

Saopćenje

UDK 615.918:582.282:57.084.1

## ISPITIVANJE BIOSINTEZE T-2 TOKSINA U ČISTOJ KULTURI U RAZLIČITIM LABORATORIJSKIM USLOVIMA

A. Bočarov-Stančić i M. Muntañola-Cvetković

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Beograd

(Primljeno 15. VI. 1987)

Biosinteza T-2 toksina u laboratorijskim uslovima je testirana kod sedam izolata *Fusarium spp.* Kultivacija je obavljena uporedo na prirodnom čvrstom supstratu (zrnu pšenice) i polusintetičkoj tečnoj podlozi (GPK). Gotovo sva proizvedena količina T-2 toksina je bila ekstracelularnog porekla. Veći prinosi ovog trihotecena su dobijeni kod izolata *Fusarium* kultivisanih na tečnoj podlozi: 0,8- 175,0 mg/L filtrata u odnosu na 12,5-52,5 mg/kg sintetisanih na zrnu pšenice. Fermentacija na tečnoj podlozi i rotacionoj mučkalici se pokazala kao pogodnija metoda za testiranje toksikogenosti gljivičnih izolata zbog kraće inkubacije, jednostavnije pripreme uzoraka i ekstrakcije-T-2 toksina, dobijanja sirovih ekstrakata sa mnogo manje pratećih materija i mogućnosti preciznijeg definisanja faktora koji mogu da utiču na prinos istog trihotecena.

T-2 toksin, dobro okarakterisan član grupe 12,13-epoksitrihotecena je često dovođen u vezu sa mikotoksikozama životinja, posebno u Evropi i srednje-zapadnim delovima Sjedinjenih Američkih Država (1,2). Dobro su poznati simptomi ovih toksikoza nastalih konzumiranjem žitarica inficiranih raznim vrstama *Fusarium*: odbijanje hrane, poremećaji nervnog sistema, iritacija gastrointestinalnog trakta, hemoragije i dr. (3,4,5).

U literaturi je izvešteno o različitim metodama za proizvodnju trihotecenskih mikotoksina u čistoj kulturi. Za biosintezu trihotecena je često korišćeno vlažno sterilisano zrno žitarica i dugotrajna inkubacija (4 do 6 nedelja) na niskoj temperaturi (8 do 12 °C) (6,7,8). Na ovim prirodnim supstratima su dobijeni i visoki prinosi T-2 toksina (i preko 1 g/kg) (9); međutim, prečišćavanje je dosta komplikovano usled prisustva većeg broja interferirajućih supstanci.

Površinska fermentacija, ili fermentacija u kulturama na mučkalici u nutritivno kompleksnim tečnim medijumima kao što su Gregoryjev (10), Czapeks-Dox sa peptonom (11) i dr. zahteva manje "strogu" purifikaciju i kraći period inkubacije, mada su prinosi obično niži nego na čvrstoj podlozi.

Shodno tome, cilj ovog istraživanja je bio ispitati u laboratorijskim uslovima proizvodnju T-2 toksina kod izolata *Fusarium* spp. uporedo u uslovima kulture na prirodnom zrnastom supstratu i polusintetičkoj tečnoj podlozi radi odabiranja pogodnije metode za testiranje njihove toksikogenosti.

#### MATERIJAL I METODE

##### Kulture

Biosinteza T-2 toksina je testirana kod sedam kultura roda *Fusarium* (tabela 1). Od njih, dve su (*F. sporotrichioides* K-3A i *F. tricinctum* K-SAD) izolovane sa zrna kukuruza uvezenog iz SAD (leg. mr S. Pavlović, Zavod za kontrolu poljoprivrednih proizvoda "Topčider", Beograd); jedna (*F. culmorum* F-59ms) pokazala se u prethodnim istraživanjima (12) kao dobar producent ovog trihotecena, a ostale četiri toksikogene kulture su dobijene od sledećih istraživača iz inostranstva:

*F. sporotrichioides* ITM-391 i ITM-496 -leg. dr A. Bottalico, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali, Bari, Italija;

*F. sporotrichioides* KF-38/1ms - leg. dr Y. Chelkowski, Department of Plant Pathology, The Agricultural University, Varšava, Poljska;

*F. sporotrichioides* M-1-1 - leg. dr Y. Ueno, Fac. of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, Tokyo, Japan.

Štok kulture su čuvane na malt agaru ili krompir-dekstroznom agaru (pH 6,5) na 4 °C. Za inokulacije su korišćeni izolati supkultivisani na istim podlogama tokom 7-14 dana na 28 °C.

Tabela 1.

##### Poreklo kultura *Fusarium* spp.

Redni broj	Vrsta	Oznaka izolovanja	Godina izolata	Poljoprivredna kultura
1.	<i>F. culmorum</i>	F-59 ms	1984.	zrno pšenice
2.	<i>F. sporotrichioides</i>	ITM-391	-	-
3.		ITM-496	-	-
4.		K-3A	1986.	zrno kukuruza
5.		KF-38/1 ms	-	ječam
6.		M-1-1	1973.	grašak
7.	<i>F. tricinctum</i>	K-SAD	1986.	zrno kukuruza

#### Podloge za proizvodnju T-2 toksina

- a) Vlažno grubo mleveno zrno pšenice (PŠ);
- b) Tečni medijum sa 5% glukoze, 0,1% peptona-l i 0,1% ekstrakta kvasca; pH 5,4 (GPK) (13).

#### Uslovi kultivisanja

- a) Roux boce (250 ml) sa 40g PŠ (sterilisane dva puta tokom 25 min na 120 °C) inokulisane su suspenzijom spora u 10 ml sterilne vode i 40 ml GPK. Početna vlažnost supstrata 53%. Inkubacija je obavljena u uslovima temperaturnog stresa (7 dana na 28 °C, a zatim 21 dan na 15-16 °C);
- b) Erlenmajerove bočice (500 ml) sa 250ml GPK (sterilisane 25 min na 120 °C) inokulisane su suspenzijom spora u 10 ml sterilne vode. Inkubacija je obavljena tokom 5 dana na  $26 \pm 0,5$  °C i rotacionoj mućkalici (200 o/min).

#### Fizičko-hemijske analize i kvantifikacija T-2 toksina

Radi određivanja potrebnih parametara, kulture su podvrgnute sledećim postupcima:

a) Izolati kultivisani na zrnu pšenice - Uzorci su sušeni tokom 24 časa na 60 °C i mleveni do brašnaste strukture. Ekstrakcija i prečišćavanje toksina su vršeni prema metodi *Romer i saradnici* (14). Kvalitativna i kvantitativna determinacija T-2 je rađena tankoslojnom hromatografijom na pločama od silika-gela G(0,25 mm) razvijanim u metanol + hloroformu (5+95v/v), prskanim sa 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u metanolu, zagrevanim 10 min na 120 °C i posmatranim pod UV zracima (366 nm) (15). Koncentracije toksina su određene vizuelno, poređenjem intenziteta fluorescentnih mrlji uzoraka sa poznatim količinama standarda.

b) Izolati kultivisani na GPK - Kulture su filtrirane. Određivan je suvi ostatak sušenjem micelije 24 sata na 70 °C. Meren je pH filtrata i sadržaj redukujućih šećera (16). Sirovi toksin je izolovan ekstrakcijom iz filtrata (100 ml) pomoću etil-acetata (3x50 ml) koji je uparen do suva. Prečišćavanje je vršeno prema metodi *Romer i saradnici* (14) uz modifikaciju da nije rađena kolonska hromatografija. Za determinaciju T-2 toksina je korišćen isti postupak kao pod a).

## REZULTATI I DISKUSIJA

#### Izolati kultivisani na zrnu pšenice

Od sedam testiranih uzoraka *Fusarium* spp. 85,7% je bilo toksikogeno pri kultivaciji na prirodnom čvrstom supstratu u uslovima temperaturnog stresa (7 dana na 28 °C, 21 dan na 15-16 °C).

Prinos T-2 toksina je bio uglavnom dosta nizak: od 12,5 do 52,5 mg/kg suve težine supstrata (tabela 2).

Kulture *F. culmorum* F-59ms i *F. sporotrichioides* KF-38/1ms prethodno testirane u sličnim uslovima (12) su biosintetisale za 73%, odnosno 1% manje ovog trihotecena u sadašnjem istraživanju. Uočena pojava potvrđuje rezultate drugih

Tabela. 2.

Mikroskopske karakteristike i prinos T-2 toksina kod izolata *Fusarium* spp. kultivisanih na znu pšenice

Red. br	Vrsta	Oznaka izolata	Mikroskopske karakteristike	T-2 (mg/kg)
1.	<i>F. culmorum</i>	F-59 ms	Tanke vakuolizirane hife; bez sporulacije	50,0
2.	<i>F. sporotrichioides</i>	ITM-391	Obilna sporulacija: makro- i rede mikrokonidije	12,5
3.		ITM-496	Obilna sporulacija: dominantne mikrokonidije	34,7
4.		K-3A	Tanje hife; slaba sporulacija	12,5
5.		KF-38/1 ms	Nevakuolizirane hife; vrlo obilna sporulacija; limunaste mikrokonidije	52,5
6.		M-1-1	Tanke vakuolizirane hife	12,5
7.	<i>F. tricinctum</i>	K-SAD	Tanke nevakuolizirane hife; vrlo obilna sporulacija	0

autora (17) da relativno brzo nakon izolacije toksikogenih spojeva gljiva može doći do opadanja ili čak potpunog gubitka njihovih sposobnosti za proizvodnju njihovih odgovarajućih mikotoksina, pri periodičnom prenošenju tih izolata radi njihovog očuvanja u veštačkim kulturama.

U datim uslovima većina izolata *Fusarium* je sporulisala, kako posle 7 dana kultivacije na 28 °C tako i nakon celokupnog perioda od 28 dana (tabela 2). Između ove pojave i produkcije toksina nije bilo moguće ustanoviti postojanje korelacije.

#### Izolati kultivisani na tečnoj podlozi

Pri uslovima kultivacije u GPK i rotacionoj mučkalici (200 o/min, 5 dana, 26 °C) svi ispitani predstavnici *Fusarium* su biosintetisali T-2 toksin, i to u količini od 0,8 do 175,0 mg/L filtrata (tabela 3).

Samo kod uzorka KF-38/1ms odredivan je prinos ovog mikotoksina i iz micelije obrazovane u litru fermentacione tečnosti. Detektovano je 0,40 mg T-2 toksina u tom slučaju, za razliku od 48,0 mg koliko je isti soj produkovao u litru fermentacionog filtrata, što ukazuje da je sintetisani T-2 toksin bio uglavnom ekstracelularnog porekla. Dobijeni rezultati u potpunosti opravdavaju primenjeni postupak ekstrakcije koji je vršen samo iz filtrata kultura, čime je znatno skraćeno vreme potrebno za liofilizaciju celokupnih kultura (micelije i filtrata). Izbegavanjem ekstrakcije toksina iz micelije takođe je u mnogome

olakšan i postupak daljeg prečišćavanja T-2 toksina s obzirom na to da je na taj način eliminisano prisustvo većeg broja pratećih materija prisutnih u gljivičnim hifama.

Ni u jednom slučaju nije došlo do obrazovanja peleta. Uočena je rastresita micelija, uglavnom sa sferično deformisanim i vakuoliziranim hifama (tabela 3). Kao i na prirodnom zrnastom supstratu, većina testiranih gljivičnih izolata je sporulisala, međutim nije bilo moguće uspostaviti korelaciju između intenziteta ove pojave i biosinteze toksina.

Suvi ostatak je iznosio od 102,3 do 418,5 mg/100 ml filtrata (tabela 3) i nije ni u ovom slučaju uočeno postojanje korelacije između dobijene biomase i prinosa T-2 toksina. Npr. sojevi najbolji producenti ovog trihotecena na GPK (F-59ms sa 175 mg/L i M-1-1 sa 120 mg/L) obrazovali su u istim uslovima 102,3 odnosno 418,5 mg micelije u 100 ml fermentacione tečnosti, tako da su prinosi toksina obračunati po jedinici suve mase micelije bili izrazito različiti: 171,1 g/kg kod F-59ms, odnosno 28,7 g/kg kod M-1-1.

U istim uslovima kultivacije zabeležen je blaži pad pH kod filtrata testiranih izolata *Fusarium*: sa početnih 5,4 na 5,2-4,4 (tabela 3).

Sadržaj redukujućih šećera koji je na početku kultivacije bio 50 mg/ml podloge je opao na 44,2-28,1 mg/ml filtrata kultura (tabela 3). Dobijeni rezultati pokazuju da je bar polovina raspoloživog šećera bila prisutna u trenutku započinjanja biosinteze T-2 toksina, što je u saglasnosti sa istraživanjima *Ueno i saradnici* (13) koja se odnose na fermentaciju radi proizvodnje istog trihotecena i neosolaniola. O pozitivnom uticaju većih koncentracija glukoze na sintezu T-2 toksina izveštavaju i drugi autori. Tako su *Cullen i saradnici* (18) konstatovali da se pri fermentaciji sa *F. sporotrichioides* NRRL 3299 i *F. tricinctum* T-340 najveći prinosi istog mikotoksina dobijaju sa: 10% glukoze na Gregorijevom i Czapeks-Dox medijumu, odnosno 5% glukoze na Vogelovom medijumu.

#### ZAKLJUČCI

Na osnovu prethodno iznesenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- eksperimenti su pokazali da je gotovo sva količina dobivenog T-2 toksina bila ekstracelularnog porekla.
- kod izolata *Fusarium* spp. uporedo kultivisanih na čvrstoj i tečnoj podlozi veći prinosi T-2 toksina su detektovani u drugom slučaju: 0,8-175,0 mg/L filtrata (GPK), u odnosu na 12,5-52,5 mg/kg suve težine (zrno pšenice).
- za biosintezu T-2 toksina u polusintetičkoj tečnoj podlozi testiranim gljivičnim izolatima nije bila neophodna niža temperatura kultivacije (15-16 °C), jer se taj proces uspešno odvijao i na 26 °C.
- fermentacija u tečnoj podlozi i rotacionoj mućkalici, radi praćenja produkcije T-2 toksina u laboratorijskim uslovima, ima veći broj prednosti u odnosu na fermentaciju na prirodnim čvrstim supstratima: kraću kultivaciju (5 dana u poređenju sa 28); jednostavniju pripremu uzoraka i ekstrakciju toksina;

prisustvo pratećih materija u mnogo manjem obimu i mogućnost preciznijeg definisanja faktora koji mogu uticati na prinos ovog trihotecena.

### Literatura

1. Ciegler, A.: Trichothecenes: occurrence and toxicosis, J. Food Protect., 41 (1978) 399.
2. Mirocha, C.J., Pathre, S.V., Schauerhamer, B., Christensen, C.M.: Appl. Environ. Microbiol., 32 (1976) 553.
3. Ellison, R. A., Kotsonis, F. N.: Appl. Microbiol., 26 (1973) 540.
4. Vesonder, R.F., Ellis, J.J., Rohwedder, W.K.: Appl. Environ. Microbiol., 41 (1981) 323.
5. Wyatt, R.D., Colwell, W.M., Hamilton, P.B., Burmeister, H.R.: Appl. Microbiol., 26 (1973) 757.
6. Burmeister, H.R.: Appl. Microbiol., 12 (1971) 739.
7. Joffe, A.Z., Yagen, B.: Mycopathologia, 60 (1977) 93.
8. Smalley, E.B., Strong, F.M.: Toxic trichothecenes. U "Mycotoxins" (I.F.H. Purchase ur.), Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 1974, str. 199.
9. Bočarov-Stančić, A., Jovanović, Dj., Muntanola-Cvetković, M.: Poseb. izd. ANUBiH LXXX, 12 (1986) 129.
10. Gregory, K.F., Allen, O.N., Richer, A.J., Peterson, W.T.: Am. J.Bot., 39 (1952) 405.
11. Ueno, Y., Sato, N., Ishii, K., Sakai, K., Tsunoda, H., Enomoto, M.: App. Microbiol., 25 (1973) 699.
12. Bočarov-Stančić, A., Muntanola-Cvetković, M., Oberan, Lj.: Poseb. izd. ANUBiH LXXX, 12 (1986) 147.
13. Ueno, Y., Sawano, M., Ishii, K.: Appl. Microbiol., 30 (1975) 4.
14. Romer, T.R., Boling, T.M., McDonald, J.L.: J. Ass. Off. Anal. Chem., 61 (1978) 801.
15. Rukmini, C., Bhat, R.V.: J. Agric. Food. Chem. 26 (1978) 647.
16. Nelson, N.: J. Biol. Chem., 153 (1952) 376.
17. Harwig, J.: Ochratoxin A and related metabolites. U: "Mycotoxins" (I.F.H. Purchase ur.), Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 1974, str. 345.
18. Cullen, D., Smalley, E.B., Caldwell, R.W.: Appl. Environ. Microbiol., 44 (1982) 371.

### Summary

#### T-2 TOXIN BIOSYNTHESIS IN PURE CULTURES UNDER DIFFERENT LABORATORY CONDITIONS

Seven isolates of the fungal genus *Fusarium*, comprising three species: *F.culmorum*, *F.sporotrichioides* and *F.tricinatum*, were tested for T-2 toxin production. Cultivation was carried out concurrently on a natural substrate (wheat grains) under temperature stress conditions (7 days at 28 °C, 21 days at 15-16 °C), and in a semi-synthetic liquid medium (5% glucose, 0.1% peptone-1, 0.1% yeast extract) on a rotary shaker (200 rpm, 5 days at 26 °C). Of the fungal isolates cultivated on wheat grains 85.7% were found to be toxicogenic; the yields of T-2 toxin were rather small (12.5 - 52.5 mg/kg dry weight). In the liquid medium all *Fusarium* cultures biosynthesized T-2 toxin; the quantities produced

ranged from 0.8 to 175.0 mg/l of the filtrate. At least half of the dispensed sugar was present in the medium when T-2 toxin production started. No correlation was found between the type of mycelial growth, sporulation, biomass quantities and the intensity of T-2 toxin biosynthesis. Most of the produced trichothecene was of extracellular origin.

Fermentation in the semi-synthetic liquid medium using a rotary shaker was more suitable for screening the toxicity of the fungal isolates in pure cultures because of a shorter period of incubation, simpler sample preparation and T-2 toxin extraction. In this way factors influencing toxin production could be defined more precisely.

"Siniša Stanković" Institute for Biological  
Research, Beograd

Received for publication  
June 15, 1987