

O značenju miko i algalnih toksina na području uzgoja riba u ribnjacima

B. Ržaničanin, I. Balzer, T. Treer

Sposobnost plijesni da produciraju toksične metabolite poznata je već od početka ovog stoljeća. Nastojanje da se dođe do antibiotika nije začudo rezultiralo i u tome da se izoliraju i mikotoksini. Zadnjih tridesetak godina mnogo je pisano o bolestima životinja nepoznate etiologije, koje su bile izazvane hranom zagađenom plijesnima. Značenje i važnost mikotoksina bilo je dugo vremena izbjeglo pažnji većeg broja istraživača, iako je ergotizam, mikotoksikoza uzrokovana gljivicom **Claviceps purpurea**, bila već odavno poznata. Mikotoksini i mikotoksikoza, nema tome dugo, bili su predmet istraživanja samo relativno uskog kruga stručnjaka. Do bitne promjene sagledavanja te problematike dolazi tek 1961. godine, kada su istraživači »Central Veterinary Laboratory — Weybridge« uspjeli izolirati plijesan **Aspergillus flavus** i njegov kancerogeni metabolit alfatoksin (Sargeant et al. 1961, Allcroft et al. 1961). Istraživanja su pokazala da je taj toksin, koji je bio izoliran iz arašida i uzrokovao ugibanje stotinjak tisuća purana u Engleskoj »turkey X disease« ekstremno karcinogen, pa su ti rezultati privukli pažnju zdravstvenih organizacija, proizvođača hrane i drugih. U istraživanje mikotoksina investirana su ogromna materijalna sredstva. Determiniran je veliki broj metabolita, ali se indentificira još uvijek čitav niz novih, pa bez obzira na to, što je već učinjeno, može se kazati, da »era mikotoksina« tek započinje.

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

MIKOTOKSINI

U nas se relativno mnogo radi na determinaciji i kvantifikaciji mikotoksina u ljudskoj i stočnoj hrani. Mnogo je rađeno na određivanju aflatoksina B₁. Aflatoksini, posebno B₁ vrlo su kancerogene supstance i u mnogim zemljama njihova prisutnost u hrani nije dozvoljena ni u najmanjim količinama. Već i najmanje koncentracije aflatoksina B₁ toksične su za pastvrve. Stvara se ponajprije hematoma, koji rezultira u kanceru jetre.

Osjetljivost pastvrve na aflatoksin je tolika, da je na osnovu te reakcije izrađena metoda za njegovo kvantitativno određivanje. Između 1950. — 1960. god. došlo je u Americi do epidemijskih razmjera pojave hepatoma u pastvrva. Ustanovljeno je da je uzrok tome bila pamučna sačma zagađena aflatoksinom (Sinnhuber et al. 1965). Koncentracije od 4,0 ppb (4 mg/tona) aflatoksina B₁ u hrani, izazivaju u pastvrva stvaranje tumora nakon 12 mjeseci, a koncentracije od samo 0,8 ppb nakon 20 mjeseci. Istraživanja na laboratorijskim životinjama u nas u tome pravcu još nisu vršena, ali je proveden relativno velik broj kvantitativnog određivanja aflatoksina posebno u stočnoj hrani. Mužić i sur. (1976.), Klemencić i sur. (1976.) utvrdili su da su svi analizirani uzorci arašidne sačme uvoz iz Brazilije i Indije bili zagađeni relativno velikim koncentracijama (do 3,1 ppm) aflatoksina B₁, tako da je uvoz te sirovine za stočnu hranu prestao. Balzer i sur. (1976.) nisu uspjeli determinirati aflatoksin B₁ ni u jednom analiziranom uzorku kukuruza pa ni u drugim agrikulturnim produktima proizvedenim u nas. Čini se, da aflatoksiko-

genih kultura u nas za sada nema, ali ne isključuje-
mo mogućnost, da će se one stvoriti.

Ohratoksin i hepatotoksi i nefrotoksi metaboliti plijesni **Aspergillus ochraceus** i **Penicillium viridicatum**. Balzer i sur. (1976.) našli su da je 26% uzoraka kukuruza urod 1975. godine, bilo zaraženo sa ohratoksinom A, te da se njegova koncentracija kretala od 0,045—5,1 ppm. Pretežno patološke promjene u pokusnih životinja javljale su se u nekrozi bubrega, oštećenju renalnih tubula i nekrozi jetrenih stanica. Obzirom na veliku učestalost kontaminacije kukuruza, ohratoksin A bi mogao imati značenje i u patologiji riba.

Zearalenon, F-2 toksin, je metabolit **F. roseum (graminearum)**, **F. tricinctum**, **F. moniliforme** i drugih. Kod životinja stvara sindrom hiperestrogenizma koji se očituje prvenstveno na genitalnom traktu; otečena i edematozna vulva; u težim slučajevima dolazi do vaginalnog i rektalnog prolapsusa; neplodnosti i smanjenom broju mladunčadi u leglu; kod muških životinja javljaju se feminizirajući efekti sa atrofijama testisa i povećanjem mamarnih glandula. Bogdanić i dr. (1976.) našli su u uzorku kukuruza (1974. god.) 1,0—200 ppm zearalenona. Ta godina bila je neobično vlažna. Slijedeće godine učestalost zearalenona u kontaminaciji kukuruza bila je znatno niža, 2,6%, maksimalne koncentracije 5,1 ppm.

Grupu mikotoksina koji izazivaju inflamaciju i nekroze na koži štakora odnosno šarana ubrajamo u skin irritating factor. Bogdanić i dr. (1976.) našli su 8,3 posto uzoraka kukuruza kontaminiranog tim faktorima. Njihova je koncentracija iznosila 0,5—5,0 ppm. Pretežni dio tih mikotoksina čini trihoteceni. Koncentracija jednog od tih toksina, T-2 toksina, u koncentraciji od 4 ppm signifikantno djeluje na smanjeni prirast pilića. Wyatt i sur. (1973.) smatraju da je oštećenje probavnog trakta jedan od primarnih efekata djelovanja toksina T-2 i da je taj efekat utjecao na smanjenje utroška hrane.

Osim navedenih mikotoksina postoji još čitav niz drugih. To su: »refusal i emesis faktori«, rubratoksini, sterigmatocistini, citrinin, aspergilična kiselina, kojična kiselina, diacetooksiscirpenol i drugi.

ALGOTOKSINI

Na determinaciji algalnih toksina rađeno je relativno malo. Bez sumnje, taj rad nije tako privlačan, i to vjerojatno zbog toga, što su ti toksini manje opasni za toplokrvne životinje. Čovjek i životinja dolaze u kontakt sa njima samo preko riba i školjki. Algalni toksini trebalo bi da pobude mnogo veći interes s obzirom na relativno veliku produkciju riba kao i na gubitke koje oni mogu izazvati. Ima ozbiljnih indicija koje ukazuju na pojavu algalnih toksina u slatkovodnom ribarstvu u nas.

Toksične alge nalazimo u tri glavne taksonomične grupe: **Pyrophyta**, **chrysophyta** i **Cyanophyta**. Od 50 rodova i 250 vrsta slatkovodnih modro-zelenih algi, smatra se, da šest rodova proizvodi toksine. Među

cyanophyceama najintenzivniji proizvođači toksina jesu: **Microcystis aeruginosa**, **Anabaena flos aquae** i **Aphanizomenon flos aquae**.

Toksini, izgleda da se stvaraju upravo za vrijeme »cvjetanja« ribnjaka. To su endotoksini topivi u vodi, a oslobađaju se iz stanica nekim vanjskim utjecajima koji mijenjaju permeabilnost stanične membrane. Elektroforetske su studije pokazale da toksin **Microcystis aeruginosae** ima peptidnu strukturu. Njegova toksičnost iznosi 0,5 mg/kg tjelesne težine miša. (J. H. Gentile — 1971). O farmakološkoj aktivnosti tih toksina nema nekih sistematskih studija. Toksini izazivaju kod laboratorijskih životinja gubitak ravnoteže i grčeve. Jetra su natečena, reduciran periferni dovod krvi. Smrt nastupa radi pomanjkanja kisika, pa izgleda da je povod smrti neposredno djelovanje toksina na respiratorno mišićje. Siripenko i dr. (1976.) uspjeli su izolirati iz modrozelenih algi toksične pomoću ionskih izmjenjivača. Ustanovljeno je, da su najveće koncentracije toksina nađene u uzorku koji je po algološkom sastavu imao dominirajući broj **Microcystis aeruginosa**. Toksični agensi izdvojeni iz tog uzorka u koncentracijama od 0,25 i 0,072 ppm nakon 4 sata od implikacije toksina, prouzrokovali su 100% ugibanje dafnia a kod koncentracije od 0.0003 i 0.000005 ppm ugibanje je nastupilo nakon 48 sati. Klinička slika bijelih miševa koji su primili letalnu dozu, karakterizirana je bila dubokom depresijom životinja, paralizom muskularure i prestanka disanja. Patološko-anatomska i histološko-histokemijska istraživanja pokazale su hematurije. Unutrašnji organi bili su ispunjeni tekućinama. Struktura je parenhimatoznih organa pokazala degenerativne promjene.

Istraživanja koja su provedena u nas (Debeljak 1969., 1970) prikazuju da postoji velika vjerojatnost da i u našim ribnjacima ima toksikogenih sojeva algi. Utvrđeno je prisustvo **Cyanophyta**, **Euglenophyta**, **Pyrophyta**, **Chrysophyta** i **Chlorophyta**. Povećanjem doze gnojiva došlo je u ribnjacima i do povećanja količine planktona za 160%, a posebno Cyanophyta.

Metodika određivanja mikotoksina, ona koja se koristi za njihovu kvantifikaciju i determinaciju je relativno jednostavna i može se provesti skoro uobičajenom laboratorijskom opremom. Kvantifikacija se mikotoksina vrši na osnovu intenziteta fluorescencije koju daju mikotoksini pod utjecajem ultravioletnog svjetla. Ta se determinacija provodi tankoslojnom kromatografijom na ploči sa silika genom. Osjetljivost je metode relativno velika, i za neke mikotoksine iznosi 1 ppb.

Metodika kvantifikacije i determinacije algalnih toksina nije razrađena kao što je to slučaj kod mikotoksina. O njima o njihovoj kemijskoj strukturi pa i o njihovom toksikološkom djelovanju znamo vrlo malo. Jedinu pouzdanu način njihovog kvantificiranja jest biološki test, što je dugotrajna i često puta nedovoljno pouzdana metoda. Na osnovu dosadašnjih istraživačkih rezultata, te na osnovu nekih indicija koji su algotoksini potencijalni kontaminanti od velikog značenja za ribarsku praksu. Potrebno je uložiti mnogo napora da se oni determiniraju i odredi intenzitet njihovog patološkog djelovanja.

Iznesen je kratak pregled onih mikotoksina koji se najčešće javljaju u stočnoj i ljudskoj hrani. Opisani su sindromi koje oni izazivaju u životinjama. Dani su i rezultati o njihovim koncentracijama i učestalosti u poljoprivrednim kulturama. Na istraživanjima na algotoksinama nađeno je relativno malo i za sada se raspolaže sa malim brojem rezultata. S obzirom da je toksičnost nekih algi, posebno za vrijeme cvjetanja ribnjaka dokazana, potrebno je da se ulože odgovarajuća sredstva i naponi za njihovu determinaciju i da se odredi osjetljivost pojedinih vrsta riba na pojedine algotoksine. Podvučeno je da postoje neke indicije na osnovu kojih bi se moglo zaključiti, da i u našim ribnjacima ima toksikogenih kultura algi.

SUMMARY

The Importance of Myco and Algal Toxins in Fish Pond Rearing

A brief survey of frequent mycotoxins found in the animal and human food has been given here. The syndromes that mycotoxins cause in animals, as well as the concentration and frequency of them on agricultural plants are presented.

Comparatively small number of results has been offered in the algal toxins research. Taking into consideration the toxicity of some algae, especially during the pond blooming season, it will be necessary to employ definite means and efforts in order to determine the sensitivity of some fish species to some algal toxins.

There have been indications which suggest the existence of algal toxicogenic cultures in the ponds of Yugoslavia.

1. Allcroft R., R. B. A. Carnaghan, K. Sargeant, J. O. Kelly (1961): A toxic factor in brazilian groundnut meal. *Vet. Records* 73, 428.
2. Balzer I., Š. Mužić, Č. Bogdanić (1976): Natural contamination of corn with mycotoxins in Yugoslavia. *III International Symposium I. U. P. A. C. on mycotoxins in foodstuffs — Paris.*
3. Bogdanić Č., S. Mužić, I. Balzer (1976): Mikotoksini u stočnoj hrani. *Radovi Polj. Fak., Sarajevo*, 519—530.
4. Bogdanić Č., S. Mužić, S. Pepeljnjak, I. Balzer (1976): Neki faktori u kukuruzu koji izazivaju iritaciju kože u albino štakora i šarana. *Veterinaria, Sarajevo*, 25, 1—2, 91—95.
5. Debeljak Lj. (1969): Kvalitativni sastav fitoplanktona u ribnjacima i njegova ekološka uvjetovanost. *Ribarstvo Jugoslavije*, 4, 78—83.
6. Debeljak Lj. (1970): Djelovanje mineralnih gnojiva na sezonske promjene fitoplanktona u pokusnim ribnjacima Draganići. *Ribarstvo Jugoslavije* 6, 122—125.
7. Gentile J. H. (1971): Blue-green and algal toxins. *Ref. Kadis S., A. Ciegler, S. T. Ajl (1971): Microbial toxins, vol, VII 27—63. Academic Press.*
8. Klemenc N., P. Vospernik, J. Žust, A. Vengušt, N. Peševšek (1976): Metode za mikotoksikološko ispitivanje stočne hrane. *Vet. glasnik, XXX, 1, 45—52.*
9. Mužić S., Č. Bogdanić, I. Balzer (1976): Određivanje toksičkih metabolita nekih plijesni u stočnoj hrani. *Radovi Polj. Fak., Sarajevo*, 531—538.
10. Sargeant K., A. Sheridan, J. O. Kelly, R. B. A. Carnaghan (1961): Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 192, 1906—1907.
11. Sinnhuber R. O., J. H. Walles, R. H. Engelbrecht, D. E. Amend, J. L. Ayres, W. F. Ashton, W. Kray (1965): *Federation Proc.* 24. 627. *Ref. A. Ciegler, Kadis S., Ajl. S. 1971). Microbial toxins Vol. VII, Academic Press 4—155.*
12. Siripenko L. A., J. A. Kirpenko, L. F. Lukina, O. V. Kovalenko, L. M. Zimovec (1976): O toksičnosti sineezelnih vodoroslji — vzbuditelei cvetenia vodi. *Gidrobiol. Ž. XX, 4, 22—28.*
13. Wyatt R. D., P. B. Hamilton, H. R. Burmeister (1973): The effects of T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Sci.* 52, 1953—1959.

