

# Toksičnost petroleterskog ekstrakta *Microcystis* sp. i *Aphanizomenon* sp. na šaranski mlad

B. Ržaničanin, T. Treer, I. Balzer

Pojave toksičnosti nekih morskih i slatkovodnih algi kod riba i nekih životinja zabilježene su već prije mnogo godina, a u zadnje vrijeme i kod ljudi. Relativno je malo poznato o toksinima koje produciraju alge, posebno radi toga, jer je njihovo laboratorijsko uzgajanje povezano s velikim poteškoćama. To se čini paradoksalnim s obzirom na njihov vrlo brzi rast i velike koncentracije u kojima se one pod povoljnim ekološkim uvjetima javljaju u eutrofnim vodama.

Do sada je najviše istraživana toksičnost modrozelenih algi i to: *Microcystis* sp., *Anabena* sp. i *Aphanizomenon* sp. jer, čini se, da su upravo one najviše povezane s letalitetom i oboljenjima koje mogu izazvati njihovi metaboliti u ljudi i životinja. Istraživanjem utjecaja nekih vanjskih faktora na stvaranje algalnih toksina nađeno je, da se najpovoljnija temperatura za njihovu produkciju kreće između 25 — 32° C. Laboratorijski je također ustanovljeno, da se optimalna aeracija, zavisno o temperaturi vode, kreće između 100 — 1000 ml/min, a optimalni intenzitet svjetla oko 2200 luxa.

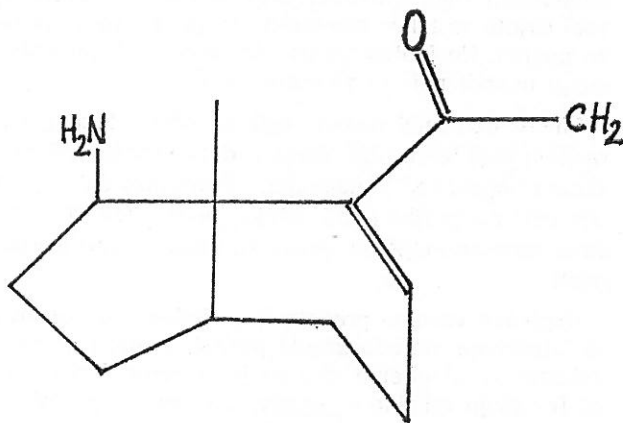
Bishop i sur. (1959.) odredili su u *M. aeruginosa* toksični princip, koji je bio topiv u vodi, metanolu, etanolu, no netopiv u nepolarnim otapalima kao što su aceton, eter, kloroform i benzen. Ekstrahirani princip pokazivao je da se vrlo vjerojatno radi o proteinu (peptidu). Njegov LD<sub>100</sub>, ip. miš, iznosio je 2 mg/kg. Istraživanja na *Microcystis* sp. proveli su i drugi autori, i rezultati su pokazali i ovaj puta isto.

Louw (1950.) ustanovio je da je toksin, alkaloid, i da on izaziva poremećaje u centralnom nervnom sistemu i jetrima. Do istih rezultata dolazi i Gorham (1960.). Razlike koje se javljaju u rezultatima pojedinih autora mogle bi se svesti vrlo vjerojatno u razlike biokemijskih aktivnosti pojedinih sojeva *M. aeruginosa*.

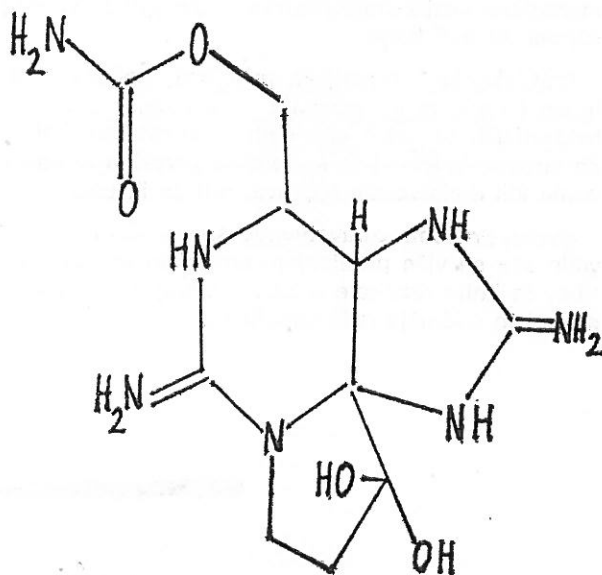
Među vrlo toksične supstance koje proizvode alge, naročito u cvatu, ubraja se alkaloid relativno male molekularne mase (165). Metabolit je *Anabena Flos aquae*, a nazvan je anatoxin-a. (Devlin i sur. 1977.). Slika 1. LD<sub>100</sub> ip. miš, iznosio je 0,3 mg/kg. Smrt nastupa nakon 4—5 minuta, blokiranjem neuromuskulature koja inhibira respiraciju.

Istraživanjem je nadalje utvrđeno da postoje još najmanje 3—5 homola anatoxina-a, nazvani anatoxin-b, -c i -d.

Iz *Aphanizomenon flos aquae* u cvatu Alam i sur. (1978.) izolirali su iz smjese toksičnih supstanci, koja je nazvana aphatoxin, toxin saxitoxin, u stvari alkaloid kemijski derivat tetrahidropurina. Saxitoxin kao i aphatoxin izazivaju uginuće riba i životinja inhibicijom respiratornog sistema bez posebnog učinka na kardiovaskularni sistem.



Sl. 1. Anatoxin-a



Sl. 2. Saxitoxin

Modrozeleni alge mora ne izazivaju pojave toksičnosti u tolikoj mjeri kao u slatkim vodama. Međutim, iz nekih su izolirane vrlo toksične supstance, kao što su aplysiatoxin i debromoaplysiatoxin, molekularne mase oko 600. Njihova toksičnost iznosi 0,3 mg/kg (Kato i Scheuer 1976.).

\* Referat održan na simpoziju »Aktualni problemi ihtiologije i ribarstva«, Plitvice, 1980. god.

Prof. dr Boris Ržaničanin, dipl. inž. Tomislav Treer, asistent; Fakultet poljoprivrednih znanosti, Zagreb. — Dr Ivan Balzer, znanstveni savjetnik, Prehrambeno tehnološki institut, Zagreb.

Iz velikog broja naučno istraživačkih radova proizlazi, da različiti sojevi, a ne samo različite vrste algi, mogu sintetizirati bitno različite vrste toksina. Neki su nisko molekularne mase, alkaloidi brzog djelovanja sa neurotičnom aktivnošću, dok su drugi visoko molekularne mase, peptidi sa hepatoksičnim, i neurotičnim djelovanjem. Čini se, da pojedini sojevi mogu proizvoditi više nego jednu vrstu toksina. Koliko vrsta i kakve toksine, ostaje otvoreno pitanje, koje će biti predmet vrlo interesantnog, ali sigurno i dugotrajnog naučnog istraživanja.

Radovi na identifikaciji algalnih toksina sve su brojniji, te se unazad nekoliko godina radi vrlo aktivno na toj problematici. Zadatak je ovog istraživačkog rada, da se dobije određena informacija o potencijalnoj sposobnosti modrozelenih algi naših područja u produkciji toksičnih aktivnih tvari u ribnjačkim vodama i njihovo djelovanje na riblji organizam.

### METODIKA RADA

Po 10 komada šaranskog mlada, dobi pet mjeseci i težine u prosjeku 50 g bilo je stavljeno u staklene akvarije volumena sto litara. Temperatura vode u akvarijima iznosila je 15° C, a zasićavana je zrakom preko kompresorske pumpe. Voda u akvarijima mijenjana je svakih 24 sata.

U šarančiće je inicirano po: 0,1, 0,2, 0,5 i 1,0 ml petroleterkog ekstrakta otopljenog u glicerinu. Ekstrakt je dobiven iz alga: *Microcystis sp.* i *Aphanizomenon sp.* u približno jednakim omjerima. Utjecaj danog ekstrakta na šaranski mlad vršen je svakodnevnim kontrolnim promatranjem zdravstvenog stanja riba.

### REZULTATI I DISKUSIJA

Alge iz kojih je bio dobiven petroleterni ekstrakt bile su sabrane pomoću planktonske mrežice na dijelu ribnjaka (Garešnica) na kojemu je koncentracija uginulih algi bila najveća. Sušenje sabrane zelene mase bilo je provedeno u sušioniku na temperaturi od 80° C odnosno 105° C. Količina dobivenog osušenog uzorka iznosila je 8,1 g, stavljena je na ekstrakciju u aparat po Soxhletu. Ekstrakcija je provedena petroleterom (40 — 70° C) kroz 5 sati. Dobiveni petroleterni ekstrakt uparen je do suha i vagan. Ekstrakt, 0,31 g, otopljen je potom na nešto povećanoj temperaturi (80° C) u 20 ml glicerina (24,82 g), tako da je koncentracija ekstrakta algi u glicerinu iznosila 1,55% m/v. Primijećeno je međutim, da je dio ekstrakta u glicerinu ostao neotopljen, koji se pokazao kao tamno obojena suspenzija. Tako pripremljeni glicerinski ekstrakt iniciran je špricom (1,0 ml) u trbušnu šupljinu šaranskog mlada. Količina unesenog ekstrakta u 10 komada svake grupe šarančića iznosila je: 0,1, 0,2, 0,5 i 1,0 ml, odnosno apsolutna količina suhe tvari petroleternog ekstrakta bila je: 1,55 mg, 3,10 mg, 7,75 mg i 15,5 mg, ili preračunato na 1 kg: 31,0 mg, 62,0 mg, 155 mg i 310 mg. U prethodnom pokusu na istom broju riba istražen je utjecaj djelovanja 1 ml

čistog glicerina. Pokazalo se, da je glicerin unesen u trbušnu šupljinu šarančića bio slijedeći dan u potpunosti resorbiran, pa pretpostavljamo, da nije utjecao na dobivene rezultate.

Djelovanjem glicerinskog ekstrakta na šaranski mlad prikazano je na tablici 1.

Tablica 1. Broj uginulih injiciranih šarančića

Količina injiciranog ekstrakta u ml	0,1	0,2	0,5	1,0
Sveukupni broj uginulih šarančića nakon 94 sata	—	—	—	4

Letalno djelovanje ekstrakta pojavilo se samo kod najvećih koncentracija odnosno kod 310 mg/kg. Već nakon 24 sata uginula su tri a nakon 96 sati još jedan šarančić ili sveukupno četiri. Ostale koncentracije nisu djelovale letalno na šaranski mlad. Sekcijom uginulih riba pokazalo se, da su se u trbušnoj šupljini javili upalni procesi. Kod svih riba glicerin je bio u potpunosti resorbiran. Neotopljeni dio ekstrakta mogao se slabo zamjetiti samo kod najveće injicirane količine na mjestu injiciranja, kao slabo obojene čestice. Kod svih ostalih šarančića koji su primili manje doze ekstrakta nije se mogla primjetiti neka bitnija promjena. U jednom slučaju na mjestu gdje je ekstrakt injiciran subkutano, što se omaškom dogodilo, pojavila se gnojna upala, koja međutim nije ni nakon 96 sati izazvala uginuće.

Dobiveni rezultati pokazuju, da se u petroleterkom ekstraktu, dakle u nepolarnom otapalu, nalazi toksična supstanca. Vrlo je vjerojatno, da bi koncentracija toksičnog principa u polarnim otapalima, kloroform, etilni i metilni alkohol, bila veća. Koncentraciju toksične supstance ne znamo, no pretpostavljamo, da se radi o supstanci relativno male molekularne mase. U slijedećim našim istraživanjima za ekstrakciju toksina poslužiti ćemo se nekim polarnim otapalom. Ekstrakcijom dobivene polarne faze s kiselinom odnosno lužinom dobit ćemo odgovarajuće kisele odnosno lužnate frakcije, pa ćemo tada pokušati nekom kromatografskom metodom, tankoslojnom, kolonskom ili plinskom, dobiti više informacija o kemijskim karakteristikama toksične supstance. Netopivi, proteinski dio alga, nakon ekstrakcije prevest ćemo u topivu fazu nekom pufernom otopinom te kromatografskim ili elektroforetskim metodama nastojati dobiti odgovarajuće informacije. U svakom slučaju, izolirane supstance morat će se biopokusom istražiti na njihovu toksičnost.

### ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja pokazali su da se u petroleterkom ekstraktu *Microcystis sp.* i *Aphanizomenon sp.* nalazi toksična supstanca koja je u količini od 310 mg/kg djelovala letalno na šaranski mlad. Toksični princip u ekstraktu vrlo je vjerojatno nepolarna supstanca male molekularne mase, što će u jednom od narednih istraživanja morati biti dokazano.

## SUMMARY

### Toxicity of petrolether extract of *Microcystis* sp. and *Aphanizomenon* sp. on young carps

As the results of the investigations have shown, in the petrolether extract of *Microcystis* sp. and *Aphanizomenon* sp. there is a toxic substance which in the quantity of 310 mg/kg (intraperitoneally) lethally worked on young carps. Toxic principle in the extract is very probably a unipolar substance of small molecular weight, what must be proved.

## LITERATURA

1. Alam M., Shimizu Y., Kawa M., Sasner J. (1978). L. C. Gorham P. R., Garmichael W. W. (1979): Phycotoxins from blue — green Algae IUPAC, 4th Int. Symp. on Mycotoxins and Phycotoxins, Lausanne, Suisse, Aug. 29. — 31. 1979.
2. Bishop T., Anet J., Gorham P. R. (1959). Can J. Biochem, Biochem. Physiol. 37, 453. L. C. Kadis S., Ciegler A., Aji S. (1971): Microbial Toxins, Vol. VII. Algal and Fungal Toxins. N. Y. Academic Press.
3. Devlin J. P., Edwards O. E., Gorham P. R., Hunter N. R., Pike R. K., Stavric B. (1977). L. C. 1.
4. Gorham P. R. (1960) Can. Vet. J. 1, 235, L. C. 2.
5. Kato Y., Scheuer J. (1976). Pure Appl. Chem. 48, 29—33. L. C. 1.
6. Louw P. G. J. (1950): S. African Ind. Chem. 4, 62. L. C. 2.