

## OSETLJIVOST SOJEVA *LACTOBACILLUS CASEI* I *LB. LACTIS* NA AFLATOKSIN B<sub>1</sub>\*

Prof. dr Marija ŠUTIĆ, Vukosava DEVIĆ, dipl. inž., mr Dragojlo OBRADOVIĆ i mr Ana BANINA, Poljoprivredni fakultet, Katedra za mikrobiologiju, Beograd

### Sažetak

*Iz sireva gauda, trapist, podravac i à la belpaese izdvajane su štapičaste bakterije mlečne kiseline. Identifikacijom 25 izolata utvrđeno je da 3 pripadaju vrsti Lactobacillus lactis, a 22 izolata vrsti Lactobacillus casei var. casei.*

*Aflatoksin B<sub>1</sub> deluje inhibitorno na čvrstoj podlozi na sve ispitane sojeve, dok u lakmus mleku svi sojevi proizvode kiselinu i gruš, brže nego u kontrolnom mleku bez aflatoksina. Pored toga, svi sojevvi Lb. casei i jedan soj Lb. lactis u lakmus mleku sa aflatoksinom izdvajaju surutku i gas, a dva soja Lb. lactis ne izdvajaju. Prema tome, veliki broj izolata homofermentativnih bakterija mlečne kiseline u prisustvu aflatoksina B<sub>1</sub> postaju heterofermentativni.*

### Uvod

Prethodna ispitivanja dejstva aflatoksina B<sub>1</sub> na bakterije mlečne kiseline pokazuju da aflatoksin deluje kako na morfološka tako i na fiziološka svojstva ovih bakterija (Šutić i Banina, 1978, 1979; Šutić i dr., 1978). Promene ćelija bakterija mlečne kiseline zavise od koncentracije aflatoksina B<sub>1</sub> i dužine njegovog dejstva i te promene su uglavnom nepovoljne za industrijsku preradu mleka u različite proizvode od mleka. U prisustvu aflatoksina proizvoda se vreme zgrušavanja mleka i dolazi do izdvajanja seruma u proizvodnji jogurta (Šutić i Banina, 1978), zatim, homofermentativne bakterije mlečne kiseline izdvajaju gas, pa, prema tome, postaju heterofermentativne, što ima velikog značaja u proizvodnji sireva, jer i na ovaj način može doći do nadimanja sireva (Šutić i Banina, 1979).

Aflatoksin B<sub>1</sub> ne deluje jednako na različite vrste bakterija mlečne kiseline, pa čak ni na različite sojeve iste vrste. Ispitivanja su do sada vršena na malom broju vrsta i sojeva laboratorijskih kultura, pa je potrebno ova ispitivanja proširiti na veći broj izolata bakterija mlečne kiseline, što je u ovom radu učinjeno.

### Materijal i metodika

Bakterije mlečne kiseline izdvajane su iz nekoliko vrsta sireva: à la belpaese, podravec, trapist i gauda. Za izdvajanje štapičastih bakterija korišćena je Rogoza podloga (Rogosa et al., 1951), a za razvoj i umnožavanje čistih kultura MRS buljon (De Man et al., 1960). Izdvojene čiste kulture održavane su na kvašćevom dekstroznom agaru — YDA (Naylor and Sharpe, 1958).

\* Referat održan na XXI Seminaru za mljekarsku industriju Zagreb, 1983.

Identifikacija izdvojenih laktobakterija vršena je po šemi Sharpe et al. (1966) i priručnika Bergeya (1974).

Utjecaj aflatoksina B<sub>1</sub> na izdvojene laktobakterije ispitan je auksonografskim metodom na čvrstoj podlozi — YDA agaru i u obranom lakmus mleku. U zasejanom agaru pravljena su udubljenja i stavljano je 0,05; 0,1 i 0,2 ml aflatoksina B<sub>1</sub> koncentracije 10<sup>-6</sup> g/ml. Obrano sterilno lakmus mleko korišćeno je u epruветama po 10 ml mleka sa 1 ml aflatoksina B<sub>1</sub> iste koncentracije. Razvoj zasejanih kultura praćen je posle 24, 48 i 72 časa na 30° C (303,15 K).

Aflatoksin korišćen u ovim ispitivanjima dobijen je iz Laboratorije za mikotoksine iz Bilthoven-a (Holandija), od dr Egmond-a, na čemu se autori najlepše zahvaljuju.

### Rezultati ispitivanja

Kako je u metodici navedeno bakterije mlečne kiseline izdvajane su iz 4 vrste sira. Rezultati dobijeni na Rogoza podlozi pokazuju da je zastupljenost štapićastih bakterija u ispitivanim sirevima različita, što je prikazano u tabeli 1.

Tabela 1

#### Zastupljenost štapićastih bakterija mlečne kiseline na Rogoza podlozi

Vrsta sira	Ukupan broj bakterija na Rogoza podlozi	% štapićastih oblika
Podravec	77 000 000	70
Gauda	70 000 000	80
Trapist	95 000 000	50
A la belpaese	23 700 000	50

Iz svake vrste sira sa Rogoza podloge izdvojeno je po 10 kolonija. Posle mikroskopiranja i prečišćavanja za identifikaciju je ostalo 25 izolata. Od ovog broja 7 izolata je izdvojeno iz sira podravec, 5 iz trapista, 8 iz gaude i 5 iz a la belpaese. Rezultati identifikacije prikazani su u tabelama 2, 3, 4 i 5. Identifikovani sojevi uglavnom pripadaju vrsti *Lactobacillus casei var. casei*, a samo tri soja vrsti *Lactobacillus lactis*.

Utjecaj aflatoksina B<sub>1</sub> ispitan je na sve identifikovane sojeve. Auksonografskim metodama utvrđeno je da su svi izolati osetljivi na ovaj mikotoksin i kod svih je dobijena zona inhibicije. Ta zona je uglavnom iznosila 2 mm u prečniku (slika 1), a kod soja K-5 izdvojenog iz sira gaude 3 mm.

Svi izolati u kontrolnom lakmus mleku bez aflatoksina sporije stvaraju kiselinu i 11 izolata u toku 24 časa uopšte ne menja mleko, a 5 sojeva ni posle 48 časova, već su promene izrazite tek za 72 časa (tabela 6).

U tabeli 7 prikazani su rezultati utjecaja aflatoksina na ispitivane sojeve u lakmus mleku. Razlike u odnosu na kontrolno mleko su veoma uočljive. Svi ispitivani izolati već u toku 24 časa od zasejavanja stvaraju kiselinu i zgrušavaju mleko. Pored toga, izdvaja se veća količina surutke i gas. Izuzetak su dva



Slika 1. Utjecaj aflatoksina B<sub>1</sub> na *Lb. casei* soj K-5, izdvojen iz sira podracev

Tabela br. 2 — Identifikacija laktobakterija izdvojenih iz sira podraceva

ŠIFRA KULTURE	Pokretljivost	Katalaza	Bojenje po Gramu	Porast na 15°C (24, 48, 72) (288, 45%)	Porast na 45°C (24, 48, 72) (318, 54%)	NH <sub>3</sub> iz arginina	Eskulin	Fermentacija					
								Glukoza	Saharozna	Laktoza	Maltoza	Rafinoza	Ramnoza
<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>		-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
K-3	nepokret	-	+	+	- - +	-	+	+	+	+	+	-	-
K-1	nepokret	-	+	+	- - +	-	+	+	+	+	+	-	-
K-2	nepokret	-	+	+	- - +	-	+	+	+	+	+	-	-
K-4	nepokret	-	+	+	- - +	-	+	+	+	+	+	-	-
K-5	nepokret	-	+	+	+ + +	-	-	+	+	+	+	-	-
K-6	nepokret	-	+	+	+ + +	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Lb. lactis</i>		-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
K-7	nepokret	-	+	- - -	+ + +	-	-	+	+	+	+	-	-

izolata iz sira trapista vrste *Lactobacillus lactis*, kod kojih ne dolazi do izdvajanja surutke i gasa.

### Diskusija

U ranijim ispitivanjima vrlo često su iz sireva izdvajane bakterije mlečne kiseline štapićastog oblika iako nisu korišćene kao starter kulture. Prikazani rezultati pokazuju da se ove bakterije u znatnom broju nalaze i u ispitivanim

Tabela br 3 — Identifikacija laktobakterija izdvojenih iz sira gaude

ŠIFRA KULTURE	Pokretljivost	Katalaza	Bojenje po Gramu	Porast na 15°C (2,88, 15K)		Porast na 45°C (318, 15K)		NH <sub>3</sub> iz arginina	Eskulin	Fermentacija					
				20°	48°	72°	20°			48°	72°	Glukoza	Saharaza	Laktoza	Maltoza
<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>		-	+	+	+	±	-	+	+	+	+	+	-	-	
K-2	nepokret.	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	
K-8	nepokret.	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	
K-9	nepokret.	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	
K-1	nepokret.	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	
K-4	nepokret.	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	
K-3	nepokret.	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	
K-7	nepokret.	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	
<i>Lb. lactis</i>		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
K-5	nepokret.	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	

Tabela br. 4 — Identifikacija laktobakterija izdvojenih iz sira trapista

ŠIFRA KULTURE	Pokretljivost	Katalaza	Bojenje po Gramu	Porast na 15°C (2,88, 15K)		Porast na 45°C (318, 15K)		NH <sub>3</sub> iz arginina	Eskulin	Fermentacija					
				20°	48°	72°	20°			48°	72°	Glukoza	Saharaza	Laktoza	Maltoza
<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>		-	+	+	+	±	-	+	+	+	+	+	-	-	
K-1	nepokret.	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	
K-3	nepokret.	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	
K-4	nepokret.	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	
<i>Lb. lactis</i>		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
K-2	nepokret.	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	
K-5	nepokret.	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	

sirevima, a identifikacijama 25 izolata utvrđeno je da 3 soja pripadaju vrsti *Lactobacillus lactis*, a 22 vrsti *Lb. casei* var. *casei*. Ispitivanja Perry i Sharpe (1960), Naylor i Sharpe (1958a, 1958b) pokazuju da su ove vrste prisutne i u mleku i u drugim izvorima iz kojih dospevaju u mleko, pa prema tome i u sireve, odnosno u čedar sir. Ove bakterije se u većem broju nalaze u sirevima u kasnijim fazama zrenja i učestvuju u zrenju sireva.

Tabela br. 5 — Identifikacija laktobakterija izdvojenih iz sira a<sup>1</sup> la Belpoese

ŠIFRA KULTURE	Pokretljivost	Katalaza	Bojenje po Gramu	Porast na 15°C (2,88, 15K)		Porast na 45°C (3,18, 15K)		NH <sub>3</sub> iz arginina	Eskulin	Fermentacija					
				24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>			48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>	Glukoza	Saharaza	Laktaza	Maltaza
Lb. casei var. casei		-	+	+				-	+	+	+	+	+	-	-
K-1	nepokret	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
K-2	nepokret	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
K-3	nepokret	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
K-4	nepokret	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
K-7	nepokret.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-

Ispitivanja utjecaja aflatoksina B<sub>1</sub> na ove bakterije pokazuju da su i one osjetljive na dejstvo ovog mikotoksina, kao i čiste laboratorijske *Lb. casei*. Međutim, kod čistih kultura aflatoksin B<sub>1</sub> delovao je u pravcu smanjenja produkcije kiseline (Šutić et al., 1978), a ovi izolati stvarali su brže kiselinu nego u kontrolnom mleku bez aflatoksina. Ovo se, svakako, može pripisati različitim koncentracijama upotrebljenog aflatoksina. Što se tiče proizvodnje gasa nema razlike, jer su i sa čistim kulturama dobijeni isti rezultati (Šutić i Banina, 1979).

Tabela br. 6 — Promene u lakmus mleku

naziv sira	šifra kulture	vreme promena			24 <sup>h</sup>			48 <sup>h</sup>			72 <sup>h</sup>		
		A	C	R	A	C	R	A	C	R			
PODRAVEC	<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>												
	K-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+			
	K-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+			
	K-4	-	-	-	-	+	+	+	+	+			
	K-5	-	-	-	-	+	+	+	+	+			
	K-2	-	+	+	-	+	+	+	+	+			
	K-6	-	+	+	+	+	+	+	+	+			
	<i>Lb. lactis</i>												
K-7	-	+	-	-	+	-	+	+	+				

GAUDA	<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>											
	K-3	-	-	-		-	+	+		+	+	+
	K-4	-	-	-		-	+	+		+	+	+
	K-7	-	-	-		-	+	+		+	+	+
	K-2	-	+	+		-	+	+		+	+	+
	K-8	-	+	+		-	+	+		+	+	+
	K-1	-	+	+		+	+	+		+	+	+
	K-9	-	+	+		+	+	+		+	+	+
	<i>Lb. lactis</i>											
K-5	-	-	+		-	-	+		+	+	+	
TRAPIST	<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>											
	K-1	-	-	+		-	+	+		+	+	+
	K-3	-	+	+		-	+	+		+	+	+
	K-4	-	+	+		+	+	+		+	+	+
	<i>Lb. lactis</i>											
	K-2	-	-	+		-	-	+		+	+	+
K-5	-	+	+		-	+	+		+	+	+	
Á LA BELPAESE	<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>											
	K-1	-	-	-		-	-	+		+	+	+
	K-2	-	+	+		-	+	+		+	+	+
	K-3	-	+	+		-	+	+		+	+	+
	K-4	-	+	+		-	+	+		+	+	+
	K-7	-	+	+		-	+	+		+	+	+

Značajan je podatak, dobijen u ovim ispitivanjima, da jedan soj *Lb. lactis* u prisustvu aflatoksina stvara surutku i gas u lakmus mleku, dok 2 soja ne stvaraju. Ovi rezultati potvrđuju ranija istraživanja da svi sojevi u okviru vrste nisu u istoj meri osetljivi na dejstvo aflatoksina.

Rezultati ovih istraživanja imaju značaja za tehnologiju izrade proizvoda od mleka, kada je u mleku prisutan aflatoksin M<sub>1</sub>, kao derivat aflatoksina B<sub>1</sub> sa istim toksičnim svojstvima. Aflatoksin se u mleku pojavljuje posle 12—24 časa od ishrane krava plesnivim hranivima koja sadrže aflatoksin (V a n d e r

Linde et al., 1965); Allcroft and Roberts, 1968). Aflatoksin je term stabilan i ne dolazi do bitne promene njegove koncentracije u toku pasterizacije i sterilizacije (Stoloff et al., 1975; Egmond et al., 1976), pa neposrednim dještvom na bakterije mlečne kiseline utječe na kvalitet proizvoda i ekonomičnost proizvodnje.

Tabela br. 7 – Promena lakmus mleka sa aflatoksinom

naziv sira	šifra kulture	vreme promena	24 <sup>h</sup>				
			A	C	R	S	G
PODRAVEC	<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>						
	K-3		+	+	+	+	+
	K-1		+	+	+	+	+
	K-2		+	+	+	+	+
	K-4		+	+	+	+	+
	K-5		+	+	+	+	+
	K-6		+	+	+	+	+
	<i>Lb. lactis</i>						
	K-7		+	+	+	+	+
GAUDA	<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>						
	K-2		+	+	+	+	+
	K-8		+	+	+	+	+
	K-9		+	+	+	+	+
	K-1		+	+	+	+	+
	K-4		+	+	+	+	+
	K-3		+	+	+	+	+
	K-7		+	+	+	+	+
	<i>Lb. lactis</i>						
	K-5		+	+	+	+	+

TRAPIST	<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>				
	K-1	+	+	+	+
	K-3	+	+	+	+
	K-4	+	+	+	+
	<i>Lb. lactis</i>				
	K-2	+	+	+	-
K-5	+	+	+	-	
À LA BELPAESE	<i>Lb. casei</i> var. <i>casei</i>				
	K-1	+	+	+	+
	K-2	+	+	+	+
	K-3	+	+	+	+
	K-4	+	+	+	+
	K-7	+	+	+	+

### Summary

The lactic acid bacteria were isolated from cheeses Gauda, Trapist, Podravec na À la Belpaese. There were determined 25 isolates. Among them 22 belong to species of *Lactobacillus casei* var and 3 to *Lb. lactis*.

The aflatoxin B<sub>1</sub> inhibition of growth all isolates of lactic acid bacteria on the agar medium. On the other hand, all strains formed more acid and faster milk curdling in the aflatoxin B<sub>1</sub> presence, than in control milk. In the same time on the surface of the curd occurred the milk serum and gas was detected, except in the case with two strains of *Lb. lactis*.

The data suggests that isolated homofermentative lactic acid bacteria become heterofermentative due to the influence of aflatoxin.

### Literatura

- ALLCROFT, R., ROBERTS, B. A. (1968): Toxic Groundnut Meal: The Relationship between Aflatoxin B<sub>1</sub> Intake by Cows and Excretion of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milk. *Vet. Record* 27, 116.
- BERGEY'S Manual of Determinative bacteriology (1974): Co-editors: BUCHANAN, E. R. and N. E. GIBBONS. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, M. E. (1960): A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bact.* 23, 130.



- EGMOND, VAN, H. P. SCHULLER, P. L., PAULSCH, E. E. (1976): The effect of processing of the aflatoxin M<sub>1</sub> content of milk and milk products. III International I. U. P. A. C. Symposium of Mycotoxins in foodstuffs. Paris.
- NAYLOR, J., SHARPE, M. E. (1958): Lactobacilli in Cheddar cheese I. The use of selective medium for isolation and serological typing for identification. *J. Dairy Res.*, **25**, 92.
- NAYLOR, J. SHARPE, M. E. (1958a): Lactobacilli in Cheddar cheese. II. Duplicate Cheeses. *J. Dairy Res.* **25**, 421.
- NAYLOR, J., SHARPE, M. E. (1958b): Lactobacilli in Cheddar cheese. III. The source of Lactobacilli in cheese. *J. Dairy Res.* **25**, 431.
- PERRY, K. D., SHARPE, M. E. (1960): Lactobacilli in raw milk and in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* **27**, 267.
- ROGOSA, M., MITCHELL, J. A., WISEMAN, R. F. (1951): A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. *J. Bact.*, **62**, 132.
- SHARPE, M. E., FRYER, F. T., SMITH, G. D. (1966): Identification of the Lactic acid bacteria. Ed. GIIBS, B. M. and SKINNER, F. A. (1966): Identification methods for microbiologists, part A, 65—79, New York.
- STOLOFF, L., TRUCKSESS, M., HARDIN, N., FRANCIS, O. J., HAYES, J. R., POLAN, C. E., CAMPBELL, T. C. (1975): Stability of aflatoxin M in milk. *J. Dairy Sci.* **58** (12) 1789—1793.
- ŠUTIĆ, M., BANINA, A., STOJANOVIĆ, M. (1978): Uticaj aflatoksina B<sub>1</sub> na acidogenu sposobnost nekih bakterija mlečne kiseline. *Mikrobiologija*, **15**, (1) 31—37.
- ŠUTIĆ, M., BANINA, A. (1978): The effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on the morphological and biochemical properties of lactic acid bacteria for yoghurt manufacturing. Fifth International Congress of Food Science and Technology, Kyoto, Japan.
- ŠUTIĆ, M., BANINA, A. (1979): Uticaj aflatoksina B<sub>1</sub> na morfološku promenljivost bakterija mlečne kiseline. *Mikrobiologija*, **16**, (2) 113—120.
- ŠUTIĆ, M., BANINA, A. (1979): The Influence of Aflatoxin B<sub>1</sub> on Gas Production by Lactic acid Bacteria. 4th International IUPAC Symposium of Mycotoxins and Phycotoxins, Lausanne.
- VAN DER LINDE, J. A., FRENS, A. M., VAN ESCH, G. J. (1965): Experiments with cows fed groundnut meal containing aflatoxin. In »Mycotoxins in Foodstuffs« Edited by G. WOGAN M. I. T. PRESS, Cambridge, Mass. 247—249.