

NAUČNO DRUŠTVO SR BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XXIII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 10.

Urednik
NEDO ZEC,
redovni član Naučnog društva SR BiH



SARAJEVO

1964

ZLATKO FORŠEK i NADA AGANOVIĆ

**UTVRĐIVANJE B₁₂-AKTIVNIH SUPSTANCIJA (KOBAMIDA)
U EKSTRAKTIMA PLIJESNI KOMPARATIVNIM TESTOM SA
E. COLI 113-3, L. MONOCYTOGENES, B. CEREUS I CANDIDA sp.**

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka održanoj 21. VIII 1964. g.)

Metaboliti mnogih vrsta plijesni, koje su svrstane među uzročnike mikotoksikoza, pokazuju određeno stimulativno djelovanje na rast niza patogenih i apatogenih bakterija (1), kao i na fermentativnu aktivnost *L. monocytogenes* u suspenziji žumanjka (7). Kako se efekat ovih metabolita ispoljava u smislu stimulativnog djelovanja na oksido-redukcijske procese (2), postavlja se pitanje da li se u ekstraktima kultura plijesni nalaze određene supstancije koje mogu sudjelovati u tim procesima. U prvome redu, moglo bi se pretpostaviti da, osim već poznatih funga (*Streptomyces*, *Nocardia*), i neki drugi specijesi produciraju vitamin B₁₂, koji posjeduje sposobnost učestvovanja u oksido-redukcionim reakcijama ditio-grupa i nizu drugih biokemijskih procesa (9). Vitamin B₁₂ javlja se, međutim, i u formi većeg broja analoga koji stimuliraju rast mnogih mikroorganizama, dok kod ljudi i životinja samo cijanokobalamin pokazuje povoljno fiziološko djelovanje.

Ovim ispitivanjem pokušali smo, stoga, utvrditi da li se u produktima metabolizma nekih vrsta plijesni nalaze B₁₂-aktivne supstancije, kao i da li se njihovo djelovanje ispoljava jednako u slučaju *E. coli* 113-3 kao i nekih drugih test-mikroorganizama. Ova istraživanja bila bi još jedan prilog daljem razjašnjavanju uloge funga u patogenezi listerioze (7), pošto smo se kao jednim od test-mikroorganizama koristili i *L. monocytogenes*.

METODA RADA

Ispitivanja smo vršili metodom udubljenog agara, koja se koristi u određivanju vitamina B₁₂ pomoću mutanta *E. coli* 113-3 (4). Pored toga, služili smo se i bioautografskom metodom, takođe pomoću ovog test-mikroorganizma (10), ali smo u primjeni obje metode testiranje vršili uporedo i sa *L. monocytogenes*, *B. cereus* i *Candida* sp. U slučaju bioautografske metode za otapalo smo uzimali smjesu: n-butanola 80 ml, acid. acet. glaciale 20 ml, destilirane vode 20 ml,

kao i sekundarnog butanola 100 ml, destilirane vode 100 ml, amonijaka 0,8 ml, uz dodatak 0,25 ml 5 %-tne otopine KCN. Ascendentno kretanje otapala trajalo je 24—48 sati na sobnoj temperaturi i u zamračenoj prostoriji. Koncentrirane ekstrakte nanosili smo pomoću mikropipete u količini od 0,005 ml na trake filter-papira Whatman br. 1 širine 0,5 cm na udaljenosti od 3 cm od njegovog donjeg ruba. Trake filter-papira rezali smo tako da su na donjem i gornjem dijelu ostale međusobno vezane užim trakama, jer se na taj način osiguravalo jednakomjerno kretanje otapala. Poslije vađenja traka iz otapala i sušenja na sobnoj temperaturi 1 sat, stavljali smo ih pojedinačno na površinu agar-podloge inokulirane sa *E. coli* 113-3 i ostalim test-mikroorganizmima, a zatim inkubirali 16—18 sati na 30° C. Prije stavljanja na agar-podlogu, rezali smo trake filter-papira na dijelove prema veličini Petrijevih zdjela, a prilikom očitavanja rezultata, mjerili smo udaljenost zona rasta od tačke nanošenja ekstrakata.

Kulture plijesni na sjemenu ječma ekstrahirali smo destiliranom vodom u toku 24 sata, a dobivenu tekućinu filtrirali i uparavali do guste sirupaste mase u vodenoj kupelji. Ovoj masi dodavali smo toliko destilirane vode koliko je bilo potrebno da se može namijeti na filter-papir. Za ispitivanja metodom udubljenog agara pripremili smo 1—10 %-tnu otopinu ekstrakata plijesni: *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Acremonia atra*, *Alternaria* sp. Radi uporednih ispitivanja pripremali smo još ekstrakte čistog sjemena ječma, stelje peradi, sadržaja buraga goveda i goveđe jetre, po metodi koja se upotrebljava u određivanju vitamina B₁₂ (4).

REZULTATI

Metoda udubljenog agara

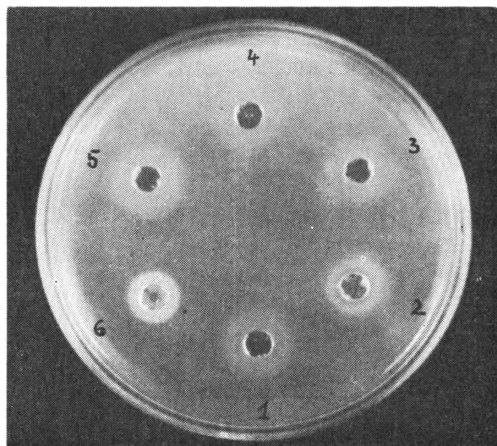
Ovom metodom utvrdili smo da ekstrakti svih ispitivanih kultura plijesni u 10 %-tnoj koncentraciji stimuliraju rast *E. coli* 113-3, kao i ostalih mikroorganizama, ali da ekstrakti nekih specijesa (*Rhizopus*, *Fusarium*) pokazuju pored djelovanja u pravcu stimuliranja i neznatno djelovanje u pravcu inhibiranja. Oko agar-udubina, u koje se kapaju ekstrakti, nastaju u slučaju svih test-mikroorganizama 2—3 zone rasta različitog intenziteta. *E. coli* 113-3 slabije reagira na ekstrakte plijesni (Tabela 1. i sl. 1, 2, 3, 4), te se već uz 5 %-tne koncentracije dobivaju zone rasta slabog intenziteta. Testiranjem još većih razrjeđenja ekstrakata ne ispoljavaju se zone stimulacije rasta u slučaju ovog test-organizma. Naprotiv, u slučaju *Candida* sp., *L. monocytogenes* i *B. cereus* zone rasta su dobro ispoljene testiranjem i 5 %-tnih koncentracija ekstrakata, a nešto slabije razrjeđenijim ekstraktima.

Ukapavanjem ekstrakata stelje peradi, sadržaja buraga goveda i goveđe jetre — u slučaju svih test-mikroorganizama ispoljavaju se zone rasta jačeg ili slabijeg intenziteta. U slučaju *B. cereus* ukapavanjem ekstrakata stelje peradi prvo se nalazi zona inhibicije, a oko nje zona stimulacije rasta.

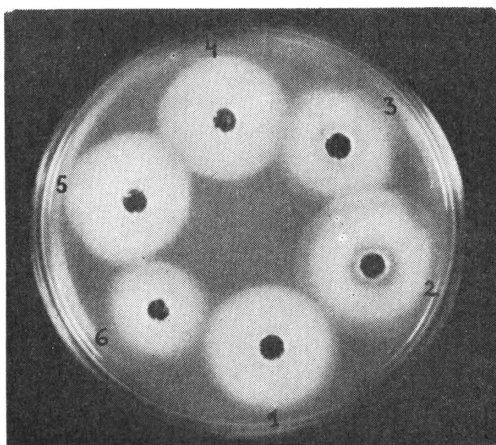
ZONE RASTA TEST-MIKROORGANIZAMA
(metoda udubljenog agara)

Ispitivani ekstrakti:

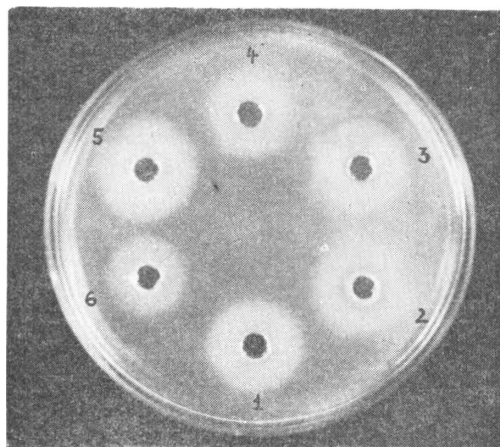
1. *Acremoniella atra*, 2. *Rhizopus oryzae*, 3. *Fusarium graminearum*, 4. *Alternaria* sp., 5. *Aspergillus flavus*, 6. Sadržaj buraga goveda



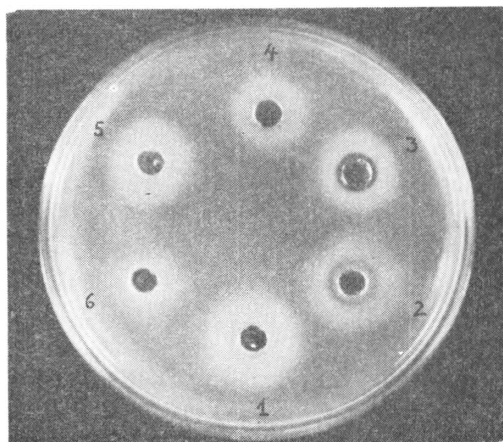
Sl. 1. *E. coli* 113-3



Sl. 2. *Candida* sp.



Sl. 3. L. monocytogenes



Sl. 4. B. cereus

TABELA 1.
TESTIRANJE 10%-TNIH EKSTRAKATA PLIJESNI METODOM
UDUBLJENOG AGARA

Ekstrakti plijesni	Promjer zona rasta u mm			
	E. coli 113-3	Candida sp.	L. mono- cytogenes	B. cereus
Rhizopus oryzae	25	43	30	31
Aspergillus flavus	23	37	31	28
Fusarium graminearum	22	35	27	26
Acremonia atra	24	37	25	30
Alternaria sp.	21	36	24	25

Bioautografska metoda

Upotrebom otapala sa n-butanolom dobivali smo nekoliko zona stimulacije rasta u slučaju svih test-mikroorganizama, uglavnom u početnoj zoni kretanja otapala. Testiranjem sa *L. monocytogenes*, *B. cereus* i *Candida* sp. zone rasta bile su jače izražene nego testiranjem sa *E. coli* 113-3 (Sl. 5.).

Primjenjujući sekundarni butanol dobivali smo samo dvije zone rasta pri kraju kretanja otapala sa $R_f = 0,68$ i $0,72$ testiranjem pomoću svih navedenih mikroorganizama i nanošenjem svih ispitivanih ekstrakata. Ove zone rasta bile su najslabije ispoljene u slučaju *E. coli* 113-3, a najjače u slučaju *Candida* sp. (Sl. 6.).

Prilikom uporednog ispitivanja ekstrakta sjemena ječma, zone rasta bile su vidljive jedino testiranjem sa *Candida* sp., sa istim R_f -vrijednostima kao u slučaju ekstrakata plijesni.

Bioautografskom metodom, testiranjem navedenih ekstrakata, nismo dobivali zone inhibicije rasta mikroorganizama.

DISKUSIJA

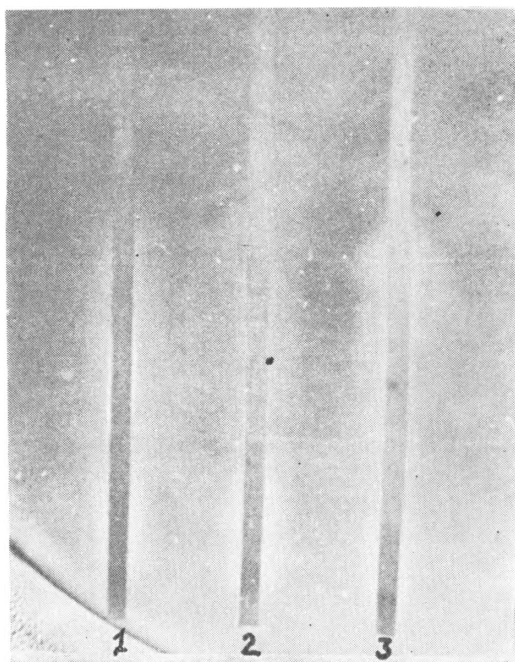
Pokazalo se da metaboliti plijesni djeluju stimulativno i na rast *E. coli* 113-3 testiranjem metodom udubljenog agara, koja se upotrebljava u određivanju vitamina B₁₂. Prema karakteru ispoljenosti i broju zona rasta, kao i na temelju rezultata dobivenih bioautografskom metodom, pokazuje se da se u ekstraktima plijesni nalazi nekoliko B₁₂-aktivnih supstancija. Primjenom bioautografske metode nastaje, naime, u ispitivanju ekstrakata plijesni nekoliko zona rasta test-mikroorganizama sa različitim R_f -vrijednostima. Prilikom određivanja njihovog efekta na rast mikroorganizama metodom udubljenog agara njihovo se djelovanje, vjerojatno, sumira. Zbog toga primjenom ove metode oko jedne udubine u koju se kapaju ekstrakti nastaju 2—3 zone stimulacije rasta različitog intenziteta. *E. coli* 113-3 osjetljiva je, kako izgleda, samo na veće količine ovih supstancija, jer se primjenom razređenijih ekstrakata više ne ispoljava njihovo stimulativno djelovanje. Naprotiv, u slučaju ostalih test-mikroorganizama stimulira se rast i razrijeđenim ekstraktima, a u najvećoj mjeri rast *Candida* sp. Kako su R_f -vrijednosti zona rasta iste u slu-

čaju svih test-mikroorganizama, naročito upotrebom sekundarnog butanola kao otapala, može se pretpostaviti da iste supstancije stimuliraju rast *E. coli* 113-3 kao i ostalih mikroorganizama. Bioautografskom metodom nismo dobivali zone inhibicije rasta, koje se u slučaju nekih ekstrakata ispoljavaju metodom udubljenog agara. Ovom metodom mogu se, naime, nanositi na filter-papir male količine ekstrakata, a osim toga vrši se međusobno odjeljivanje prisutnih supstancija, te dolazi do njihovog pojedinačnog djelovanja, koje se ispoljava samo u stimulaciji rasta test-mikroorganizama.

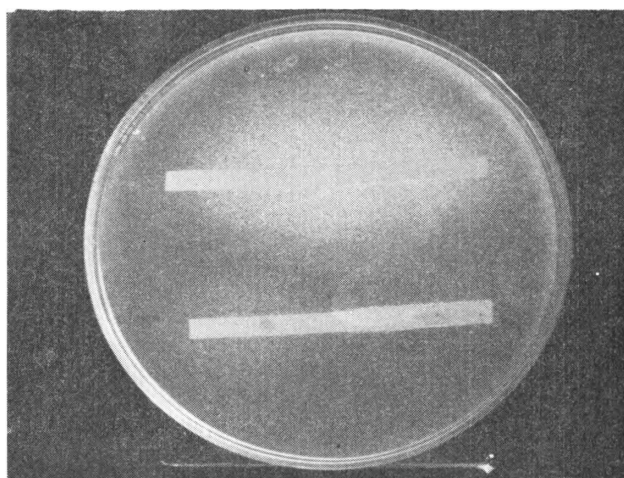
U stelji peradi i sadržaju buraga goveda nalaze se pored vitamina B₁₂ i njegovi analozi, uslijed čega se testiranjem takvih produkata i pokazuje da je njihovo djelovanje identično sa djelovanjem ekstrakata plijesni. U ekstraktu sjemena ječma ili zobu, prema našim rezultatima, nalazi se mala količina B₁₂-aktivnih supstancija, jer smo stimulaciju rasta bioautografskom metodom postizali samo u slučaju *Candida* sp., koji, čini se, reagira na vrlo male količine ovih supstancija.

Poznato je da analozi vitamina B₁₂ mogu biti proizvod metabolizma mnogih mikroorganizama, naročito *Propionibacteria* i *Streptomyces* sp. Međutim, u literaturi nalazimo podataka da i neki fungi produciraju vitamin B₁₂ i njegove analoge. Tako DiMarco i saradnici (5) navode da ekstrakt micelija *Nocardia rugosa* nakon držanja u autoklavu sadrži više analoga vitamina B₁₂ koji stimuliraju rast *E. coli* 113-3. Gončarova i saradnici (8) utvrdili su da se uzgojem funga u stočnom krmivu na određenoj temperaturi i uz određenu vlažnost u toku 4 dana inkubacije dobiva proizvod sa dva puta većom količinom vitamina B₁₂. Neki autori (6) zapazili su također da pljesniva hrana može utjecati na povećanje težine peradi i nosivosti jaja, kao i na poboljšanje rasta, i da su samo pojedine vrste plijesni toksične za perad. Prema našim nalazima, u ekstraktima plijesni prisutni su analozi vitamina B₁₂, od kojih neki vjerojatno, posjeduju jedan dio aktivnosti cijanokobalamina, koji, kako je poznato, stimulira rast, povećava težinu peradi i nosivost jaja, a pokazuje povoljno djelovanje i na ostale domaće životinje. Izgleda da pojedine vrste plijesni mogu producirati i cijanokobalamin, naročito u fazi razvitka micelija, te prema tome one posjeduju široki spektar djelovanja. Naime, toksičnost plijesni uglavnom se ispoljava u periodu masovne produkcije konidija, kada, vjerojatno, dolazi do stvaranja nekih toksičnih supstancija.

Naša ranija istraživanja (7) ukazuju i na mogućnost uticaja plijesni na određenu fermentativnu aktivnost *L. monocytogenes* koja bi mogla biti u vezi sa patogenitetom ove bakterije. Pored toga, ispitivanjem djelovanja ekstrakata plijesni na rast, respiraciju i fermentaciju glukoze u slučaju *Candida* sp. (2) ustanovili smo da se njihovo stimulatивно djelovanje vrši putem oksido-redukcionih procesa, pa se može pretpostaviti da u tome učestvuju neki analozi vitamina B₁₂. Čini se da ove supstancije kao metaboliti mnogih vrsta plijesni mogu imati znatan uticaj na virulenciju i patogenitet nekih bakterija, uslijed čega se, pored mikotoksikoza, obično javljaju i neke sekundarne infekcije. Ove supstancije, vjerojatno, imaju i određenu ulogu



Sl. 5. Bioautografska metoda sa *n*-butanolom
 Zone rasta *E. coli* 113-3
 Ekstrakti: 1. *Aspergillus flavus*
 2. *Acremonium atra*
 3. *Rhizopus oryzae*



Sl. 6.
 Sl. 6. Bioautografska metoda sa sek. butanolom
 Zone rasta *Candida* sp.
 Ekstrakt: *Rhizopus oryzae*

u patogenezi listerioze (3) zahvaljujući sposobnosti stvaranja povoljnih uslova za održavanje i razmnožavanje listerija u kontaminiranim ostacima biljne hrane.

ZAKLJUČAK

Metodom udubljenog agara, kao i bioautografskom metodom pomoću test-mikroorganizama *E. coli* 113-3, *L. monocytogenes*, *B. cereus* i *Candida* sp., ustanovili smo da mnoge vrste plijesni proizvode u toku svog metabolizma B_{12} — aktivne supstance. Metodom udubljenog agara nastaju u slučaju svih test-mikroorganizama 2—3 zone rasta različitog intenziteta, koje odgovaraju djelovanju analoga B_{12} — vitamina. Bioautografskom metodom, upotrebom otapala sa *n*-butanolom, dobiva se ispitivanjem ekstrakata plijesni (*Rhizopus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Acremoniella atra*, *Alternaria* sp.) nekoliko zona rasta u početku kretanja otapala, dok se sekundarnim butanolom dobivaju dvije zone rasta sa $R_f = 0,68$ i $R_f = 0,72$. *E. coli* 113—3 osjetljiva je samo na veće količine ovih supstancija, dok *L. monocytogenes*, *B. cereus* i *Candida* sp. reagiraju i na razrijeđenije ekstrakte plijesni.

Zbog svoje sposobnosti produkcije B_{12} — aktivnih supstancija plijesni bi mogle imati znatan uticaj na virulenciju i patogenitet nekih bakterija, a time i na pojavu sekundarnih infekcija koje obično prate mikrotoksikoze.

ZLATKO FORŠEK AND NADA AGANOVIĆ

ESTABLISHMENT OF B_{12} -ACTIVE SUBSTANCES (COBAMIDES) IN THE MOULD'S EXTRACTS IN COMPARATIVE TEST WITH *E. COLI* 113-3, *L. MONOCYTOGENES*, *B. VEREUS* AND *CANDIDA* sp.

SUMMARY

The authors established by the cup plate and bioautographic method by aid of *E. coli* 113-3, *L. monocytogenes*, *B. cereus* and *Candida* sp. the presence of B_{12} -active substances in the mould's extracts (*Rhizopus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Acremoniella atra*, *Alternaria* sp.). By the bioautographic method with *n*-buthanol as dissolvent several zones of growth of test microorganisms were obtained in the beginning of the movement of dissolvent and with sec. buthanol two zones of growth with $R_f = 0,68$ and $R_f = 0,72$. Zones of growth of test microorganisms by the cup plate method were of different intensity, because the influence of this substances is probably summed. *L. monocytogenes*, *B. cereus* and *Candida* sp. are more sensitive to B_{12} -active substances than *E. coli* 113-3. This examinations were a new contribution also in further interpretation of the mould's role in the pathogenesis of liste-

niosis in sheep, since they could be made the favourable conditions for the maintaining and multiplying of *L. monocytogenes* in the contaminated plant's food. Seemingly, this substances could influence on the virulence of some bacteria and consequently on the manifestation of the secondary infections by mycotoxicosis.

LITERATURA

1. Aganović N., Popović-Sabo M.: Veterinaria, 11, 4, 465—470, Sarajevo, 1962.
2. Aganović N., Ožegović L., Foršek Z.: Veterinaria, 13, Sarajevo, 1964 (u štampi).
3. Aganović N., Foršek Z.: Veterinaria, 13, 2, Sarajevo 1964 (u štampi).
4. Čajkovskaja S. N., Družinina E. N.: Mikrobiologija, 26, 609—613, Moskva, 1957.
5. DiMarco A., Boretti G., Migliacci A., Julita P., Minghetti A.: Boll. Soc. ital. Biol. sper., 33, 1513—1516, 1957.
6. Forgacs J. and Carll W. T.: Advances in Vet. Sci., 7, 273—382, London, 1962.
7. Foršek Z., Aganović N.: Vet. glasnik, 18, 3, 337—342, Beograd, 1964.
8. Gončarova M. E., Lutfullina M. S., Harin S. A., Ščerbakova Z. G.: Tr. Semipalatin. zoovet. in-ta, 3, 127—128, 1963.
9. Schweigert B. S.: Rev. of Nutrit. Res., 22, 3, 19—28, 1961.
10. Verhovceva T. P., Surikova E. I.: Lab. delo, 2, 24, Moskva, 1957.

