

HIGIENA ŻYWNOŚCI ZWIERZĘCEGO POCHODZENIA

STANISŁAW J. ZALESKI, ELŻBIETA DACZKOWSKA, RYSZARD TERESZKIEWICZ,
KRZYSZTOF KONIECZNY, TADEUSZ KELAR

Badania nad wykrywaniem aflatoksyny B₁ w mączkach rybnych stabilizowanych santoquinem

Z Zakładu Mikrobiologii Żywności AR w Szczecinie,
Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Szczecinie

Obecność aflatoksyn w paszach w stężeniach śladowych, nawet na poziomie kilku ppb, może powodować znaczne straty hodowlane niektórych gatunków zwierząt (1, 7, 11). W związku z tym możliwość wykrywania obecności aflatoksyny w tych stężeniach ma podstawowe znaczenie.

Znanych jest wiele metod ilościowego oznaczenia aflatoksyny B₁ (2, 5, 6, 8, 10); w Polsce stosuje się dwie metody. Metoda opracowana przez Juszkiewicza i Stefaniakową (4) polega na odtłuszczeniu prób eterem naftowym, oczyszczeniu na kolumnie, eluowaniu aflatoksyn mieszaniną metanolu w chloroformie i badaniu otrzymanych ekstraktów metodą chromatografii cienkowarstwowej.

Podstawy metody odwoławczej opracował Strzelecki (9), a wykonanie analizy polega na shomogenizowaniu próby do badań celitu i wodnego roztworu acetonu, oczyszczeniu ekstraktów na kolumnie i eluowaniu aflatoksyny chloroformem. Obecność aflatoksyny można wykazać chromatografią kolumnkową lub cienkowarstwową. Przy analizie drogą chromatografii cienkowarstwowej wykonuje się próby potwierdzające przez nawarstwienie plam 5% H₂SO₄, przy chromatografii kolumnkowej możliwość ta odpada.

W niepublikowanych badaniach wykonanych w Zakładzie Mikrobiologii Żywności AR w Szczecinie wykazano, że przy zastosowaniu obu tych metod z łatwością wykrywa się aflatoksyny w stężeniach kilku ppb w mączkach rybnych wtedy, gdy nie są one stabilizowane BHA (3). W przypadku mączek stabilizowanych BHA otrzymano wyniki, które uznano za fałszywie dodatnie, ponieważ przy badaniu metodą kolumnkową prób nie zawierających aflatoksyny B₁ ekstrakty fluoryzowały. Te same próby rozwinęte na chromatogramach dawały plamy o R_f charakterystycznym dla aflatoksyny B₁, ale w teście potwierdzającym z H₂SO₄ nie otrzymano wyniku dodatniego.

Zdarzające się na tle oksydacji tłuszczów wypadki samozapłonów mączki rybnej na lądzie i morzu stworzyły konieczność jej stabilizowania i spośród znanych antyutleniaczy dobrano w Polsce santoquin. Celem badań własnych było więc sprawdzenie obu stosowanych w naszym

kraju metod wykrywania aflatoksyny B₁ w mączkach rybnych, do których dodano santoquinu.

Materiał i metody

Do badań użyto mączkę rybną produkcji PPD i UR „Gryf” w Szczecinie. Zakład ten produkuje mączkę rybną bez dodatku antyoksydanta. Wstępne badania wykazały, że pobrana mączka była wolna od aflatoksyny B₁.

Użyte w badaniach wzorce aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂ pochodziły z Nationale Institute of Public Health w Bilthoven, Holandia, a santoquin otrzymano z Morskiego Instytutu Rybackiego w Gdyni. Dla uzyskania właściwego stężenia antyutleniacza w mączce rybnej rozpuszczano go w chloroformie i w tej postaci wprowadzano do prób w ilości koniecznej dla uzyskania stężenia 0,05% w mączce rybnej.

Materiał do badań przygotowywano zgodnie ze sposobem podanym w metodach Strzeleckiego (9) i Juszkiewicza oraz Stefaniakowej (4). Ze względu na brak możliwości wykonania próby potwierdzającej przy analizie metodą kolumnkową wg Strzeleckiego (9), badania te prowadzono metodą chromatografii cienkowarstwowej.

Do wywoływania chromatogramów używano płytek szklanych z naniesionymi żelami G lub H (wg Stahla firmy Merck) oraz płytek aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym (firmy Kevalia).

Do rozwijania chromatogramów używano dwu faz ruchomych:

1. HEBCA — heksan : eter naftowy : benzen : chloroform : aceton (1 : 1 : 1 : 6 : 1),
2. metanol : chloroform (3 : 97).

Fluorescencję badanych ekstraktów porównywano z fluorescencją wzorca i obliczano ilość aflatoksyny w próbce korzystając ze wzoru:

$$ug = \frac{S \cdot Y \cdot V}{X}$$

gdzie:

- s — ilość μ l wzorca aflatoksyny i intensywności świecenia zbliżonej do intensywności świecenia ekstraktu badanej próby
- v — końcowa objętość rozpuszczonego osadu (ml)
- y — użyte stężenie aflatoksyny (standard) μ g/ml
- x — ilość μ l naniesionego ekstraktu badanej próby odpowiadająca intensywności świecenia określonego standardowi s.

W badaniach stosowano test potwierdzający na obecność aflatoksyn, który wykonywano przez nawarstwienie fluoryzujących plam 5% H₂SO₄. W przypadku wyniku dodatniego plamy aflatoksyn B₁ i B₂ zmieniały barwę na zieloną, a aflatoksyn G₁ i G₂ na żółto-zieloną.

Wyniki i omówienie

Wyniki otrzymane metodą Strzeleckiego (9). Po naniesieniu na płytki ekstraktów prób mączki rybnej, do której dodano wzorzec aflatoksyny

ny B₁ w ilości 5 ppb, otrzymano na chromatogramach obraz w postaci niebiesko fluoryzujących plam o Rf=0,40. Wynik testu potwierdzającego był pozytywny.

Po naniesieniu na płytki ekstraktów prób mączki rybnej wolnej od aflatoksyny B₁, ale zawierającej santoquin otrzymano obraz w postaci dwu niebiesko fluoryzujących plam o Rf=0,40 i 0,70. Test potwierdzający obu tych plam był negatywny.

W przypadku chromatogramów ekstraktów uzyskanych z mączki rybnej z dodatkiem wzorca aflatoksyny B₁ i santoquinu otrzymano dwie plamy fluoryzujące o Rf=0,40 i 0,70. Plama o Rf=0,70 stale dawała wynik negatywny w teście potwierdzającym. Test potwierdzający plamy o Rf=0,40 był pozytywny dopiero wtedy, gdy w próbie ilość aflatoksyny była równa lub wyższa niż 70 ppb.

Wyniki otrzymane metodą Juszkiewicza i Stefaniakowej (4). Ekstrakty prób mączki rybnej z dodatkiem aflatoksyny B₁ dawały na chromatogramach obraz w postaci niebiesko fluoryzujących smug. Wynik testu potwierdzającego był pozytywny. Odczyt półilościowy był niemożliwy ze względu na znaczne trudności przy porównywaniu smug z plamami standardów naniesionych w różnych ilościach. W przypadku analizy mączki rybnej, do której wprowadzono równocześnie standardy aflatoksyny B₁, B₂, G₁ i G₂, analiza jakościowa i półilościowa była niemożliwa ze względu na nieznaczne różnice Rf poszczególnych aflatoksyn i nakładanie się smug.

Ekstrakty prób mączki rybnej z dodatkiem samego santoquinu nie dawały na chromatogramach żadnego obrazu świadczącego o obecności antyoksydantu. Ekstrakty prób mączki rybnej z dodatkiem aflatoksyny B₁ i santoquinu dawały na chromatogramach obraz w postaci niebiesko fluoryzujących smug o Rf charakterystycznym dla aflatoksyny B₁. Wyniki testu potwierdzającego były pozytywne. Nie stwierdzono żadnych plam świadczących o obecności santoquinu.

Wyniki otrzymane metodą własną.

W związku z brakiem możliwości przeprowadzenia analizy półilościowej przy zastosowaniu metody Juszkiewicza i Stefaniakowej (4) oraz uzyskaniu niewłaściwych wyników przy metodzie Strzeleckiego (9) opracowano metodę własną, która jest połączeniem obu powyższych metod.

Etapy metody własnej:

1. Odtłuszczenie prób mączki rybnej w aparacie Soxhleta przez 8 h w temperaturze 90°C,
2. Suszenie odtłuszczonych prób w temperaturze 65°C przez 1 h,
3. Ekstrahowanie prób mączki rybnej mieszaniną chloroformu z wodą (50:25) przez wstrząsanie w czasie 1 h,
4. Oczyszczanie ekstraktu na kolumnie wypełnionej bezwodnym siarczanem sodowym i żelem krzemionkowym przez przemywanie kolumny 150 ml eteru etylowego, a następnie uwalnianie od frakcji eterowej przy podciśnieniu.
5. Eluowanie aflatoksyny z kolumny 3% metanolem w chloroformie,
6. Odparowanie ekstraktu do sucha i rozpuszczenie osadu w chloroformie,
7. Namiesienie roztworu na płytki chromatograficzne z żelem krzemionkowym,
8. Wywołanie chromatogramów przy użyciu fazy ruchomej HEBCA,
9. Obliczanie ilości aflatoksyny jak w obu poprzednich metodach.

Stosując metodę własną z prób mączki rybnej z dodatkiem aflatoksyny B₁ otrzymano na chromatogramach obraz w postaci niebiesko fluoryzujących plam o Rf=0,35. Wynik testu potwierdzającego był pozytywny. Ekstrakty prób mączki rybnej z dodatkiem wzorców aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂ dawały obrazy w postaci plam o Rf odpowiednio 0,35; 0,29; 0,23 i 0,20. Wszystkie plamy dawały wyniki pozytywne w teście potwierdzającym.

Ekstrakty prób mączki rybnej z dodatkiem santoquinu nie dawały na chromatogramach żadnych plam świadczących o obecności antyoksydantu. Ekstrakty prób mączki rybnej z dodatkiem aflatoksyny B₁ i santoquinu dawały na chromatogramach obraz w postaci niebiesko fluoryzujących plam o Rf charakterystycznym dla aflatoksyny B₁, a ich test potwierdzający był pozytywny. Nie stwierdzono żadnych plam świadczących o obecności antyoksydantu.

Porównanie stosowanych metod. W celu porównania stosowanych metod określano ilość aflatoksyny B₁ wyprodukowanej przez aktywnie rosnący szczep *A. parasiticus* ATCC 15517. Zarodniki tego szczepu otrzymano po 72 h hodowli na podłożu Czapka, z którego plechę zmywano wodą destylowaną i 2,5 ml zawiesiny zawierającej $6,0 \times 10^6$ zarodników wprowadzano do

Tab. 1. Ilość wyprodukowanej aflatoksyny B₁ (w ppb) w próbach mączki rybnej bez dodatku santoquinu i z dodatkiem santoquinu

Dzień inkubacji	Metoda własna				Metoda zalecana do wykrywania aflatoksyny w paszach (9)			
	Bez dodatku santoquinu	Test z 5% H ₂ SO ₄	Z dodatkiem santoquinu	Test z 5% H ₂ SO ₄	Bez dodatku santoquinu	Test z 5% H ₂ SO ₄	Z dodatkiem santoquinu	Test z 5% H ₂ SO ₄
2	—	—	—	—	—	—	48,0	—
3	—	—	—	—	—	—	48,0	—
5	—	—	—	—	—	—	48,0	—
6	8,0	+	8,0	+	2,4	+	48,0	—
7	48,0	+	48,0	+	10,0	+	52,8	—
8	48,0	+	120,0	+	24,0	+	60,0	—
9	112,0	+	256,0	+	60,0	+	120,0	+
10	64,0	+	80,0	+	67,2	+	125,0	+
15	64,0	+	80,0	+	120,0	+	240,0	+

25 g mączki rybnej. Próby inkubowano przez 15 dni w temperaturze 37°C. Codziennie do każdej próby wprowadzano po 1 ml wody destylowanej w celu utrzymania wilgotności prób na właściwym poziomie.

W tab. 1 przedstawiono wyniki uzyskane metodą własną i metodą Strzeleckiego (9). Wykonano również badania metodą Juskiewiczza i Stefaniakowej (4), ale tych wyników w tab. 1 nie ujęto, ponieważ jak wspomniano wyżej, półilościowe określenie aflatoksyny B₁ było niemożliwe.

Wyniki badań przeprowadzonych metodą Strzeleckiego (9) potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że santonin odkłada się na chromatogramach na tej samej wysokości co aflatoksyny B₁. Oceniając wynik na podstawie samej fluorescencji plam ilość aflatoksyny B₁ począwszy od 2 do 6 dnia włącznie kształtowała się w próbach mączki rybnej z dodatkiem santoninu na poziomie 48 ppb, ale test potwierdzający wszystkich tych prób był negatywny. Negatywny wynik testu potwierdzającego utrzymywał się przy tej metodzie do 8 dnia hodowli włącznie, kiedy to fluorescencja plamy wskazywała na 60 ppb aflatoksyny B₁. Dopiero od 9 dnia test potwierdzający był dodatni, ale w tym czasie fluorescencję plamy określono na poziomie 120 ppb aflatoksyny B₁.

Wyniki analiz mączek rybnych bez dodatku santoninu wykonane obiema metodami oraz mączki rybnej z dodatkiem santoninu wykonanej metodą własną były zgodne. W szóstym dniu hodowli we wszystkich próbach wykazano pojawienie się aflatoksyny B₁, której fluoryzujące plamy dawały wynik dodatni w teście potwierdzającym. Wraz z wydłużeniem się czasu hodowli do 15 dnia ilość aflatoksyny B₁ narastała we wszystkich próbach, chociaż w próbie z dodatkiem santoninu była ona stale najwyższa.

Obserwacja brób mączki rybnej wykazała, że plecha w mączkach bez dodatku santoninu

i z jego dodatkiem pojawia się po tym samym czasie. Wykazane różnice w ilości produkowanej aflatoksyny B₁ w próbach z dodatkiem i bez dodatku santoninu wydają się wskazywać, że santonin stymuluje produkcję aflatoksyny B₁.

Piśmiennictwo

1. Bösenberg H.: Z. Lebensm. Unt.-Forsch. 151, 245, 1973.
2. Childs E. A., Ayres J. C., Kochler P. E.: J. Amer. Oil Chem. Soc. 47, 461, 1970.
3. Cygler J.: Badania nad występowaniem aflatoksyn w mączkach rybnych. Praca mgr. AR Szczecin, 1976.
4. Juskiewicz T., Stefaniakowa B.: Medycyna Wet. 2, 110, 1969.
5. Kiermeister F.: Z. Lebensm. Unt.-Forsch. 148, 331, 1972.
6. Lemieszek-Chodorowska K.: Roczn. PZH 27, 153, 1976.
7. Müller J. M.: Z. Lebensm. Unt.-Forsch. 151, 231, 1973.
8. Niskanen A., Lindroth S., Pensalo O.: Europ. J. appl. Microbiol. 2, 307, 1976.
9. Strzelecki L., Gąsiorowska H.: Zbl. Vet. Med. B 21, 395, 1974.
10. Toth L., Tauchman F., Leistner L.: Fleischwirtschaft 50, 349, 1970.
11. Wogan G. N.: Bacteriol. Rev. 30, 460, 1966.

Adres autora: prof. dr Stanisław J. Zaleski, ul. Canaletta 16 m. 5, Wrocław-Biskupin.

Залеский С. И., Дачковская Э., Терешкевич Р., Конечный К., Келар Е. — Исследования по обнаруживанию афлатоксина B₁ в рыбной муке, стабилизированной сantoninom.

Констатировали, что применяемые в Польше методы полуколичественного определения содержания афлатоксина B₁ в рыбной муке непригодны тогда, когда рыбная мука стабилизируется сantoninom. В связи с тем разработали собственный метод, являющийся соединением обоих применяемых методов. Полученные результаты показывают, что сantonин возбуждает производство афлатоксина B₁.

Zaleski S. J., Daczowska E., Tereszkievicz R., Konieczny K., Kelar T. — Examinations on the detection of aphiatoxin B₁ in fish flowers stabilized with santonin.

It was found that half-quantitative methods used in Poland for the determination of the content of aphiatoxin B₁ in fish flowers were unsuitable when fish flower was stabilized with santonin. Therefore the method based on the both tests was elaborated. The results indicate that santonin induces aphiatoxin B₁ production.

HOPKINSON M. F., HART L. T., SEGER C. L., LARSON A. D., FULTON R. W.: Zastosowanie odczynu immunodiffuzji do wykrywania przeciwciał dla wirusa biegunki w surowicach bydła. (An immunodiffusion test for detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies in bovine serum). Am. J. vet. Res. 40, 1189—1191, 1979 (8).

Opracowano odczyn immunodiffuzji do wykrywania przeciwciał w surowicy krów zakażonych wirusem biegunki bydła. Antygen przygotowywano na jednowarstwowej hodowli komórek GBK. Wyniki odczynu immunodiffuzji porównano z wynikami odczynu seroneutralizacji. Badania przeprowadzone z użyciem 164 surowic wykazały 100% zgodność odczynu immunodiffuzji i seroneutralizacji w przypadku gdy odczyn seroneutralizacji wypadł dodatnio w mianie 1:8. Dwaściecia trzy surowice, które reagowały w odczynie seroneutralizacji w mianie poniżej 2, dawały reakcję negatywną w odczynie immunodiffuzji.

G.

NERVIG R. M., GARRETT L. A.: Użycie furosemidu w celu uzyskania próbek moczu bydła do izolacji leptospir. (Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation). Am. J. vet. Res. 40, 1197—1200, 1979 (8).

Stosowanie furosemidu ułatwia uzyskanie próbek moczu bydła w celu izolacji leptospir. Furosemid stosowano w dawce 0,8 mg/kg wagi ciała u jałówek i w dawce 0,5 mg/kg wagi ciała u cieląt w iniekcji dożylniej. Średni okres jaki upływał od iniekcji preparatu do pierwszego oddania moczu wynosił u jałówek 19 minut, zaś okres między pierwszym i drugim oddaniem moczu 17 minut. U cieląt czas ten wynosił odpowiednio 12 i 10 minut. Obniżenie osmolalności moczu po zastosowaniu furosemidu przyczyniało się do zwiększenia przeżywalności leptospir. Leptospiry wyizolowano z moczu 72,7% krów zakażonych doświadczalnie, u których stosowano furosemid. W stosowanych dawkach furosemid nie jest toksyczny dla cieląt i krów.

G.