenu aktivnost od zearalenona. Komercijalna forma je sintetizirani zearalenol, pod tvorničkim imenima Frideron, Rolon i Ralgro (*Task force Report*, 116, 1989; Hesseltine, 1986). Upotrebljava se kao estrogen i anabolik (Reynolds, 1989).

Zearalenon kao mikotoksin još nije u humanoj medicini zauzeo ono mjesto koje mu po njegovoj toksičnoj moći pripada. Dolazi u obzir za intoksikaciju direktno iz biljne ili indirektno iz životinjske hrane. Pregled o opasnosti od zearalenona

izradila je grupa kanadskih autora (Kuiper-Goodman et al., 1987). Moguća je estrogena i kancerogena aktivnost. Ova poslednja je rezultat estrogenizma. Kanadska grupa ne predlaže za sada zakonsku regulaciju u vezi sa hranom kontaminiranom zearalenom.

Pokazano je u ovom radu da postoji direktno djelovanje zearalenona na glatkomišićne organe iz genitourinarnog trakta. Ovdje se misli na djelovanje in vitro, in vivo i ex vivo. Djelovanje je slično djelovanju drugih estrogenih supstanci na uterusu, mokraćnom mjehuru i duktus deferensu. Direktno i neposredno djelovanje je rezultat djelovanja na membranske receptore, dok je indirektno djelovanje rezultat uticaja preko plazmatskih receptora.

THE EFFECT OF ZEARALENONE ON THE SMOOTH MUSCLE OF THE ORGANS OF GENITO-URINARY SYSTEM IN VITRO

Summary

Zearalenon was applied in vivo and in vitro, in order to study the effect on the isolated urinary bladder, ductus defferens and uterus. The isolated organs were contracted by electrical stimulation of their motor nerves. Zearalenon increased the effect of nerve stimulation and acetylcholine on ductus defferens and urinary bladder and decreased on uterus.

LITERATURA

Bočarov-Stančić, A., Muntañola-Cvetković, M. i Oberan, Lj. (1986): *Sposobnost raznih izolata Fusarium graminearum za biosintezu zearalenona pod određenim laboratorijskim uslovima.* Zbornik radova o Drugom simpoziju o mikotoksinima. Posebna izdanja, ANUBiH, 80, 105-119.

Hesseltine, C. W. (1986): *Global significance of mycotoxins.* str. 1-18. U: Steyn, P. S. and Vleggaar, R. (ed). Mycotoxins and phycotoxins. Elsevier, Amsterdam.

Hlubna, D. i Ožegović, L. (1986): *Rezultati istraživanja mikotoksina (Aflatoksina B_1, ohratoksina A i zearalenona) u Bosni i Hercegovini.* Zbornik radova o Drugom simpoziju o mikotoksinima. Posebna izdanja, ANUBiH, 80, 65-71.

Huković, S. (1982): *Neuromišićna transmisija i uticaj mikotoksina.* Zbornik radova o Prvom simpoziju o mikotoksinima. Posebna izdanja, ANUBiH, 60, 101-108.

Huković, S. i Mulabegović, N. (1986): *Analiza toksičnih djelovanja mikotoksina na izoliranim inerviranim organima.* Zbornik radova o drugom simpoziju o mikotoksinima. Posebna izdanja, ANUBiH, 80, 11-15.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. and Watanabe, H. (1987): *Risk assesment of the mycotoxin zearalenone.* Reg. Toxicol.

Kurtz, H. J. and Mirocha, C. J. (1978): *Zearalenone (F2) induced estrogenic syndrome in*

swine. Str. 1256-1264. U: Wyllie, T. D. and Morehouse L. G. (ed) Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses, Marcel Dekker, New York.

Ožegović, L. i Hlubna, D. (1977): *Plijesni i njihovi toksini u hrani ljudi i životinja*. Izolati XXVI, 3, 183-188.

Ožegović, L., Sola, J. i Hadžiabdić, E. (1986): *Mikroflora i broj spora plijesni u gramu hrane u smjesama za perad i ekonomičnost u proizvodnji u peradarstvu*. Zbornik radova o Drugom simpoziju o mikotoksinima. Posebna izdanja, ANUBiH, 80, 59-65.

Reynolds, J. E. F. (1989): *Martindale, The extra pharmacopoea*, 29 izdanje. The pharmaceutical press, London.

Task Force Report No 116 (1989): *Mycotoxins economic and health risks*. Council for agricultural science and technology.

ANU BiH АНУ БиХ

DJELOVANJE ZEARALENONA NA ADREN ŠTAKORA – HISTOLOŠKE PROMJENE

LJERKA BABIĆ, JOJIN IVETIĆ, LADISLAV OŽEGOVIĆ, NEJRA BAJRAMOVIĆ

Veterinarski fakultet, Sarajevo

Apstrakt. Zearalenon je per os (intabacijom) apliciran mladim štakorima u dozama od 1,3 i 5 mg/kg. Štakori su bili eutanazirani 7, 14, 21. i 28. dana nakon aplikacije zearalenona, adreni fiksirani i histološki pretraženi. Histološke promjene su utvrđene u dane 21 i 28 sa dozom od 3 mg/kg i u dane 7, 14, 21 i 28 sa dozom od 5 mg/kg. Promjene su uočene na krvnim žilama i sinusoidama (ektazije, krvarenja, edemi), a nakon tih i na stanicama (vakuolizacija) pojedinih zona kore i u manjoj mjeri medule adrena. Pretpostavlja se da su ovi efekti na krvnim žilama i sinusoidama poznati iz prirodnog toka estrogenizma - zearalenone toksikoze u svinja i prasadi napose, poseban efekat toksina i da nisu povezani uz njegove estrogene aktivnosti.

Utvrđeni su efekti djelovanja zearalenona, mikotoksina estrogena na reproduktivne organe, kao i količine i trajanje aplikacije toksina koje dovode do poremećaja, od lažnog estrusa do steriliteta (Mirocha i sar. 1977). S obzirom na slično djelovanje estradiola, istaknuta je hipoteza o mogućem kancerogenom djelovanju zearalenona u ljudi koji na određenim područjima uživaju hranu kontaminiranu zearalenonom. Naša istraživanja o djelovanju zearalenona na prostatu i sjemene kesice (v. seminales) štakora proširila su ta istraživanja o mogućnosti djelovanja zearalenona na ostale organe (Babić i sar. 1989, 1990). Jedini podatak o djelovanju zearalenona na ostale organe iznose Lončarević i sar. (1982) o promjenama u krvi prasadi (sa vulvovaginitisom), koja su dijaplacentarno i putem kolostruma dobijala (transformirani) zearalenon, koji se nalazio u hrani krmača hranjenih kontaminiranim kukuruzom.

Činilo nam se važnim i potrebnim obratiti pažnju o djelovanju zearalenona na ostale organe u štakora trovanih zearalenonom, jer građa i metabolizam ovog toksina upućuju da bi, osim "ciljnih" organa, direktno ili indirektno mogli biti uključeni i drugi organi. Na to posebno upućuju rezultati istraživanja o djelovanju zearalenona na adeno-hipofizno-hipotalamičnom području (Drugociu i sar.,

1977; Bilcea i sar. 1979). U ovom radu se objavljuju rezultati o djelovanju zearalenona na adren štakora.

MATERIJAL I METODE RADA

Istraživanja su vršena na štakorima starim 2 mjeseca, tjelesne mase cca 375 grama. Životinje su hranjene standardnom peletiranom hranom, vodu uzimale ad libitum, a zearalenone^{+} su dobijale intubacijom direktno u želudac. Zearalenon je bio otopljen u suncokretovom ulju, te je za pojedine doze u ispitivanju određena potrebna koncentracija, što se vidi iz tabele 1.

Tabela 1. PRIKAZ SKUPINA ŠTAKORA, DOZA ZEARALENONA I TRAJANJA POKUSA

Skupina	Doza	Trajanje pokusa u danima	n štakora
A	1 mg/kg	7-14-21-28	20
B	3 mg/kg	7-14-21-28	20
C	5 mg/kg	7-14-21-28	20
K	0	7-14-21-28	10

Svakih 7 dana od početka davanja toksina formirane skupne su eutanazirane eterskom anestezijom, zatim obducirane, uzeti su organi i pretraženi histološki metodom hematoksilin-eozin. Od svake skupine je uzeto 5 x 5 rezova adrena, kao i od kontrolnih štakora.

REZULTATI I DISKUSIJA

Mikroskopskim pregledom patohistološke slike preparata adrenalne žlijezde štakora tretiranih zearalenonom, u poređenju sa kontrolnom skupinom, ustanovili smo:

-*SKUPINA A (1 mg/kg tjelesne mase):* U preparatima uzetim nakon 7, 14, 21. i 28. dana od davanja zearalenona nisu uočene promjene, osim na kapilarima, koje su ektatične i skoro prazne u svim područjima žlijezde:

-*SKUPINA B (3 mg/kg tjelesne mase): 7. i 14. dana* od davanja zearalenona patohistološka slika ne pokazuje posebne promjene, osim što su periglandularne kapilare ektatične, kao i kapilare medule, gdje se mjestimično uočavaju i ekstravazati.

U preparatima životinja koje su zearalenon primale *21 dan* u tkivu kapsule su uočljivi veći hematomi sa hemoliziranim eritrocitima. U prve dvije zone kore

nema uočljivih promjena, dok se u zoni retikularis (na nekim mjestima) pojavljuju krvni ekstravazati, koji se pružaju prema središtu medularnog dijela, čija mikrovaskulatrura manifestira fenomene hiperemije.

U preparatima životinja koje su zearalenon dobijale *28 dana* stanice zone glomeruloze su svjetlije, a subkapsularno se javljaju slabiji ekstravazati. Kod stanica zone fascikulate počinje jača vakuolizacija citoplazme, pa zona dobija pjenušav izgled. Sinusoidne kapilare svih zona kore su hiperemične. Na prijelazu zone retikularis u medulu često se vide obimniji krvni ekstravazati koji ulaze u periferni dio medule. Eritrociti u tim ekstravazatima su većinom aglutinirani. U meduli, osim jake hipermije, javlja se i incipijentni intercelularni edem.

SKUPINA C (5 mg/kg tjelesne mase): Kod životinja koje su dobijale zearalenon *7 dana* ustanovljena je umjerena hipermija periglandularnog masnog tkiva i ostalog veziva kapsule. Na pojedinim mjestima počev od kapsule pa sve do medule adrena zapaženi su ekstravazati eritrocita u formi tačaka koje se jasno razabiru. Zona glomeruloza je negdje jače, a negdje slabije razvijena, što smo primijetili kod svih pregledanih preparata, pa i kontrolnih životinja. Redukcija ove zone ponegdje ide do njenog nestanka.

Stanice zone fascikulate su pravilno poredane u nizove. Citoplazma ovih stanica je vakuolizirana, naročito u perifernim područjima zone, što odgovara slici ove zone u kontrolnih životinja ali su vidljive i stanice sa znatnom vakuolizacijom, od čega stanica izgleda kao okrugla i ovoidna svijetla vakuola.

Sinusoidne kapilare ovih dviju zona kore pokazuju diskretnu hiperemiju. Zona retikularis ne pokazuje znatnijih promjena, osim jake kongestije kapilara, i to naročito u području bližem meduli.

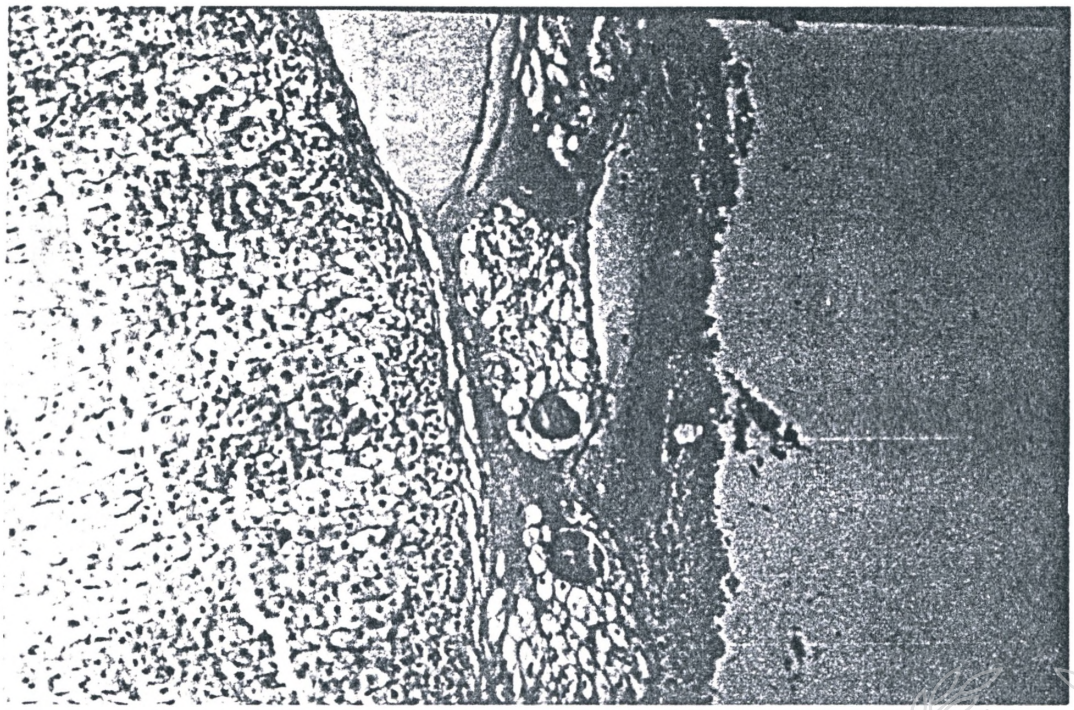
Stanice medule su nepravilno raspoređene i teže se međusobno diferenciraju. Mikrovaskulatura ovog područja je hiperemična, naročito u perifernim zonama prema zoni retikularis.

Nakon *14 dana* dobijanja 5 mg/kg krvni sudovi periglandularnog tkiva su ektatični i jako kongestirani. Zona glomeruloza je bez uočljivih promjena, osim već opisane različite razvijenosti.

Spongiociti zone fascikulate pokazuju još jaču vakuolizaciju, a u pojedinim sektorima ove zone jezgre stanica se uočavaju kao mutne okrugle sjene. Međusobne granice stanica su nejasne, što sve može ukazivati na paremhimsku distrofiju.

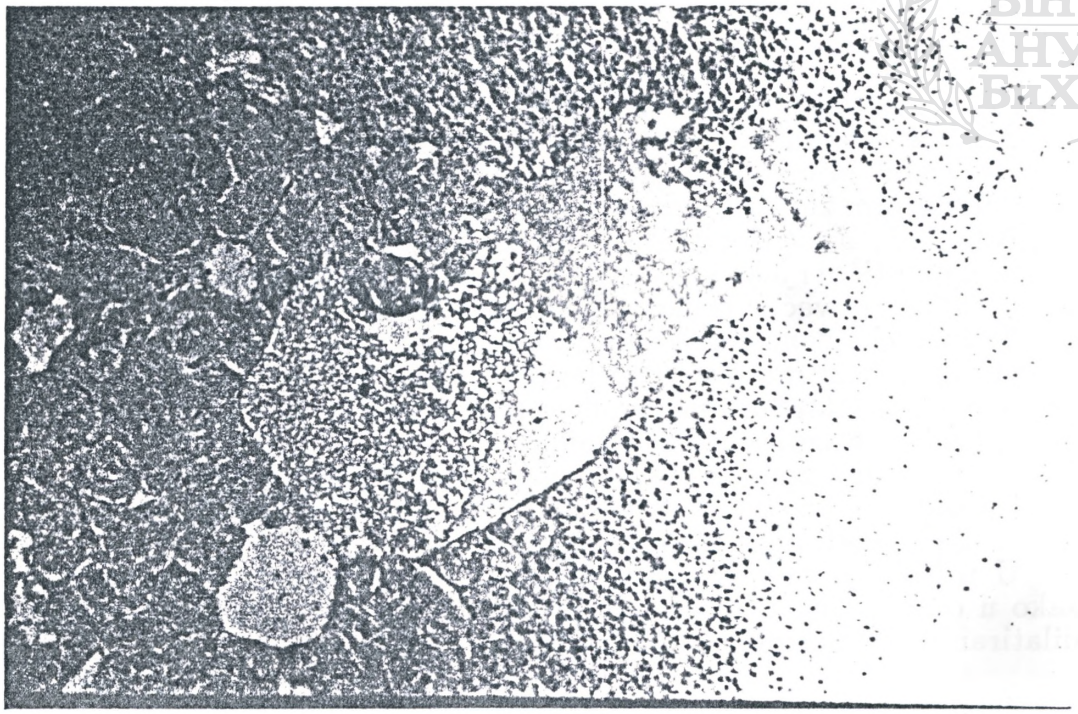
U stanicama zone retikularis zapaža se diskretna vakuolizacija ali mikrovaskularnom slikom dominira jaka hiperemija krvnih žila koja je izraženija u dijelovima bližim meduli.

U meduli je mikrovaskulatura napadno ektatična i hiperemična, kako u centralnim, tako i u perifernim dijelovima. Eritrociti u ovako dilatiranim kapilarima se međusobno jasno razabiru.

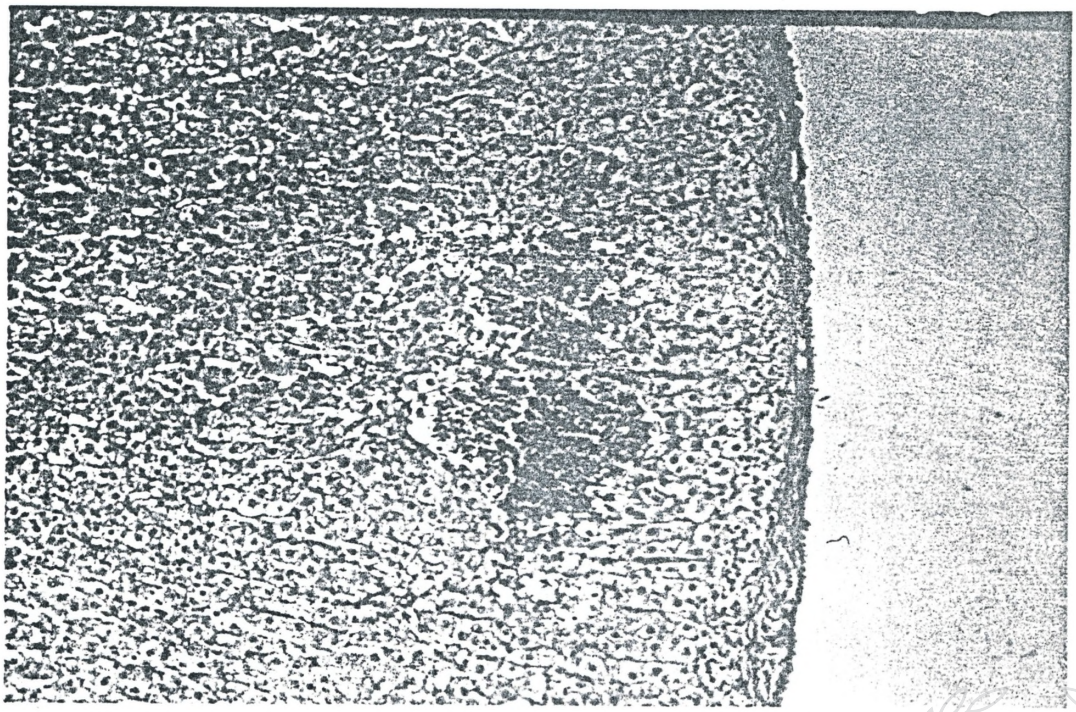


Slika 1 – Hematom u kapsuli sa hemoliziranim eritrocirima (3 mg/kg, 21 dan)

Slika 2 – Opsežni ekstravazat kroz koru i medulu adrena (3mg/kg, 28 dana)

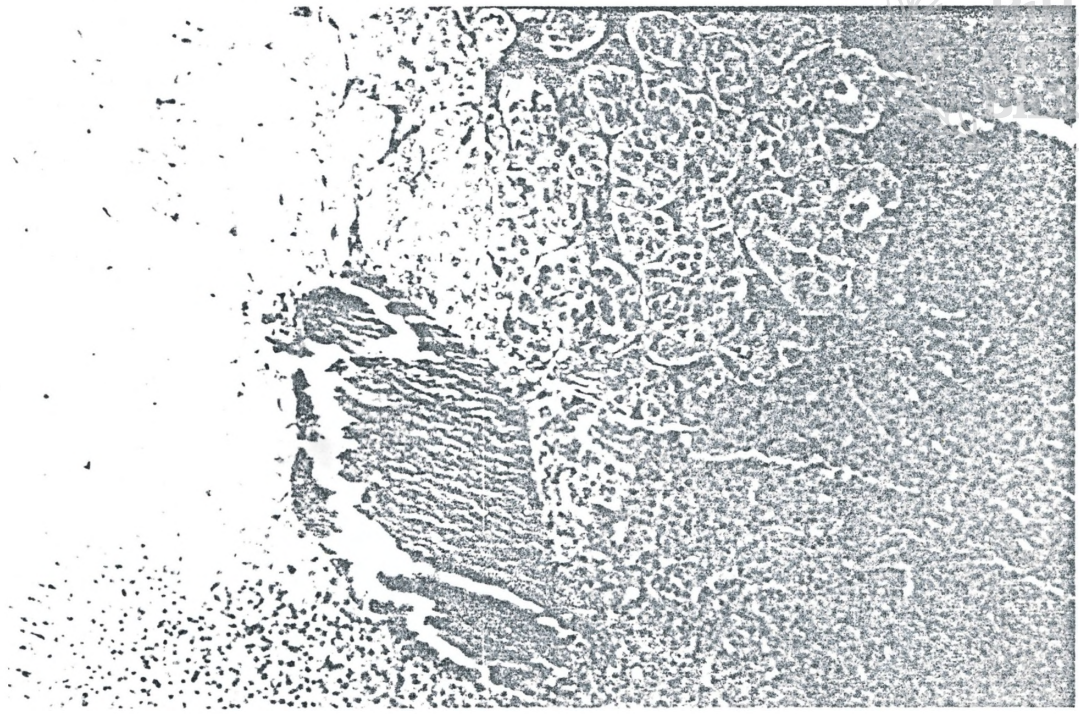


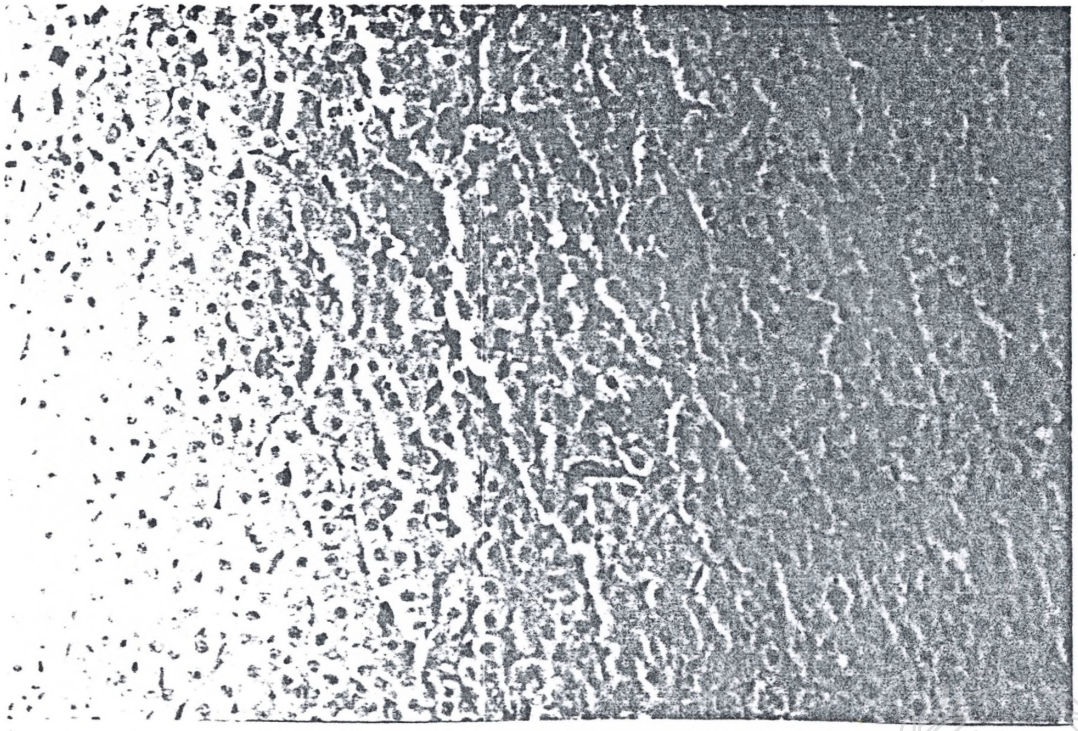
ANU BiH
АНУ БиХ



Slika 3 – Opsežan ekstravazat kroz koru adrena (3 mg/kg, 28 dana)

Slika 4 – Krvarenja u meduli adrena i redukcija zone retikularis (5 mg/kg,7 dana)





Slika 5 – Hiperemija kapilara sa krvarenjem u zoni fascikulati (5 mg/ kg, 14 dana)

Slika 6 – Redukcija zone glomeruloze i vakuolizacija spongiocita (5 mg/kg, 21 dan)

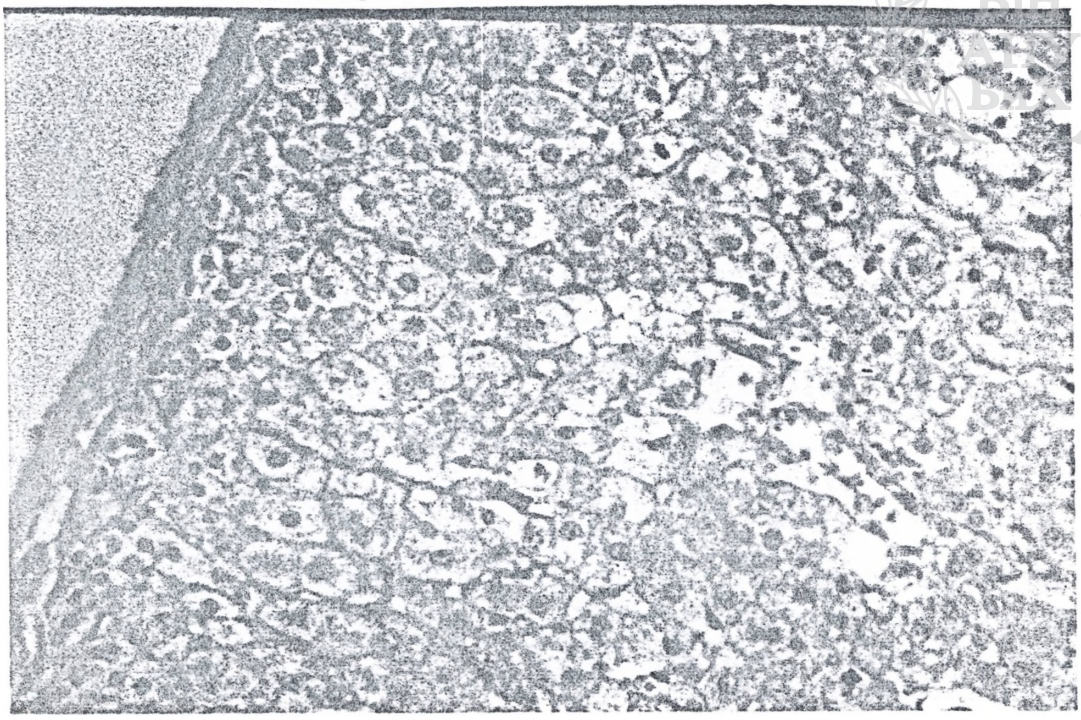


Tabela 1. DJELOVANJE ZEARALENONA NA ADREN ŠTAKORA – HISTOLOŠKE PROMJENE

Eksperiment	Doza	Broj dana	N	A	L	A	Z	
			hiperemija	krvarenje	z. glomerulosa	z. fasciculata	z. reticularis	medulla
A	1 mg/kg	7, 14, 21, 28	kapilare prazne	0	0	0	0	0
B	3 mg/kg	7 i 14	ektatične kapilare	0	0	0	0	ekstravazati
		21	0	hematomi	0	0	ekstravazati	hiperemija
		28	++	ekstravazati	ćelije su svjetlije boje	vakuolizacija citoplazme	ekstravazati	ekstravazati, edem
C	5 mg/kg	7	+	0	jače i slabije razvijena	vakuolizacija citoplazme	kongestije kapilara	hiperemija
		14	++	+	različita razvijenost	vakuolizacija, parenhimska distrofija	vakuolizacija, jaka hiperemija	hiperemija
		21	0	+	redukcija	vakuolizacija	ćelije su svjetlije, hiperemija	ćelije svjetlije, hiperemija
		28	++	++	++	++	++	++

Kod doza od 5 mg/kg kroz *21 dan*, u suprakapsularnom tkivu je vidljiva pojava ekstravaziranih eritrocita. Kod ove doze uočljivija je razlika u debljini zone glomeruloze, što bi moglo značiti redukciju ove zone.

Stanice zone fascikulate su nejasnih međusobnih granica i slabo se međusobno diferenciraju skoro u svim područjima ove zone. Citoplazma je blijeda i homogena u središnjim dijelovima zone, a bogato vakuolizirana u perifernim dijelovima. Jezgre ovih stanica se slabo uočavaju kao mutne okrugle sjene ili se uopće ne vide. Sinusoidne kapilare, zbog jake kongestije, izgledaju kao uzdužne, tamnocrvene pruge između nizova spongiocita.

Na stanicama zone retikularis tek 21 dan nakon tretmana ovom dozom zearalenona se uočavaju izvjesne promjene. I one počinju da se slabije međusobno diferenciraju, što je više izraženo u onim dijelovima zone koji su bliži meduli. Citoplazma stanica postaje svjetlija, a jezgre su slabije vidljive zbog slabije obojenosti. Mikrovaskulatura ovog područja je i dalje hiperemična. Stanice srži—medulociti također pokazuju slabiju obojenost, kako citoplazme tako i jezgara. U nekim područjima i ove stanice se teže diferenciraju. Kapilarna mreža je ektatična i hiperemična, a na graničnim dijelovima prema zoni retikularis javljaju se krvni ekstravazati.

Sa dozom od 5 mg/kg tjelesne mase kroz *28 dana* patohistološka slika odgovara onoj kod životinja tretiranih istom dozom 21 dan: jedino su promjene vezane uz mikrovaskularizaciju medule još izraženije. Na nekim mjestima eritrociti su stopljeni u homogenu eozinofilnu masu.

Kvalitativni i kvantitativni uvid u djelovanje pojedinih doza i intervala vidi se na priloženoj tabeli i fotografijama.

Kako se iz priloženih materijala vidi, djelovanje zearalenona je očito na krvnim žilama, te je vjerojatno taj efekat neposredan. Kao rezultat tog djelovanja nastaju određene promjene u žlijezdi, kako na samim stanicama, tako i u pojedinim zonama adrena.

U literaturi postoji opis djelovanja estradiola na adren štakora (100 gama/die kroz 9 mjeseci), te se iz opisa slike vidi da je došlo do povećanja cijele kore adrena. Uočljiva je iz tog pokusa jaka hiperemija sa velikom dilatacijom kortikalnih sinusoida. Zona glomeruloza je nejasna. Sam adren je u tom pokusu bio težak 122 mg, dok je u netretiranog zdravog štakora težina adrena iznosila 44 mg. Težina adrena se mijenja nakon hipofizektomije (15 mg), aplikacije dekortikosteron acetata (23 mg) i implantacije testosterona (30 mg) (Selye, 1950).

Ovo djelovanje zearalenona, koje po svojim efektima pokazuje linearno sa porastom doza i vremena aplikacije toksina sve veće promjene na krvnim žilama, poznato je iz prirodnih trovanja svinja, posebno mladih (otok i krvarenja u perineumu, prepucijumu, vulvi i rektumu), i ne bi se moglo dovesti u uzročnu vezu s estrogenim djelovanjem toksina na jajnike, uterus i testise. U pokusnim trovanjima utvrđen je pad Ca u ispirku iz uterusa trovanih krmača (Long i sar.), a u tek oprašene prasadi sa vulvovaginitisom utvrđen je poremećen odnos proteina u krvi,

pad koncentracije ukupnih proteina, pad albumina i pad koloido-osmotskog pritiska bjelančevina seruma (Lončarević i sar., 1982). Utvrđene promjene u adrenu tretiranih štakora ukazuju svojim kvantitativnim i kvalitativnim promjenama da su nastale kao posljedica djelovanja većih doza zearalenona u duljem intervalu, ali se ne može iz utvrđenih promjena zaključiti koji bi mehanizam mogao biti za to odgovoran. Iskustva Longa i sar. i Lončarevića i sar. nude neka objašnjenja, koja bi ipak trebalo provjeriti prije nego se mogne ustvrditi, da su za fenomene edema i krvarenja u prirodnim slučajevima i u navedenim pokusnim trovanjima krvi smanjena koncentracija Ca (u serumu ili u tkivu?) i disproteinemija.

ZAKLJUČAK

Iz naših istraživanja slijedi da je u toku trovanja zearalenonom kod većih doza i u duljem intervalu aplikacije došlo do promjena na krvnim žilama, kapilarama i sinusoidima (ektazija, krvarenja, edem) te da su ti ekstravazati (sekundarno?) doveli do promjene u veličini i obojenosti stanica, pretežno u kori adrena. Iz pokusa se ne može zaključiti, da je kora adrena u cjelini povećana na štetu medule, kako je to vidljivo u pokusima Selye kod aplikacije estradiola štakorima.

EFFECTS OF ZEARALENONE ON THE ADREN IN RAT—HISTOLOGICAL CHANGES

Summary

Zearalenone was per os (intubation) applied to juvenile rats in doses of 1, 3 and 5 mg/kg and on days 7, 14, 21 and 28 rats were euthanazied and adrens histologically examined. Histological changes were found on the day 21 and 28 with the dose of 3 mg/kg, and on days 7, 14, 21 and 28 with 5 mg/kg only. The changes consisted of ectasias, haemorrhagies and oedema on the capillaries and sinusoids, and thereafter in changes on the cells (esp. vacuolization) in different zones of cortex and less in the medulla of adren. It is presumed, that this effects on blood vessels, very well known in the natural course of oestrogenism in pigs and-specially in piglets, is not connected with estrogenic activity of the toxin.

LITERATURA

Babić, Ljerka, Ožegović, L., Marković, Z., Adilović, S. (1989): *Uticaj zearalenona na histološke promjene u prostati štakora.* ANUBiH, 14, 61-69. LXXXIX

Babić, Ljerka, Ožegović, L., Bajramović, Nejra (1990): *Histološke promjene sjemenih kesica (v. seminales) pacova tretiranih zearalenonom.* Veterinaria, 39, 3-4, 291-296.

Bilcea, P., Nafornita, M., Bedrosian, E., Theodorescu, D., Botarel, S., Tomescu, E., Sincai, M. (1979): *Statuss-ul hormonal la scroafele si scrofitele de reproducite, sub influenta agentilor patogeni din genul Fusarium.* Lucrari Stiintifice Agron, Timisoara, Med. Veterinara, 16, 157-159.

Drugociu, G., Runceanu, L., Cotea, C., Coman, I., Popescu, O., Nicorici, R., Boisteanu, A. (1977): *Cercetari asupra corelatie dintre fuzari-toxicoza si microstructura hipofizei la scroafe*. Lucarie Stiintifice, Zootehnie-Med. Veterinara 97-8.

Lončarević, A., Jovanović, M. J., Šamanc, H., Stankov, Zlata (1982): *Uticaj zearalenona (F-2) mikotoksina na proteinemiju, frakcije belančevina, aminokiselinski azot i koloidoosmotski pritisak belančevina krvnog seruma prasadi*. ANUBiH, 10, 87-100 LX.

Long, G. D., Diekman, M. A., Scheidt, A. B. (1988): *Effect of zearalenone on days 7 to 10 postmating on intrauterine environment and migration of embryos in sows*. J. Anim. Sci. 66 (2), 452-458.

Selye, H. (1950): *Physiology and pathology of exposure to stress*, Acta Inc. Med. Pub., 330, Montreal.

ANU BiH АНУ БиХ

UTICAJ ZEOLITA DODANOG U HRANU KONTAMINIRANU ZEARALENONOM I OHRATOKSINOM A NA REZULTATE PRAŠENJA KRMAČA

ISIDOR RAJIĆ, DRAGAN TRAJKOVIĆ

Veterinarski fakultet, Beograd
Pik "Tamiš", Vladimirovac

Apstrakt. Izvršeno je 8 ogleda ishrane na ukupno 1.086 suprasnih krmača. U prvom ogledu krmna smeša za kontrolnu nije bila kontaminirana mikotoksinima, a za oglednu grupu sadržavala je 0,080 mg/kg zearalenona i 0,950 mg/kg ohratoksina A. U II, III i IV ogleda krmna smeša za kontrolne i ogledne grupe sadržavala je zearalenona po 5,600 i ohratoksina A po 0,160 mg/kg. U V i VI ogledu krmna smeša za kontrolne i ogledne grupe krmača sadržavala je zearalenona po 3,000 i ohratoksina A po 0,160 mg/kg. U VII i VIII ogledu krmna smeša za kontrolne i ogledne grupe sadržavala je zaralenona po 8,000 i ohratoksina A po 0,160 mg/kg. U krmne smeše za ogledne grupe dodano je zealita 2% (2 kg/tona). Krmne smeše sa zealitom davane su u I ogledu 30, II 45, III 60, IV 75, V 90, VI 105, VII 120 i VIII 135 dana pre porođaja.

Dodatak zeolita u količini 0,2% u krmne smeše kontaminirane zearalenonom u količini 0,080, 3,000, 5,600 i 8,000 mg/kg i ohratoksina A u količini 0,950 i 0,160 mg/kg u trajanju od 30 i 45 dana pre prašenja nije uticao na smanjenje broja mrtvorođene i avitalne prasadi, a u trajanju od 60, 75, 90 i 105 dana, kao i 120 (za vreme graviditeta, bukarenja i oplodnje) i 135 dana (za vreme graviditeta, dojenja, bukarenja i oplodnje) visoko signifikantno (P,001) i signifikantno (P,05) je smanjio broj mrtvorođene i avitalne prasadi, što ukazuje na opravdanost dodavanja zeolita u kontaminirane krmne smeše zearalenonom i ohratoksinom A.

U V O D

U ovom radu ispitan je uticaj zeolita dodanog u hranu kontaminiranu zearalenonom i ohratoksinom A na rezultate prašenja krmače.

MATERIJAL I METOD RADA

Ispitivanje uticaja zeolita dodatog u krmne smeše kontaminirane različitim količinama zearalenona i ohratoksina A na rezultate prašenja krmača izvršeno je ogledima ishrane suprasnih krmača, hemijskim i mikotoksikološkim analizama hraniva i krmnih smeša i statističkom obradom i procenom značajnosti razlike broja ukupno rođene prasadi, broja mrtvorođene prasadi i broja avitalne prasadi.

Ogledi ishrane suprasnih krmača smešama koje su sadržavale zearalenon i ohratoksin A u različitim količinama, bez i sa dodatkom zeolita, organizovani su i izvršeni na jednoj svinjarskoj farmi u Vojvodini. Ogledi su izvršeni po sistemu kontrolnih grupa.

Izvršeno je 8 ogleda ishrane na ukupno 1.086 suprasnih krmača. U kontrolnim grupama bilo je 566 a u oglednim 520 krmača. Prvi ogled trajao je 30 dana pre prašenja, drugi 45, treći 60, četvrti 75, peti 90, šesti 105, sedmi 120 i osmi ogled 135 dana. Prema tome, krmače sedmog i osmog ogleda dobijale su kontaminiranu hranu i u fazi pripusta (sedmi ogled) a krmače iz osmog ogleda u prethodnoj fazi laktacije (tabela 1).

Tabela 1. BROJ SUPRASNIH KRMAČA U OGLEDIMA I TRAJANJE OGLEDA

Ogled	Grupa krmača		Ukupno krmača	Trajanje ogleda, dana
	Kontrolna	Ogledna		
I	80	50	130	30
II	65	74	139	45
III	58	67	125	60
IV	74	72	146	75
V	69	70	139	90
VI	71	62	133	105
VII	80	67	147	120
VIII	69	58	127	135
Ukupno:	566	520	1.086	

Suprasne krmače kontrolnih i oglednih grupa u svih osam ogleda hranjene su krmnom smešom sledećem sastava (u %): kukuruz 30, ječam 47, pšenično stočno brašno 5, suncokretova sačma 7, sojin tostirani griz 3, brašno dehidrovane lucerke 5, dikalcijum fosfat 1 i vitaminsko-mineralni dodatak 2.

U krmne smeše za ogledne grupe u svih osam ogleda dodano je 0,2% (2 kg/tona) mikroniziranog belog zeolita.

U prvom ogledu krmna smeša za kontrolnu grupu nije sadržavala zearalenon. U krmnoj smeši za 0 grupu krmača zearalenona je bilo 0,080 i ohratoksina A 0,950 mg/kg.

Tabela 2. KOLIČINA ZEARALENONA I OHRATOKSINA A U KRMNIM SMEŠAMA ZA SUPRASNE KRMAČE KONTROLNIH I OGLEDNIH GRUPA

Ogled	Zearalenon, mg/kg		Ohratoksin A, mg/kg	
	Grupa krmača		Grupa krmača	
	Kontrolna	Ogledna	Kontrolna	Ogledna
I	0,000	0,080	0,000	0,950
II,III,IV	5,600	5,600	0,160	0,160
V, VI	3,000	3,000	0,160	0,160
VII,VIII	8,000	8,000	0,160	0,160

U drugom, trećem i četvrtom ogledu količina zearalenona u krmnoj smeši za kontrolnu i oglednu grupu bila je po 5,600 mg/kg a ohratoksina A po 0,160 mg/kg.

U petom i šestom ogledu količina zearalenona u krmnoj smeši za kontrolnu i oglednu grupu bila je po 3,000 mg/kg a ohratoksina A po 0,160 mg/kg.

U sedmom i osmom ogledu količina zearalenona u krmnoj smeši za kontrolnu i oglednu grupu krmača bila je po 8,000 mg/kg a ohratoksina A po 0,160 mg/kg (Tabela 2).

REZULTATI RADA I DISKUSIJA

Prvi ogled

Dodatak 0,2% zeolita u krmnu smešu za suprasne krmače koja je sadržavala zearalenona 0,080 mg/kg i ohratoksina A 0,950 mg/kg, davanu 30 dana pre porođaja (ogledna grupa - 50 legala), nije uticao na broj mrtvorođene i avitalne prasadi u poređenju sa ishranom suprasnih krmača krmnom smešom bez zearalenona, ohratoksina A i zeolita (kontrolna grupa - 80 legala). Ovakav rezultat tumačimo tako što smatramo da je davanje zeolita u trajanju od 30 dana kratko vrijeme da bi se ispoljilo pozitivno dejstvo na rezultate prašenja.

Drugi ogled

Dodatak 0,2% zeolita u krmnu smešu za suprasne krmače koja je sadržavala zearalenona 5,600 mg/kg i ohratoksina A 0,160 mg/kg, davanu 45 dana pre porođaja (ogledna grupa - 74 legla), nije uticao na broj mrtvorođene i avitalne prasadi u poređenju sa ishranom suprasnih krmača istom krmnom smešom bez dodatka zeolita (kontrolna grupa - 65 legala). Utvrđene razlike rezultata prašenja krmača koje su dobijale hranu bez i sa zeolitom nisu bile statistički značajne.

Treći ogled

Dodatak 0,2% zeolita u krmnu smešu za suprasne krmače koja je sadržavala zearalenona 5,600 mg/kg i ohratoksina A 0,160 mg/kg, davanu 60 dana pre porođaja (ogledna grupa - 67 legala), signifikantno je smanjio broj mrtvorođene i avitalne

ANU BiH АНУ БиХ

prasadi (P<0,05) u poređenju sa ishranom suprasnih krmača istom krmnom smešom bez dodatka zeolita (kontrolna grupa - 58 legala). Pozitivno dejstvo zeolita ispoljilo se tek kada je davan hranom u trajanju više od polovine suprasnosti.

Četvrti ogled

Dodatak 0,2% zeolita u krmnu smešu za suprasne krmače koja je sadržavala zearalenona 5,600 mg/kg i ohratoksina A 0,160 mg/kg, davanu 75 dana pre porođaja (ogledna grupa - 72 legla), visoko signifikantno je smanjio broj mrtvorođene i avitalne prasadi (P<0,001) u poređenju sa ishranom suprasnih krmača istom krmnom smešom bez dodatka zeolita (kontrolna grupa - 74 legla). Rezultati ovog ogleda potvrđuju nalaze dobijene u trećem ogledu.

Peti ogled

Dodatak 0,2% zeolita u krmnu smešu za suprasne krmače koja je sadržavala zearalenona 3,000 mg/kg i ohratoksina A 0,160 mg/kg, davanu 90 dana pre porođaja (ogledna grupa - 70 legala), visoko signifikantno je smanjio broj mrtvorođene prasadi (P<0,001) nesignifikantno broj avitalne prasadi, a signifikantno povećao broj živorođene prasadi (P<0,05) u poređenju sa ishranom suprasnih krmača istom krmnom smešom bez dodatka zeolita (kontrolna grupa - 69 legala).

Šesti ogled

Dodatak 0,2% zeolita u krmnu smešu za suprasne krmače koja je sadržavala zearalenona 3,000 mg/kg i ohratoksina A 0,160 mg/kg, davanu 105 dana pre prašenja (ogledna grupa - 62 legla), visoko signifikantno je smanjio broj mrtvorođene i avitalne prasadi (P<0,001) u poređenju sa ishranom suprasnih krmača istom krmnom smešom bez dodatka zeolita (kontrolna grupa - 71 leglo). Dodatak zeolita u kontaminiranu hranu u trajanju od 90 dana ispoljio je pozitivno antitoksično dejstvo.

Sedmi ogled

Dodatak 0,2% zeolita u krmnu smešu za suprasne krmače koja je sadržavala zearalenona 8,000 mg/kg a ohratoksina A 0,160 mg/kg, davanu 120 dana, odnosno za vreme trajanja graviditeta i u fazi bukarenja ili oplodnje u trajanju 5-6 dana (ogledna grupa - 67 legala), visoko signifikantno je smanjio broj mrtvorođene i avitalne prasadi (P<0,001) u poređenju sa ishranom suprasnih krmača istom krmnom smešom bez dodatka zeolita (kontrolna grupa - 80 legala).

Osmi ogled

Dodatak 0,2% zeolita u krmnu smešu za suprasne krmače koja je sadržavala zearalenona 8,000 mg/kg a ohratoksina A 0,160 mg/kg, davanu 135 dana pre porođaja, odnosno za vreme trajanja graviditeta, u fazi bukarenja do oplodnje u trajanju 7-10-20 dana (ogledna grupa - 58 legala), visoko signifikantno je povećao broj živorođene prasadi (P<0,001) i visoko signifikantno smanjio broj mrtvorođene i avitalne prasadi (P<0,001) u odnosu na ishranu suprasnih krmača istom krmnom smešom bez dodatka zeolita (kontrolna grupa - 69 legala). Prema tome, najbolji rezultati dobijeni su dodatkom zeolita za vreme suprasnosti i dojenja prasadi.

Dobijene rezultate nismo mogli da poredimo sa rezultatima drugih autora, jer u nama pristupačnoj literaturi nismo naišli na podatke o upotrebi belog mikroniziranog zeolita ili klinoptilolita kao antimonotoksičkog aditiva krmnim smešama za ishranu suprasnih krmača.

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata u ovom radu mogu se donijeti sledeća zaključna razmatranja.

Potpune krmne smeše za ishranu suprasnih i krmača dojara često su kontaminirane sa dva mikotoksina, odnosno zearalenonom i ohratoksinom A. Količina zearalenona je često iznad 2, a ohratoksina A ispod 1 mg/kg hrane.

Dodatak zeolita u količini 0,2% (2 kg/tona) u krmne smeše kontaminirane zearalenonom u količini 0,080, 3,000, 5,600 i 8,000 mg/kg i ohratoksinom A u količini 0,950 i 0,160 mg/kg u trajanju od 30 i 45 dana pre prošenja nije uticao na smanjenje broja mrtvorođene i avitalne prasadi, a u trajanju od 60, 75, 90 i 105 dana, kao i 120 (za vrijeme graviditeta, bukarenja i oplodnje) i 135 dana (za vrijeme graviditeta, dojenja, bukarenja i oplodnje) visoko signifikantno ($P<0,001$) ili signifikantno ($P<0,05$) je smanjio broj mrtvorođene i avitalne prasadi.

Rezultati ukazuju na stručnu opravdanost dodavanja 0,2% zeolita u krmne smeše koje sadrže zearalenon i ohratoksin A, a služe za ishranu suprasnih i krmača dojara.

EFFECT OF ZEOLYTE ADDED TO FEED CONTAMINATED WITH OCHRATOXIN A AND ZEARALENONE ON THE RESULTS OF SOWS FARROWING

Summary

There were 8 experiments with feeding the gravid sows (1.086). In the first experiment feed mixture for control group did not contain any mycotoxin and for experimental group there were 0,080 mg/kg of zearalenone and 0,950 mg/kg of ochratoxin A in the mixture. In the experiments II, III and IV feed mixture for the control and experimental groups contained zearalenone 5.600 and ochratoxin A 0,160 mg/kg. In V and VI experiments feed mixture for control and experimental sows contained zearalenone 3.000 and ochratoxin A 0,160 mg/kg. In VII and VIII experiments feed mixture for the control and experimental groups contained zearalenone 8.000 and ochratoxin A 0,160 mg/kg. In the feed mixtures for experimental groups it was added zeolyte 2% (2 kg/ton). Feed mixtures with zeolyte were offered in experiment I through 30, in experiment II through 45, in experiment III through 60, in experiment IV through 75, in experiment V through 90, in experiment VI through 95, in experiment VII through 120 and in experiment VIII through 130 days before parturition.

Addition of zeolyte in quantity of 0,2% of feed mixture contaminated with zearalenone with 0,080, 3.000, 5.600 and 8,00 mg/kg and ochratoxin A with 0,950 and 0,160 mg/kg during 30 and 45 days before parturition did not influence lessening of the number of stillborn and

non vital pigets, and in application through 60,75,90 and 105 days, as well during 120 days (during the pregnancy, oestrous cycle and fertilization) and 135 days (during the pregnancy, sucking, oestrous cycle and fertilization) high significantly (P lesser than 0,001) and significantly (P lesser than 0,05) diminished the number of stillborn and avital piglets, what justifies addition of zeolyte to contaminated feed mixture with zearalenone and ochratoxin A.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

FUNGICIDNI I DETOKSIKACIONI EFEKAT UBEA 70 NA ZEARALENON I PLIJESNI U KUKURUZU

LADISLAV OŽEGOVIĆ, STJEPAN FELDHOFER, DRAGAN HLUBNA

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, Sarajevo
INA - Petrokemija, Kutina
Veterinarski fakultet, Sarajevo

Apstrakt. Kukuruz roda 1985. kontaminiran plijesnima i zearalenonom (5,6 ppm) tretiran je u anaerobnim uslovima preparatom UBEA 70. Mjesec dana od tretiranja u kukuruzu se nije mogao dokazati zearalenon, a broj spora i kontaminacija endosperma kukuruza su se drastično smanjili.

Poznati su uslovi nastanka mikotoksina na žitaricama. Vlažnost supstrata predstavlja limitirajući faktor rasta plijesni, a sastav samog supstrata i temperatura na kojoj plijesni rastu omogućavaju manifestiranje toksigenosti kontaminirajućih plijesni. Rano je razvijena strategija sprečavanja pljesnivosti i stvaranja mikotoksina smanjivanjem vlažnosti supstrata, regulacijom temperature uskladištenja i biranjem onih speciesa žitarica (ili drugih plodova) koje su rezistentne na kontaminaciju plijesnima. Međutim, uprkos svih poznatih i relevantnih faktora, realnost postojanja mikotoksina i šteta koje nanose svakodnevno nas suočavaju sa pljesnivom hranom i mikotoksinima u njoj. Odatle razni pravci istraživanja o mogućnostima sprečavanja efekata mikotoksina, pri čemu se upotrebljavaju fizikalni, kemijski i biološki agensi i postupci (Müller, 1983).

UBEA 70 je preparat kojeg proizvođač preporuča za konzerviranje vlažnih krmiva: sadrži ureu, sumpor i BENAL. Ovakav sastav preparata, s ureom, iz koje se spontano djelovanjem ureaze formira amonijak, i BENALOM, koji je posebno aktivirana bentonitna glina s veoma aktivnim aluminosilikatom vrste montmorilonita, upućivao je na mogućnost detoksikacije mikotoksina, uz fungicidnu aktivnost i ostale prednosti sastavnih dijelova preparata (Feldhofer i sar. 1987).

U literaturi je poznato djelovanje amonijaka i aluminosilikata (Müller, 1984; Wmith 1980; Colvini sar. 1989; Rajić i sar. 1990; Harvey i sar. 1989) na detoksikaciju mikotoksina u supstratu prije aplikacije životinjama hrane

kontaminirane mikotoksinima, ili zajedno s apliciranim supstratom. U literaturi postoji izvještaj o komparativnoj efikasnosti raznih vrsta silikata u detoksikaciji aflatoksi na in vitro (P h y l l i p s i sar. 1990).

Zearalenone je, prema istraživanjima B e n n e t t a i sar. (1980) veoma rezistentan na niz postupaka koji u njihovim istraživanjima nisu mogli signifikantno smanjiti koncentraciju zearalenona u kukuruzu. Kako je u našoj zemlji kontaminacija kukuruza zearalenonom česta pojava (1, 3, 10, 12, 14, 15, 20), smatrali smo da je oportuno istražiti djelovanje ovog preparata na zrnu kukuruza koji je bio kontaminiran plijesnima i zearalenonom.

MATERIJAL I METODE RADA

Ispitivani kukuruz bio je roda iz 1985. godine i sadržavao je više od 30% vlažnosti. Metodom istraživanja infestacije endosperma utvrđena je 100% infestacija. Izolirane su slijedeće plijesni: *Asp. ustus, Asp. ochraceus, Asp. flavus, Asp. candidus, Penicillium sp.,* kvasnice (nedeterminirane). Broj spora plijesni iznosio je 300.000/g. Količina zearalenona iznosila je 5,6 ppm (metodom po Baleru i sar.).

Kukuruz je izmiješan sa 7% UBEA 70, postupkom koji proizvođač (INA - Petrokemija, Kutina) preporuča za sprečavanje kvarenja i za konzerviranje vlažnog zrnja kukuruza u aerobnim uslovima. Uzorci obrađena kukurza su zatvoreni u plastične posude (od 3 kg). Sva količina ispitivanog kukuruza bila je pohranjena na sobnoj temperaturi (20°C). Period istraživanja trajao je 6 mjeseci, od novembra 1985. do maja 1986.

Pretrage obrađenih tretiranih uzoraka vršene su jednom mjesečno kao i pretrage kontrolnog uzorka na ukupan broj spora u gramu uzorka, postotak infestacije endosperma zrnja i na sadržaj zearalenona.

REZULTATI

Makroskopski izgled netretiranih zrna već na prvi pogled odaje zrna u kvarenju: zrnje je pokriveno bijelim nanosom plijesni i kvasnica, a kako je vrijeme opažanja protjecalo tako je bio uočen sve veći broj slijepljenih zrna, najčešće u manje i veće grudvice. Zrna tretirana sa UBEA 70 su odjelita, na svojoj suhoj površini imaju smeđi nanos karakteristična mirisa, bez tendencije stvaranja gruda. Tretirani kukuruz ostaje takav kroz razdoblje istraživanja (sl. 1-4).

Infestacija zrna tretiranih sa UBEA 70 mijenja se (prema kontrolnim i onim na početku pokusa) i već nakon mjesec dana iznosi 0%. Tako ostaju kroz 6 mjeseci promatranja. Kod netretiranih zrnja infestacija kroz cijeli period istraživanja ostaje 100%, a izolirane su iste plijesni kao i na početku istraživanja.

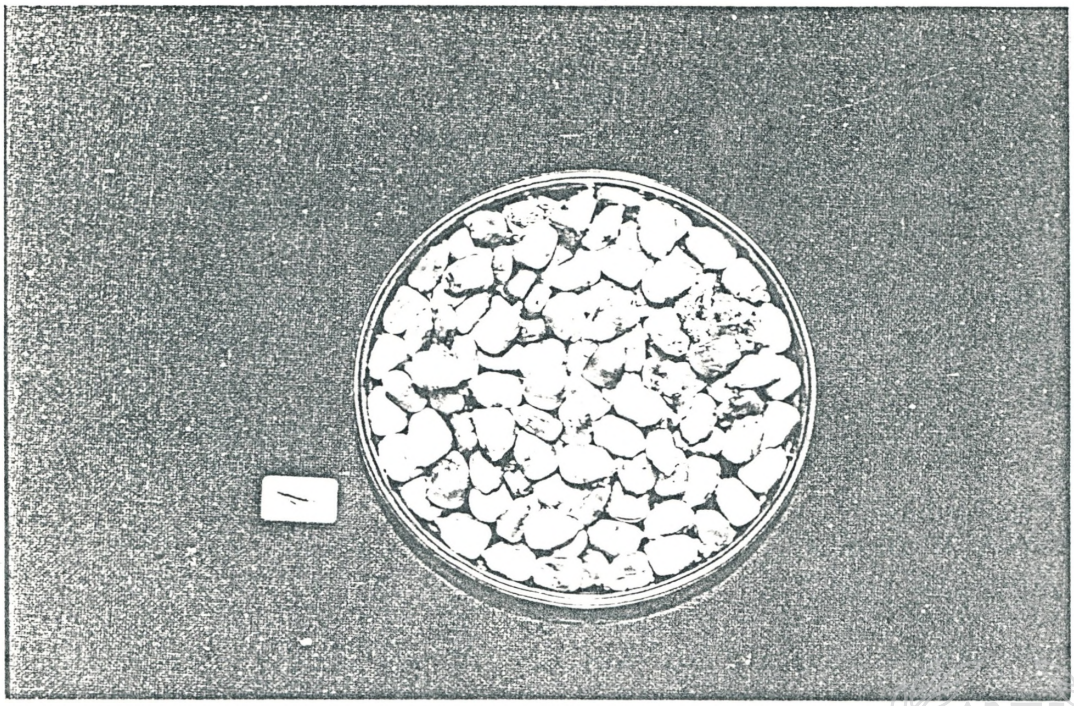
Broj plijesni u gramu uzorka u početku tretmana ukazivao je na veliku zagađenost. Tokom vremena opažanja kod netretiranih zrna broj plijesni iznosio je više od 1,000.000 spora gram uzorka. U tretiranih zrna nakon 5 mjeseci od tretmana uzorak je još uvijek bio sterilan. Tek nakon 6 mjeseci u jednom uzorku kukuruza tretiranog sa UBEA 70 nalazilo se 170.000 spora/g, a u drugom 50.000 spora G (Tabela 1 i grafikon 1).

Tabela 1 – Rezultati tretiranja pljesnivog kukuruza sa UBEA 70
Table 1 – The results of treatment the contaminated corn with UBEA 70

	NETRETIRANI KUKURUZ *non-treated corn*	TRETIRANI KUKURUZ *treated corn*
Prije pokusa *before treatment*		
infestacija zrna	100%	
broj plijesni	300.000/g	
zearalenone	5,6 ppm	
nakon 5 mjeseci 5 month after		
infestacija zrna	100%	0
broj plijesni	1,030.000/g	0
zearalenone	5,6 ppm	0
nakon 8 mjeseci 8 month after		
infestacija zrna	100%	100%
broj spora/g	1,530.000/g	170.000
zearalenone	5,6 ppm	0

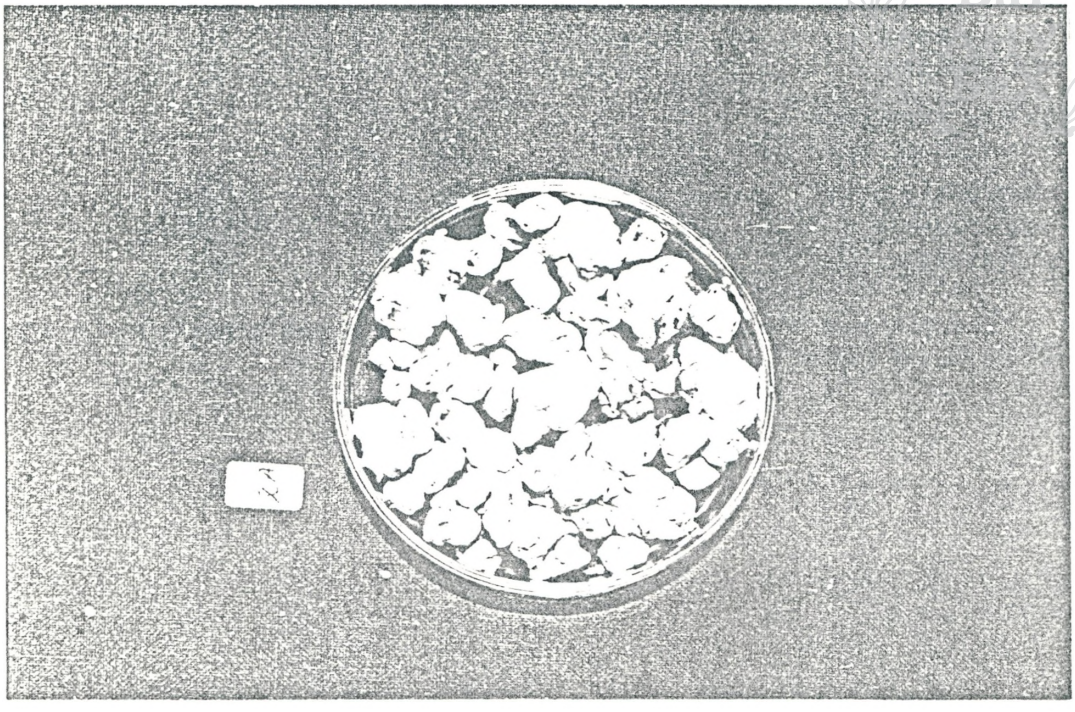
Zearalenone se nije mogao dokazati u tretiranom kukuruzu nakon 30 dana od tretmana.

ANU BiH АНУ БиХ

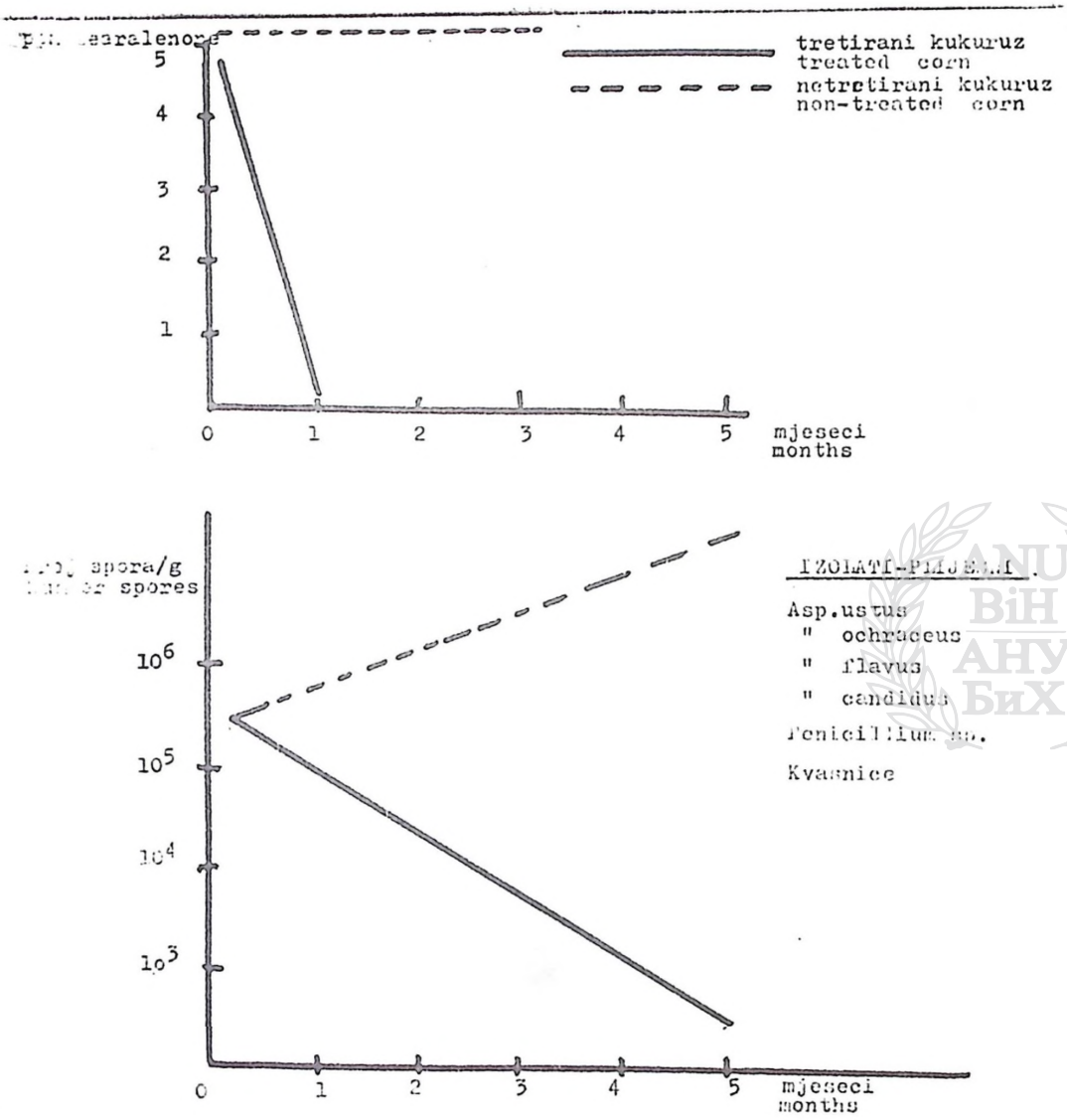


Slika 1 – Kukuruz prije tretmana, novembar 1985.

Slika 2 – Kukuruz tretiran sa UBEA 70, maj 1986.



ANU BiH



Grafikon 1. Djelovanje UBEA 70 na zearalenon i plijesni u vlažnom kukuruzu
Graph 1. Effect of UBEA 70 on zearalenone and the molds in wet corn

DISKUSIJA

Kako je već spomenuto, djelovanje UBEA 70 se može uočiti mikroskopski po smeđoj boji na zrnju već 15-20 dana nakon što je kukuruz tretiran. Brojenjem se opaža manji broj plijesni, smanjivanje broja plijesni i kontaminacije endosperma do sterilnosti (grafikon 1). Nakon otprilike mjesec dana, ustaljeno je djelovanje UBEA 70. Zanimljivi su rezultati istraživanja infestacije endosperma tretiranog kukuruza: nalaz je negativan (endosperm sterilan) od 30 dana do 5 mjeseci, a nakon tog perioda pokazuje se ponovno rast istih vrsta plijesni koje su postojale na zrnju prije tretiranja.

Nameće se pitanje porijekla tih plijesni: da li je djelovanje UBEA 70 bilo privremeno (5 mjeseci) ili, kako izgleda, samo fungistatičko, da bi se nakon tog perioda vratila sposobnost germinacije - infestacije endosperma od preostalih (germinativnih) spora, ili je došlo do novog zagađivanja iz zraka kod manipulacije uzorkom. Vjerojatno je da su pojedine spore kasnije, 5 mjeseci od aplikacije UBEA 70, dospjele na kukuruz i u uslovima visoke vlažnosti počele germinirati. Postoji i mogućnost neujednačenog uzorkovanja kukuruza koji je bio na nekim mjestima bolje obrađen (u kontaktu) sa UBEA 70. U svakom slučaju, makroskopski izgled zrnja i brojčani nalaz plijesni nedvojbeno ukazuju da je djelovanje UBEA 70 bilo uspješno, jer se drastično smanjio broj spora u uzorku kao i infestacija endosperma kroz opažani period. Tako se omogućava korisna upotreba hrane koja bi kao štetna (prema PKA) bila odbačena.

Uspješna detoksikacije zearalenona u kukuruzu s UBEA 70 otvara teoretsko pitanje djelovanja sastavnih dijelova UBEA 70, BENALA - montmorilonita u prvom redu, i same uree u procesu detoksikacije zearalenona. Iskustva Bennetta i sar. ukazuju da amonijakalizacija ne može znatno smanjiti količinu zearalenona u kukuruzu, kao ni druge kemikalije, pa ni temperatura od 150°C. Jedino je formaldehid u njihovom pokusu mogao znatnije smanjiti količinu zearalenona. Zato pretpostavljamo da je u našim pokusima zearalenone u kukuruzu bio detoksiciran djelovanjem montmorilonita iz BENALA, vjerojatno i sinergizmu s amonijakom oslobođenim iz uree. Iskustva s upotrebom aluminosilikata u detoksikaciji aflatoksina govore da je koncentracija aluminosilikata od 0,5% bila uspješna u sprečavanju šteta, dok je kod detoksikacije zearalenona ta koncentracija iznosila 5% (Smith 1980; Colvin i sar. 1989; Harvey i sar. 1989). Djelovanje Fixatoxa u pokusima Rajića i Milutinovića (1990) iznosio je 0,05-0,1% aluminosilikata koji se nalaze u preparatu.

ZAKLJUČAK

UBEA 70 je na vlažnom kukuruzu u zatvorenoj posudi uspješno smanjila i eliminirala plijesni (broj u gramu uzorka i postotak infestacije endosperma) kukuruza i u isto vrijeme detoksicirala prisutni zearalenone. Vrijeme od mjesec dana kontakta UBEA 70 sa kukuruzom bilo je dovoljno za eliminiranje plijesni i zeara-

lenona, a kukuruz se sačuvao od kvarenja. Nakon perioda od 5 mjeseci, kod kukuruza su se ponovno javile plijesn, pa bi takav kukuruz trebalo potrošiti u vremenu od 1 mjesec dana do 5 mjeseci nakon tretmana. Kod prisutnosti plijesni i zearalenona, obrada i detoksikacija se može uspješno izvesti u zatvorenim plastičnim posudama - vrećama.

FUNGICIDAL AND DETOXIFICATIVE EFFECTS OF UBEA 70 ON THE MOLDS AND ZEARALENONE IN CONTAMINATED CORN

Summary

Corn from the 1985 crop, contaminated with molds and zearalenone (5,6 ppm) was treated with UBEA 70, containing urea, sulphur and activated clay with aluminosilicates. Treatment was in closed plastic boxes. One month after the treatment no trace of zearalenone in the corn could be proved, and the number of the spores and percentage of endosperm infestations drastically dropped

LITERATURA

Balzer, I., Bogdanić, Č., Mužić, S. (1976): *Natural contamination of corn with mycotoxins in Yugoslavia*, III IUPAC, Paris, Abstr.2

Bennett, G. A., Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W. (1980): *Destruction of zearalenone in contaminated corn*. JAOCS, 57, 8, 245-247.

Brodnik, Tatjana, Klemenc, N., Vospernik, P., Žust, J. (1977): *Kontaminacija kukuruza gljivama i mikotoksinima u Sloveniji*, Krmiva, 19, 2-29.

Colvin, B. M., Sangster, L. T., Haydon, K. D., Beaver, R. W., Wilson, D. M. (1989): *Effect of a high affinity alumino-silicate sorbent on prevention of aflatoxicosis in growing pigs*. Vet. Hum. Toxicol., 31(1) 46-48.

Feldhofer, S., Herman, K., Matić, A., Gašpar, Marija, Mundžić, K. (1987): *Konzerviranje svježeg jabučnog koma sa "Ubeom 70"*. Veterinaria, 36, 2, 187-193.

Feldhofer, S., Marić, V., Horvat, P., Gašpar, Marija (1987): *Neke fizikalno-hemijske i mikrobiološke promjene na vlažnom zrnju kukuruza konzerviranom sa "Ubeom 70"*. Veterinaria, 36, 3-4, 321-334.

Feldhofer, S., Tkalčec, Emilija, Mitin, V., Svetić, M., Kraljević, P., Gašpar, Marija (1988): *Fizikalno-kemijska svojstva Bentonita i "Benala" značajna za hranidbu stoke, s posebnim osvrtom na resorpciju kalcija i fosfora kod pilića*. Veterinaria, 37, 1, 51-63.

Harvey, R. B., Kubena, L. F., Phillips, T. D., Huff W. E., Corrier, D. E. (1989): *Prevention of aflatoxicosis by addition of hydrate sodium calcium aluminosilicate to diets of growing barrows*. Am. J. Vet. Res., 50 (3) 416-420.

Lončarević, A., Penčić, Viktorija, Smiljaković, Hristina, Gotovčević, S. (1972): *Mikotoksikoza svinja prouzrokovana gljivicama roda Fusarium*, Dokumenti J. P. Š., 9-10, 1-7.

Müller, H. M. (1983): *A survey of methods of decontaminating mycotoxins. I. Physical methods.* Animal Res. and Development, Vol. 19, 70-96.

Müller, H. M. (1984): *A survey of methods of decontaminating mycotoxins. II. Chemical methods and reaction with components of feedstuffs.* Anim. Res. and Develloпment, Vol. 19, 7-38.

Phyllips, T. D., Clement, B. A., Kubena, L. F., Harvey, R. B. (1990): *Use of dietary chemisorbent to prevent aflatoxicosis in farm animals. A perspective on aflatoxin in field crops and animal food products in the United States*, A Symposium, USDA, 106-114, ARS-83.

Prevot, A. (1986): *Commercial detoxification of aflatoxin-contaminated peanut meal.* U: Mycotoxins and Phycotoxins (Ed. Steyn P. S., Vleggaar R.), 341-351.

Rajić, I., Matić, G. (1986): *Uticaj zearalenona na reproduktivne organe svinja.* ANUBiH, LXXX, 12, 29-42.

Rajić, I., Milutinović, Desanka (1990): *Uticaj Fixatoxa dodatog u hranu na prirast i konverziju hrane pilića u tovu.* Peradarstvo, XXV, 7-8, 155-161.

Ramljak, Danica, Matešić, Dubravka, Uremović, Marija (1986): *Trovanje svinja zearalenolom u Jugoslaviji.* ANUBiH, LXXX, 12, 195.

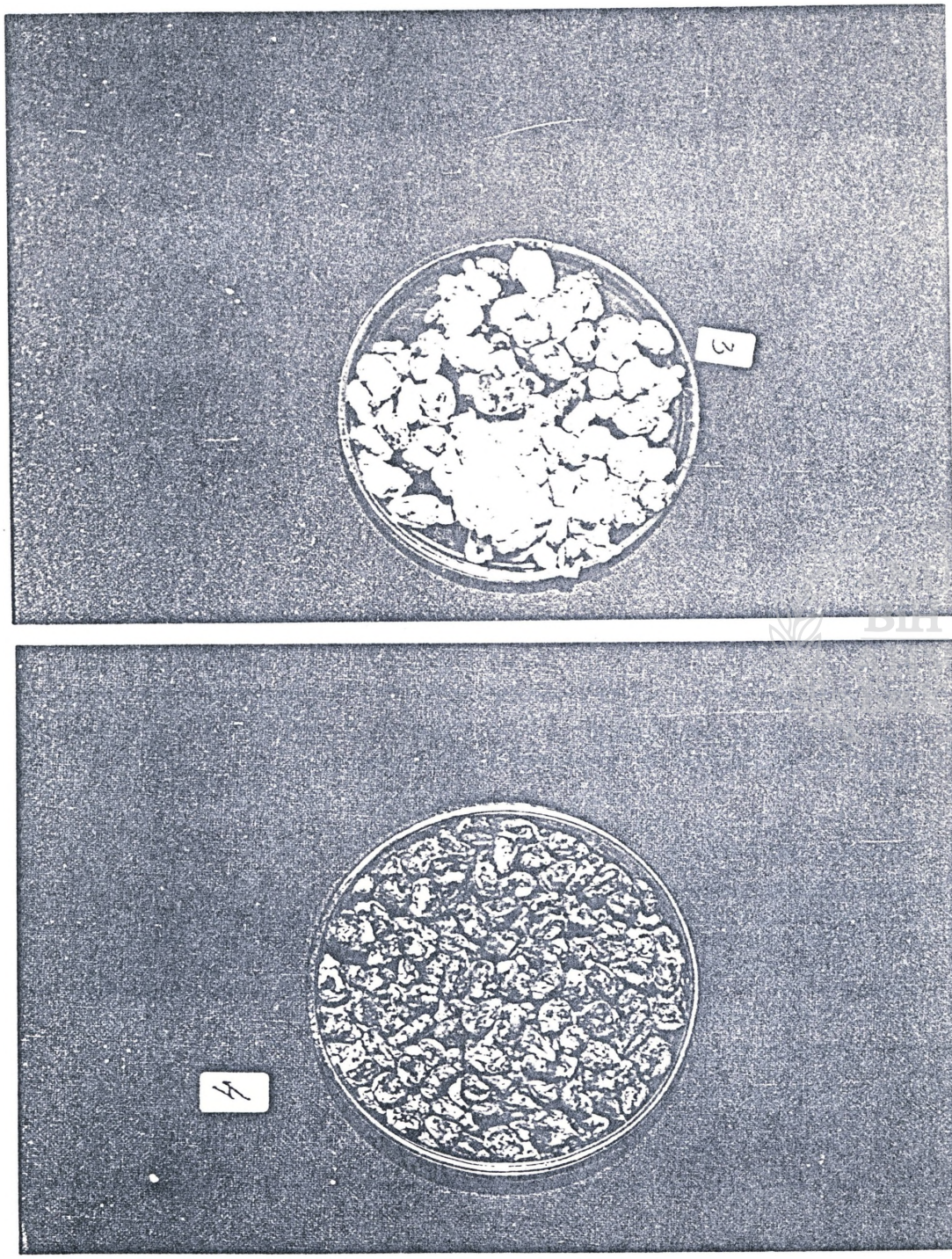
Smith, T. K. (1980): *Influence of dietary fiber, protein and zeolite on zearalenone toxicosis in rats and swine.* J. Anim. Sci. 50(2), 278-285.

Smith, T. K. (1990): *The use of trichothecebe-contaminated grains in feed.* Cand. J. Physiol. 68, 7, 1000-1003.

Srebočan, V., Pompe-Gotal, Jelena, Srebočan, E., Lopina, Mirjam, Feldhofer, S. (1988): *Reduction of cadmium and chromium deposition in the chicken's tissues by montmillonite in the diet.* Vet. Ahiv, 58 (4) 189-191.

Stamatović, S., Ljeşević, S., Đuričković, S. (1963): *O jednoj fungalnoj alimentarnoj intoksikaciji svinja (vulvovaginitis suum).* Vet. Glasnik, 17, 6, 507-510.

Slika 3 i 4 – Netretiran kukuruz, maj 1986.



CIP—Katalogizacija u publikaciji
Biblioteka Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine,
Sarajevo

UDC 615.918-582.282(082.2)
UDC 619:636/639(497.1)

SIMPOZIJUM o mikotoksinima (4. 1991: Sarajevo)
4. (četvrti) Simpozijum o mikotoksinima (Sarajevo, 14. juna 1991) / Redakcioni odbor Seid Huković, Ladislav Ožegović, Džemal Rezaković : Urednik Ladislav Ožegović. — — Sarajevo : Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, 1992. — 130 str. : tabele ; 24 cm. — (Posebna izdanja/Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine : knj. 103 ; Odjeljenje medicinskih nauka ; knj. 17)

YU ISBN 86-7123-041-4

PK : Toksilogija — Nauka o otrovima
Sistemska botanika — gljive
Veterina — domaće životinje — Jugoslavija

ANU BiH АНУ БиХ