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)

Redakcioni odbor
Seid Huković, Ladislav Ožegović, Džemal Rezaković

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

SARAJEVO 1996

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