

TOKSIČNOST AFLATOKSINA B₁ PREMA SOJEVIMA STREPTOCOCCUS LACTIS*

Dr Ana BANINA, prof. dr Marija ŠUTIĆ, Poljoprivredni fakultet,
Zemun-Beograd

Sažetak

Aflatoksin B₁ deluje toksično na sojeve *Streptococcus lactis* 507 i 509 inkubirane u mleku. Koncentracije do 10 µg/ml AFB₁ ne utječu značajnije na smanjenje broja ćelija. Pri 100 i 150 µg/ml toksina broj ćelija se smanjuje i to kako sa povećanjem koncentracije tako i sa dužinom izlaganja ćelija aflatoksinu. Potpuna inhibicija rasta ćelija *S. lactis* nije postignuta ni sa 150 µg/ml AFB₁ i u tim kulturama je i nakon 20 sati inkubacije mleka na optimalnoj temperaturi, još uvek bilo preživelih ćelija. Kao posledica smanjenja broja ćelija, pri svim koncentracijama većim od 10 µg/ml AFB₁, stvara se znatno manje mlečne kiseline, a vreme potrebno za formiranje grušu produžava se za 2 do 9 sati.

Uvod

Bakterije mlečne kiseline roda *Streptococcus*, predstavljaju značajnu grupu mikroorganizama koji imaju primenu pre svega u mlekarскоj industriji i to u proizvodnji raznih vrsta sireva, maslaca, jogurta i ostalih mlečnih prerađevina. U prisustvu različitih agenasa, koji se mogu naći u mleku, dolazi do morfoloških i fizioloških promena ove grupe bakterija (5, 7). U prethodnim ispitivanjima je utvrđeno da jedan od agenasa koji se često nalazi u mleku, aflatoksin B₁ (AFB₁), može višestruko delovati na različite sojeve bakterija mlečne kiseline (8, 9, 10). Sve ove promene bakterija mlečne kiseline pod utjecajem aflatoksina su uglavnom nepovoljne za industrijsku preradu mleka u različite proizvode.

U ovom radu je izvršeno ispitivanje toksičnosti različitih koncentracija aflatoksina B₁ prema sojevima *Streptococcus lactis*.

Materijal i metodika

Ispitivanja su obavljena na dva soja vrste *S. lactis* 507 i 509, koja su dobijena iz kolekcije Nacionalnog Instituta za mlekarstvo Reading, Velika Britanija, i koriste se u proizvodnji sireva, maslaca i pavlake. Čiste kulture streptokoka održavane su u 10% rekonstituisanom obranom mleku.

30 ml obranog mleka je zasejano sa 1% sveže kulture. U Erlenmajerovu tikvicu je zatim dodat (prethodno određen) aflatoksin B₁, rastvoren u sterilnom dimetilsulfoksidu (DMSO), u sledećim koncentracijama: 0, 2.5, 5.0, 10.0, 100 i 150 µg/ml. U trenutku zasejavanja, pre dodavanja toksina, određen je ukupan broj bakterija i početna kiselost mleka. Svakih pet sati inkubacije na optimalnoj temperaturi, vršeno je određivanje ukupnog broja i merena kiselost mleka pH metrom. Ispitivanja su vršena u tri ponavljanja.

* Referat održan na XXIII seminaru za mljekarsku industriju, Zagreb 1985.

Rezultati ispitivanja

Ispitivanje toksičnog efekta AFB₁ na streptokoke inkubirane u mleku, pokazuju da broj vijabilnih ćelija opada povećanjem koncentracije toksina. Kod obe ispitivane kulture inhibični efekat toksina je uočen sa 10 µg/ml AFB₁, dok su niže koncentracije (2.5 i 5.0 µg/ml) pokazivale slabiju toksičnost. Pri koncentraciji od 10 µg/ml AFB₁ broj ćelija se smanjio za jedan red veličine od 1.2×10^9 do 2.8×10^8 u soju *S. lactis* 507 odnosno 1.4×10^9 do 5.3×10^8 u soju *S. lactis* 509 (Tablica 1 i 2).

Tablica 1. Utjecaj AFB₁ i vremena inkubacije na broj ćelija *S. lactis* 507 u mleku
Table 1. Influence of the AFB₁ and incubation time on cell number of the *S. lactis* 507 in milk.

Aflatoksin B ₁ µg/ml AFB ₁	Ukupan broj ćelija Total cell number				
	0h	5h	10h	15h	20h
0	1.0×10^7	3.3×10^8	8.0×10^8	1.0×10^9	1.2×10^9
2.5		2.9×10^8	6.0×10^8	8.0×10^8	8.8×10^8
5.0		2.4×10^8	4.0×10^8	4.9×10^8	4.4×10^8
10.0		1.1×10^8	1.6×10^8	2.0×10^8	2.8×10^8

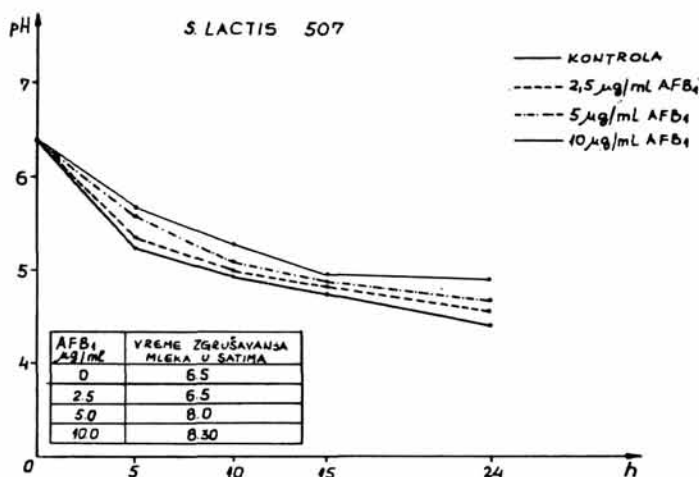
Tablica 2. Utjecaj AFB₁ i vremena inkubacije na broj ćelija *S. lactis* 509 u mleku
Table 2. Influence of the AFB₁ and incubation time on cell number of the *S. lactis* 509 in milk.

Aflatoksin B ₁ µg/ml AFB ₁	Ukupan broj ćelija Total cell number				
	0h	5h	10h	15h	20h
0	1.2×10^8	5.6×10^8	9.1×10^8	1.1×10^9	1.4×10^9
2.5		4.4×10^8	6.8×10^8	8.0×10^8	8.8×10^8
5.0		4.1×10^8	5.8×10^8	7.6×10^8	8.2×10^8
10.0		3.0×10^8	3.8×10^8	4.6×10^8	5.3×10^8

Smanjenje broja ćelija pod utjecajem AFB₁ utječe na sporije stvaranje mlečne kiseline. Količina stvorene kiseline u toku 5 sati inkubacije na 30 °C (pH 5.3 i pH 5.4) kao i vreme potrebno za formiranje gruš (6.5 sati) je isto u kontrolnom uzorku kulture *S. lactis* 507 i u prisustvu 2.5 µg/ml AFB₁. Povećanje koncentracije AFB₁ na 5.0 i 10.0 µg/ml toksina utječe na sporije stvaranje mlečne kiseline, što produžava vreme zgrušavanja mleka. Pri ovim koncentracijama potrebno je 8 sati odnosno 8 sati i 30 minuta da se formira gruž. Kiselost mleka u kontrolnom uzorku iznosila je pH 4.47, a u uzorku sa 10 µg/ml AFB₁, 4.82 nakon 24 sata inkubacije (Grafikon 1).

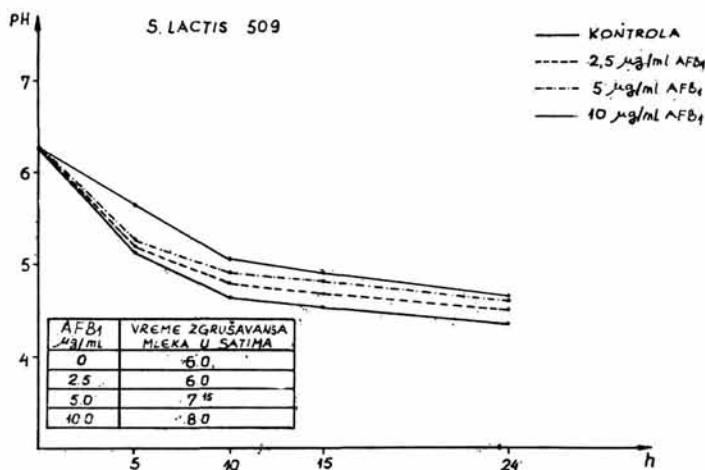
Povećanjem koncentracije toksina produžava se vreme zgrušavanja mleka i ono iznosi 7 sati i 15 minuta (5 µg/ml AFB₁) u soju 509, odnosno 8 sati pri koncentraciji od 10 µg/ml AFB₁. Razlike u konačnoj kiselosti mleka, nakon 24 časa inkubacije, su bile nešto manje nego kod prethodne kulture. U mleku

bez toksina kiselošć je iznosila pH 4.4, a u uzorku sa 10 $\mu\text{g/ml}$ AFB₁, pH 6.4 (Grafikon 2).



Grafikon 1. Utjecaj AFB₁ na promenu kiselošć mleka (pH) i vremena stvaranja grušća u kulturi S. lactis 507.

Graf. 1. Influence of the AFB₁ on milk acidity (pH) and curding time in S. lactis 507 culture.

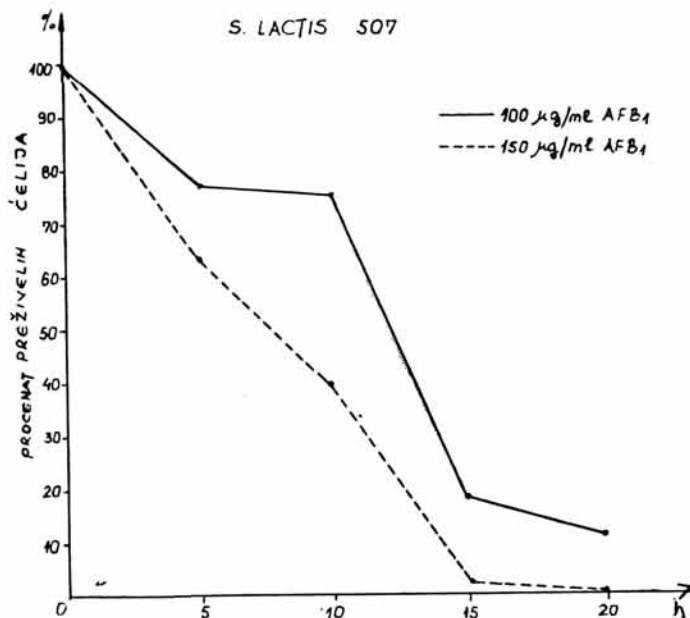


Grafikon 2. Utjecaj AFB₁ na promenu kiselošć mleka (pH) i vremena stvaranja grušća u kulturi S. lactis 509.

Graf. 2. Influence of the AFB₁ on milk acidity (pH) and curding time in S. lactis 509 culture.

Obzirom da ispitane koncentracije AFB₁ nisu u potpunosti zaustavile rast streptokoka u mleku, ispitana je osetljivost ovih bakterija na prisustvo znatno većih koncentracija aflatoksinu. Rezultati ispitivanja utjecaja 100 i 150 $\mu\text{g/ml}$

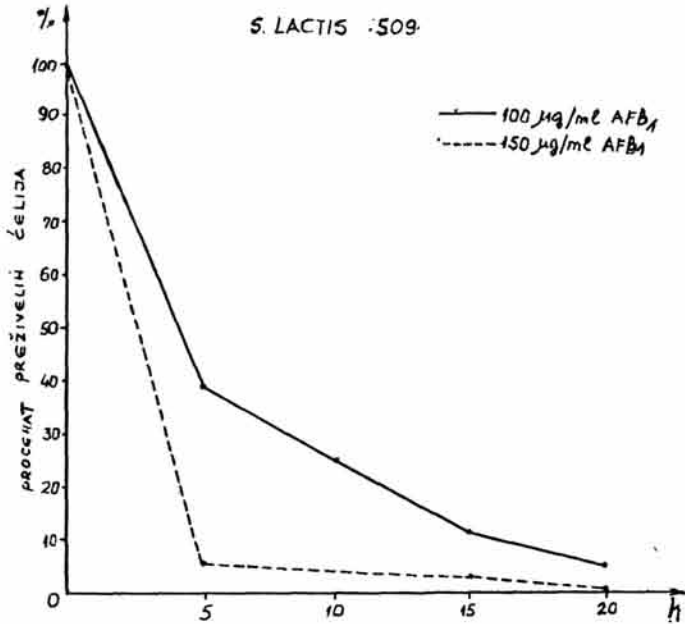
AFB₁ na preživljavanje ćelija i stvaranje mlečne kiseline u funkciji vremena pokazuju da u kulturi *S. lactis* 507, koncentracija od 100 µg/ml AFB₁, usporava rast ćelija u prvih 10 sati inkubacije. Toksični efekat se ogleda u naglom padu broja preživelih ćelija posle 10 odnosno 15 sati inkubacije na 30 °C. Koncentracija od 150 µg/ml AFB₁ drastično smanjuje broj ćelija u kulturi. Procenat preživelih ćelija nakon pet sati inkubacije iznosio je 63.2% da bi na kraju merenja taj procenat bio 0.3% (Grafikon 3).



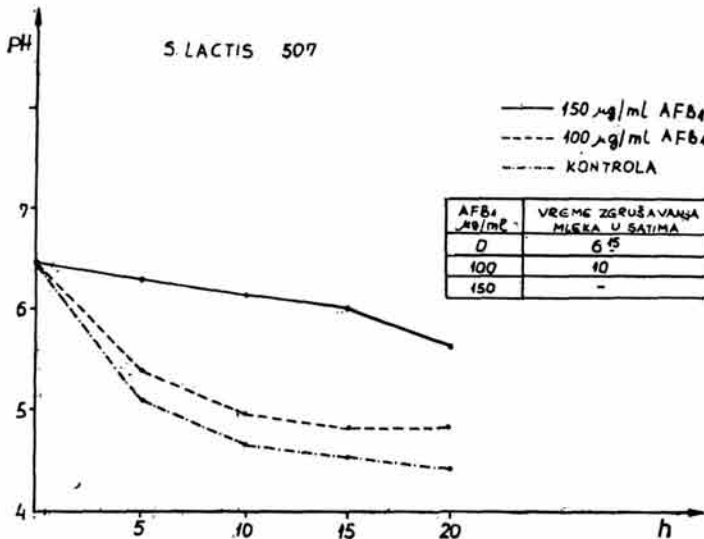
Grafikon 3. Kriva preživljavanja kulture *S. lactis* 507 nakon tretmana sa AFB₁.
Graf. 3. Survival curve of the *S. lactis* 507 culture after treatment with AFB₁.

U drugom soju *S. lactis* 509, koncentracije od 100 i 150 µg/ml AFB₁, također drastično smanjuju broj preživelih ćelija. Procenat preživelih ćelija nakon 5 sati iznosi 39% pri 100 µg/ml, odnosno svega 5% pri 150 µg/ml AFB₁. Nakon 20 sati inkubacije mleka, 4.59% ćelija preživljava u prisustvu 100 µg/ml, a samo 0.31% pri 150 µg/ml (Grafikon 4).

Kao što se i očekivalo promene u broju ćelija pod utjecajem AFB₁ imale su za posledicu manje stvorene kiseline, odnosno produženo vreme zgrušavanja mleka. Više od 10 sati inkubacije je potrebno bakterijama *S. lactis* 507 da u prisustvu 100 µg/ml toksina, povećaju kiselost mleka na pH 5 i formiraju gruš. Pri koncentraciji od 150 µg/ml AFB₁ do formiranja gruš ne dolazi ni nakon 20 sati inkubacije na optimalnoj temperaturi. Krajnje vrednosti pH mleka sa aflatoxinom, znatno su se razlikovale u odnosu na kontrolno mleko. Pri 100 µg/ml AFB₁, pH mleka je iznosio 4.82, a u uzorku sa 150 µg/ml toksina, kiselost mleka, nakon 20 sati, je bila svega 5.62, što je nedovoljno za formiranje gruš (Grafikon 5).



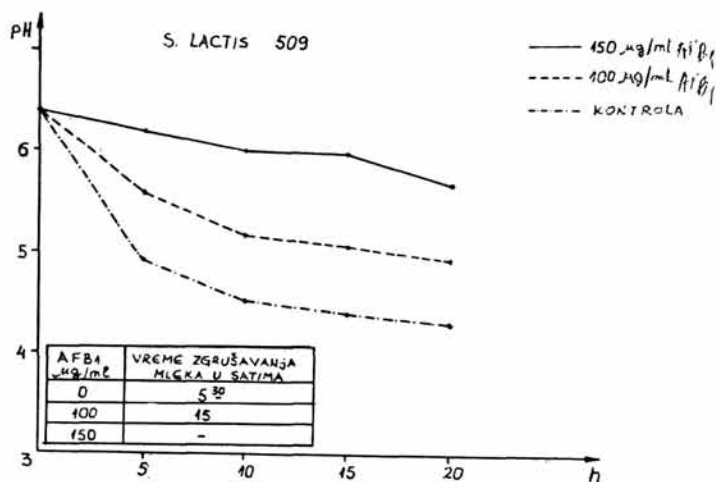
Grafikon 4. Kriva preživljavanja kulture *S. lactis* 509 nakon tretmana sa AFB₁.
Graf. 4. Survival curve of the *S. lactis* 509 culture after treatment with AFB₁.



Grafikon 5. Utjecaj AFB₁ na kiselost mleka i formiranje gruša u kulturi *S. lactis* 507.

Graf 5. Influence of the AFB₁ on the milk acidity and curd forming in *S. lactis* 507 culture.

Kultura *S. lactis* 509 stvara mek gruš za nešto više od 5 sati inkubacije mleka na optimalnoj temperaturi. Uz 100 µg/ml AFB₁ kulturi je potrebno 16 sati da stvori gruš, dok se gruš uopšte ne stvara u mleku sa 150 µg/ml AFB₁. Vrednosti pH mleka nakon 20 sati inkubacije slične su kao i u kulturi *S. lactis* 507. Kiselost kontrolnog uzorka iznosila je 4.3, odnosno 4.94 i 5.63 u prisustvu 100 i 150 µg/ml AFB₁ (Grafikon 6).



Grafikon 6. Utjecaj AFB₁ na kiselost mleka i na formiranje gruša u kulturi *S. lactis* 509.

Graf. 6. Influence of the AFB₁ on the milk acidity and curd forming in *S. lactis* 509 culture.

U toku ispitivanja toksičnog efekta različitih koncentracija aflatoksina prema sojevima *S. lactis* inkubiranih u mleku, primećeno je da u slučajevima kada je dolazilo do stvaranja gruša u prisustvu toksina taj gruš je bio izuzetno mekan i veoma često sluzast. U ispitivanjima u kojima su se koncentracije toksina kretale od 0 do 10 µg/ml AFB₁, formirani gruš je bio normalnog izgleda i čvrstine.

Diskusija

Aflatoxin B₁, prisutan u mleku koje se koristi u proizvodnji, može imati toksičan efekat na starter kulture streptokoka. Naime, naša ispitivanja toksičnosti AFB₁ prema sojevima *S. lactis*, pokazuju da je toksin u određenim koncentracijama zaustavljao rast oba soja. Sve ispitane koncentracije toksina inhibitorno deluju na sojeve streptokoka u mleku. Koncentracije do 10 µg/ml iako ne izazivaju drastično smanjenje broja ćelija, one utječu na produžavanje vremena potrebnog za formiranje gruša. U proseku, 6 do 7 sati je potrebno da bi ispitane kulture postigle kiselost mleka ispod pH 5 i stvorile gruš. U prisustvu 10 µg/ml AFB₁, to vreme se produžava još za 2 do 3 sata. Toksičnost aflatoksina B₁ je utvrđena i u drugim vrstama bakterija mlečne kiseline inkubiranim u mleku. Tako na primer, vreme stvaranja gruša sa *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacterium bulgaricum* u prisustvu 30 µg/ml AFB₁ se pro-

dužava od 90 do 105 minuta (9). Toksični efekat AFB₁ na streptokoke u mleku ispoljava se u prisustvu znatno većih koncentracija toksina. Nađeno je da toksičnost AFB₁ zavisi od upotrebljene koncentracije i dužine izlaganja ćelija delovanju toksina. Smanjenje broja ćelija u prisustvu 100 µg/ml AFB₁ je izraženo naročito posle 10 časova inkubacije na 30 °C. Pri toj koncentraciji procenat preživelih ćelija *S. lactis* 507 i 509 iznosi između 40 i 60%. Uporedo sa smanjenjem broja preživelih ćelija proizvodi se i manje mlečne kiseline. U prisustvu 100 µg/ml AFB₁ vreme potrebno za formiranje gruša se produžava od 4 do 9 časova. Kada se u mleku nalazi 150 µg/ml AFB₁ do zgrušavanja mleka ne dolazi ni nakon 20 sati inkubacije na optimalnoj temperaturi. Koncentracije aflatoksina, koje pokazuju toksičan efekat na ispitivane streptokoke su prilično visoke. Postavlja se pitanje šta bi mogao biti uzrok »rezistentnosti« streptokoka prema tako visokim koncentracijama aflatoksina B₁ u mleku? Utvrđeno je da se aflatoxin na različite načine vezuje za albumine (4), enzime u ćeliji (1), odnosno amino kiseline (6). Podaci (2) pokazuju da se AFB₁ takođe vezuje za kazein u mleku. U tom slučaju, pošto su u mleku prisutne razne vrste enzima, amino kiselina, a u najvećoj meri kazein, onda je logično pretpostaviti da se vezivanjem AFB₁ za kazein smanjuje broj slobodnih molekula AFB₁, a samim tim veće koncentracije toksina su potrebne da bi se ispoljio toksičan efekat AFB₁ na ispitivane streptokoke.

Kao posledica vezivanja AFB₁ za kazein u mleku, primećeno je u nekim slučajevima, da su koncentracije toksina u pojedinim mlečnim proizvodima, kao što su pavlaka i sir (3), znatno veće nego što je bila koncentracija AFB₁ u mleku od kojeg su napravljeni proizvodi. Obzirom da se u toku procesa proizvodnje mlečnih preradevina odvaja surutka, AFB₁ ostaje vezan za kazein i na taj način se koncentriše u proizvodima.

Dobijeni rezultati, koji pokazuju da različite koncentracije AFB₁ toksično deluju na streptokoke, imaju određen ekonomski značaj. Produžavanje vremena potrebnog za stvaranje dovoljne količine mlečne kiseline, odnosno formiranje gruša, u toku tehnološkog procesa, izaziva znatne ekonomske štete. S druge strane činjenica je da koncentracije manje od 10 µg/ml AFB₁ ne izazivaju veliko smanjenje broja ćelija streptokoka, odnosno vreme zgrušavanja mleka kao i kiselost takvog mleka se ne razlikuje bitnije od mleka bez toksina. To pokazuje da mleko sa toksinom i proizvodi od njega prilično »neopaženo« prolaze kroz tehnološki proces i s toga, dobijeni proizvodi koji sadrže AFB₁ direktno ugrožavaju ljudsko zdravlje.

Zaključci

Aflatoxin B₁ pokazuje toksičan efekat na *Streptococcus lactis* 507 i 509, kulture inkubirane u mleku.

Koncentracije do 10 µg/ml AFB₁ ne utječu značajnije na smanjenje broja ćelija. Pri koncentracijama od 100 i 150 µg/ml toksina broj preživelih ćelija u kulturama se smanjuje i to kako s povećanjem koncentracije tako i sa dužinom izlaganja ćelija aflatoksinu.

Kao posledica smanjenja broja ćelija, pri svim koncentracijama toksina većim od 10 µg/ml, stvara se znatno manje mlečne kiseline, a vreme potrebno za formiranje gruša, produžava se za 2 do 9 sati, u zavisnosti od upotrebljene koncentracije.

Summary

Toxic effects of aflatoxin B₁ on *Streptococcus lactis* strains 507 and 509 in milk are presented.

Comparison of the inhibition of growth with the decrease in viability showed that aflatoxin B₁ at 2.5 and 5.0 µg/ml did not inhibit growth during the 20hr of incubation. *Streptococci* incubated at 30 °C demonstrated a marked decline in viability with AFB₁ at 100 and 150 µg/ml. Total inhibition of growth of *S. lactis* 507 and 509 is not reached even with 150 µg/ml AFB₁.

As a result of the decrease in viability the milk curdling with both strains at 10, 100 and 150 µg/ml of AFB₁ was delay from 2 to 9 hours, approximatively.

Literatura

- GOLDELATT, L. A. 1969.; Aflatoxin, Scientific Background Control and Implication. Acad. Press, New York.
- KIERMEIER, F. 1977.: The significance of aflatoxin in dairy industry. Bull. Int. Dairy Fed., 98,1.
- KIERMEIER, F., and MASHLEY, R. 1977.; Einfluss der molkereitechnischen Behandlung der Rohmilch auf den Aflatoxin M₁ — Gehalt der daraus hergestellten Produkte. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** 163 : 183/187.
- RAO, V. N., VALMIKNATHAN, V. K., and VERGESE, N. 1968.; Binding of aflatoxin by plasma albumin in vitro. **Biochem. Biophys. Acta**, 165 : 288/289.
- RAŠIĆ, J. LJ., and KURMAN, J. A. 1978.; Yoghurt. Copenhagen, Denmark.
- SCHABORT, J. C., and STEYN, M. 1969.; Substrate and phenobarbitol inducible aflatoxin 4-hydroxylation and aflatoxin metabolism by rat liver microsomes **Biochem. Pharmacol.** 18 : 2241—2252.
- STEVIC, B. 1948.; Prilog poznavanju morfologije promenljivosti *Bacterium bulgaricum*. Arhiv za poljoprivredne Nauke i tehniku, II, 5, Doktorska disertacija.
- ŠUTIĆ, M., BANINA, A., i JOVANOVIĆ, S. 1976.; Uticaj aflatoksina B₁ na morfološku promenljivost bakterija mlečne kiseline. III Kongres mikrobiologa Jugoslavije, Bled, 686/687.
- ŠUTIĆ, M., and BANINA, A. 1978.; The influence of aflatoxin B₁ on Gas Production by Lactic acid Bacteria. 4th Intrn. IUPAC Symposium of Mycotoxins and Phycotoxins, Lausanne.
- ŠUTIĆ, M., DEVIĆ, V., OBRADOVIĆ, D. i BANINA, A. 1983.; Osetljivost sojeva *Lactobacillus casei* i *Lb. lactis* na AFB₁ Mljekarstvo (33) 9 : 859—267.