

ISPITIVANJE ADSORPCIJSKE SPOSOBNOSTI TOXI-FIX[®]-A PREMA FUZARIJSKIM MIKOTOKSINIMA

TESTING ADSORPTION EFFICIENCY OF TOXI-FIX[®] TO CONTROL FUSARIUM MYCOTOXINS

M. Mitak, V. Karačić

Izvorni znanstveni članak
UDK: 636.085.65.19.
Primljeno: 14. travanj 2001.

SAŽETAK

U radu su prikazani rezultati in vitro ispitivanja učinkovitosti fiksatora mikotoksina na neke Fuzarijske mikotoksine. Laboratorijski sintetizirani mikotoksini dodani su kukuruznoj prekrupi u koncentracijama zearalenon 400ppb, T-2 toksin 200ppb, i deoksinivalenol 500ppb. U kontaminiranu kukuruznu prekrupu dodan je fiksator mikotoksina u koncentraciji 3g/kg prekrupe, te analizirano na prisutnost mikotoksina standardnim uobičajenim metodama. Ispitivani fiksator u veoma kratkom roku veže prisutne mikotoksine, čija je koncentracija nakon 24 sata ispod detekcijskog limita korištenih metoda.

Zbog mogućnosti kontaminacije krmiva velikim brojem različitih mikotoksina, nameće se nužnost uporabe nekog od fiksatora mikotoksina u krmnim smjesama. Prednost imaju adsorbensi koji su specifični, sigurni za uporabu, ne povećavaju znatno troškove proizvodnje te se lako primjenjuju u proizvodnji krmnih smjesa.

UVOD

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni strukturalno različitih oblika, nastali tijekom njihova rasta, uz uvjete optimalne vlage, temperature, pH ili uz zajednički rast s drugim bakterijama i plijesnima.

Za vrijeme razmnožavanja, plijesni luče produkte svojeg metabolizma u supstrat. Do danas je otkriveno oko 300 vrsta plijesni koje proizvode preko 1000 raznih mikotoksina i njihovih metabolita (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

Neke plijesni parazitiraju na biljkama za vrijeme rasta u polju te uzrokuje razne biljne bolesti. Najčešće su to pripadnici rodova *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* koji tijekom svog rasta i razmnožavanja tvore mikotoksine.

Tijekom skladištenja žitarica i krmiva mogu se razmnožavati skladišne plijesni vrsta *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* i druge, te tvoriti druge vrste mikotoksina (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

Mikotoksini u životinja izazivaju otrovanja (mikotoksikoze), i pokazuju veliku raznolikost štetnih bioloških učinaka. Općenito uzevši imaju hepatotoksično, nefrotoksično, kancerogeno, dermonekrotično, neurotoksično, imunosupresijsko i estrogeno djelovanje (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

Dr. sc. Mario Mitak dr. vet. med, viši asistent, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Savska c. 143; dr. sc. Vesejko Karačić dr. vet. med, "Poljoprerađa" d.d. Zagreb, Remetinečka c. 77, Hrvatska - Croatia.

Klimatske prilike u našim područjima pogoduju rastu plijesni u polju te je kontaminacija žitarica "plijesnima polja" u našem području redovita pojava, pogotovo u kišnim godinama. U dosadašnjim istraživanjima dokazano je da je u nas za kišnih godina kontaminirano od 20%, Munk i Topolko, (1978.) do čak 82%, Kralj i sur., (1988.) uzoraka kukuruza ali i tijekom sušnih godina, Mitak, (1993.). Toksini plijesni roda *Fusarium* su najveći problem jer se učestalo javljaju kao kontaminanti različitih žitarica ili drugih krmiva, Pavičić i sur., (1999.); Mitak i sur., (2000.).

U pokušaju umanjivanja problema mikotoksi-koza primjenjuju se mnogi postupci od fizikalnih i kemijskih do mikrobioloških, s manjim ili većim uspjehom. U ovom je radu in vitro određena uspješnost vezanja nekih Fuzarijskih mikotoksina jednim novim pripravkom na našem tržištu.

MATERIJAL I METODE RADA

Mikotoksini

Benettova tekuća hranjiva podloga za uzgoj toksogenih sojeva plijesni, Hidy i sur., (1977.) kontaminirana je plijesnima *Fusarium* spp. te inkubirana pri 27°C tijekom 7 dana, a nakon toga 14 dana pri 5°C. Nakon uklanjanja micelijarne mase podloga je sušena pri 55°C tijekom 24 sata, ekstrakt podloge analiziran je na sadržaj mikotoksina. Metode analiza su: Zearalenon, Ochratoksin i Aflatoksin (TLC), Munk, (1977.); Balcer i sur., (1978.) T-2 toksin (HPLC) Erlich i Lee, (1984.) i DON (ELISA), komercijalni kit tvrtke "Tecna R & D" Diagnostics - Biotechnology, Trst, Italija. Sadržaj mikotoksina prikazan je na tablici 1.

Adsorptivno sredstvo

TOXI FIX® je suhi sipki prah sivkaste boje, nije elektrostatičan, bez mirisa i okusa, nije topiv u vodi te nešto higroskopian. U krmne smjese se umiješa lako u koncentraciji od 2 do 4 kg/t krmne mjese. Pripravak proizvodi i distribuira "Poljoprerada" d.d. Zagreb, a predstavlja mješavinu minerala koju zastupaju zeoliti, kremen, glinenac i drugo, uglavnom aluminijski silikat koji karakterizira velika sposobnost primanja ili odavanja vode, kao i izmjena pojedinih kationa bez veće promjene strukture molekule.

Tablica 1. Sadržaj mikotoksina u koncentriranoj hranjivoj podlozi i nakon razrjeđivanja

Table 1. The mycotoxin content in concentrated medium and after dilution

Mikotoksini Mycotoxins	Početa koncentracija Initial concentration	Radne koncentracije Working concentration
Zearalenon i derivati	4.08 mg/kg	400 ppb
T-2 toksin	1.2 mg/kg	200 ppb
DON (deoksinivalenol)	5 mg/kg	500 ppb
Ochratoksin A	< 0.025 mg/kg	< 0.025 mg/kg
Aflatoksin B1	< 0.01 mg/kg	< 0.01 mg/kg

Priprema krmne smjese

Mikotoksini su dodani kukuruznoj prekrupi s kojom su razrijeđeni do koncentracije koja se češće nalazi u prirodi; konačne koncentracije toksina na kojima je ispitano djelovanje prikazane su na tablici 1. Urniješivanje fiksatora obavljeno je upotrebom vertikalne laboratorijske mješalice miješanjem kukuruzne prekrupe s mikotoksini kojima je dodan fiksator u propisanoj količini od 3 g. TOXI FIX®-a na 1 kg prekrupe.

Postupak

Na 25 g kuruzne prekrupe dodano je 100 ml otopine koja je sadržavala 0,35% HCl i 0,2% NaCl (pH=2,0), te inkubirano pri 37°C. Uzorci su analizirani na sadržaj mikotoksina nakon 5 minuta te nakon 24 sata, tako da je iz inkubirane smjese uzeto po 5 ml uzorka koji je profiltriran i podvrgnut analizama korištenim za određene mikotoksine.

REZULTATI I RASPRAVA

Mjerenje koncentracije mikotoksina obavljeno je za sva tri mikotoksina, a rezultati sposobnosti vezanja ispitivanog fiksatora mikotoksina u in vitro uvjetima prikazani su na tablici 2.

Tablica 2. Sposobnost vezanja fiksatora mikotoksina in vitro za fuzarijske mikotoksine

Table 2. Binding ability of mycotoxin fixative in vitro for fusarium mycotoxins

Vrijeme Time	TOXI FIX®	Zearalenon		T-2 toksin T-2 toxin		Deoksinivalenol Deoxynivalenol	
		5 min	-	0.33 ppm	0.36 ppm	200 ppb	200 ppb
5 min	+	0.32 ppm	120 ppb	200 ppb	100 ppb	410 ppb	< 150 ppb
24 sata	-	0.38 ppm	0,30 ppm	200 ppb	200 ppb	510 ppb	500 ppm
24 sata	+	0.30 ppm	< 100 ppb	200 ppb	neg.	480 ppb	< 150 ppb

Adsorptivna sposobnost ispitivanog fiksatora mikotoksina vidljiva iz rezultata veoma je učinkovita. U veoma kratkom vremenu došlo je do vezivanja velikog dijela prisutnih mikotoksina, čija se vrijednost nakon 24 sata spustila ispod detekcijskog limita korištenih metoda.

Nove tehnologije u proizvodnji i skladištenju žitarica (uzgoj kasnozrelih hibrida, uzgoj u gustom sklopu, visokorodne i osjetljive sorte i povećanje loma zbog grješaka u dosušivanju, skladištenju i preradi) stvaraju preduvjete za razvoj plijesni i posljedičnu tvorbu mikotoksina.

S obzirom na mnoštvo metaboličkih proizvoda plijesni i mnoštvo različitih mikotoksina nije jednostavno niti gospodarski isplativo utvrditi koji se mikotoksini nalaze u žitaricama i krmivima. Identificiranjem vrste plijesni i određivanjem ukupnog broja plijesni postoje samo orijentacijski parametri za eventualnu kontaminaciju mikotoksina, jer tijekom sušenja zrna žitarica ili njihove prerade može doći do gubitka vitalnih svojstava spora plijesni, dok mikotoksini kao termostabilni spojevi i dalje zaostaju u krmivima, lako postoje razrađene metode detekcije velikog broja mikotoksina one nisu u rutinskoj primjeni za sve mikotoksine. Iako su preventivne mjere primarne u saniranju problema mikotoksikoza, pružena mogućnost sanacije prisutnih mikotoksina može se iskoristiti zbog dobrobiti životinja i poboljšanja proizvodnih rezultata.

ZAKLJUČCI

TOXI FIX® se dobro homogenizira s kukuruznom prekrupom u količini od 3g/kg.

- TOXI FIX® neutralizira in vitro veliki dio mikotoksina veoma brzo nakon umiješavanja.

- Nakon 24 sata u uzorcima kukuruzne prekrupe više se ne mogu dokazati mikotoksini prisutni u uobičajenim koncentracijama. Zbog mogućnosti kontaminacije krmiva i krmnih smjesa velikim brojem različitih mikotoksina, bilo iz domaće proizvodnje ili iz uvoza, nameće se nužnost uporabe nekog od fiksatora mikotoksina u krmnim smjesama.

LITERATURA

- Balcer, I., Č. Bogdanić, S. Pepeljnjak (1978): Rapid thin layer chromatographic method for determining aflatoxin, ochratoxin A and zearalenone in corn. J. Ass. off. anal. chem. 61, 3.
- Erlich, K. C., L. S. LEE (1984): Mycotoxin in grain. J. Ass. off. anal. chem. 67. 963-967.
- Hidy, P. H., R. S. Baldwin, R. L. Greasham, C. L. Keith, J. R. McMullen (1977): Zearalenon and some derivatives production and biological activities. Ad. Appl. Mic. 22, 59-82.
- Kralj, M., Z. Biđin, Ankica Nemanič (1988.): Skupni prikaz sindroma otrovanja mikotoksina prema podacima iz literature s naročitim osvrtom na pojavu u peradi. Peradarstvo, 23, 215-265.
- Mitak, M. (1993.): Prirodna kontaminacija mikotoksinom zearalenonom i mogućnosti brzog dokazivanja u terenskim uvjetima. Vet. stanica 24, 139-148.
- Mitak, M., Tihomira Gojmerac, Perica Pavičić, S. Topolko (2000.): Nalaz zearalenona u krmivima i krmnim smjesama za svinje od 1990. do 1999. godine. Zbornik radova 2. hrvatski veterinarski kongres, Cavtat 10.-13.-10. 2000. 483 - 488.

7. Munk, Miroslava (1977.): Frekvencija i utjecaj mikotoksina na neke aditive u krmivima. Disertacija. Zagreb, Tehnološki fakultet.
8. Munk, M., S. Topolko (1978.): Ispitivanje frekvencije mikotoksina u krmivima. *Krmiva*, 20, 95-96.
9. Ožegović, L., S. Pepeljnjak (1995.): Mikotoksikoze. Školska knjiga, Zagreb.
10. Pavičić, Perica, Vlasta Brlek, Ankica Nemanić (1999.): Učestalost fuzarijskih mikotoksina u krmnim smjesama 1989. - 1998. *Krmiva* 41 (4) 183 - 189.

SUMMARY

The paper presents the results of in vitro tests of mycotoxin fixative efficiency to control some fusarium mycotoxins. Laboratory synthesized mycotoxins were added to maize grits in concentration zearalenone 400 ppb, T-2 toxin 200 ppb and deoxynivalenol 500 ppb. The concentration of 3 g/kg of mycotoxin fixative was added to contaminated maize grits and analyzed for the presence of mycotoxins by standard methods. The analyzed fixative in a very short time binds the present mycotoxins whose concentration after 24 hours is below detection limit of the method used.

Because of a possible contamination of feed with a great number of various mycotoxins there is a need for using some mycotoxin fixatives in feed mixtures. Adsorbents which are specific, safe to use, do not considerably increase the production costs and are easy to apply in feed mixture production have the advantage.