Mikotoksyny zawarte w paszach zagrożeniem dla zdrowia i produkcyjności zwierząt

Referat plenarny na LXV Zjazd Naukowy PTZ w Olsztynie

Antoni Jarczyk

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Choroby spowodowane grzybami pleśniowymi znane są od dawna, gdyż działanie grzybów jest wielokierunkowe. Na przykład **mikozami** są drożdżyce, grzybice, mączniaki, aspergillozy, fuzariozy i inne. Są to choroby roślin, zwierząt i ludzi wywołane rozwojem grzybów pleśniowych na powierzchni lub w organach wewnętrznych organizmów. Z kolei **mikoalergozy** – to rodzaj reakcji alergennych pod wpływem działania grzybów. Natomiast **mikotoksykozy** – to zatrucia i choroby wywołane toksynami grzybów.

Na wymienione zagrożenia narażone są nie tylko zwierzęta, ale i ludzie będący konsumentami lub stykający się ze skażonymi produktami. Ci ostatni – to najczęściej pracownicy magazynów i elewatorów zbożowych, wytwórni pasz, a także producenci drobiu, trzody i bydła, a nawet archiwiści. Wynika to stąd, że nie tylko zboża i ziarna zbóż oraz pasze, lecz także siano, ściółka i papier są dobrą pożywką dla rozwoju grzybów, szczególnie przy odpowiedniej wilgotności i temperaturze. Grzybice organów wewnętrznych nie są łatwe do zdiagnozowania u ludzi, a co dopiero u zwierząt. Okazuje się np., że gruźlica płuc ma bardzo podobny obraz rentgenowski do grzybicy płuc, która również bardzo często atakuje ten narząd (Dynowska, 2000).

Przez ostatnie 40 lat bardzo dużo prac badawczych poświęconych było metabolitom grzybów pleśniowych, jak inaczej określa się mikotoksyny. Przypisuje się im działanie rakotwórcze, teratogenne, nefropatyczne, neurotoksyczne i hepatogenne. Obniżają ponadto odporność organizmu oraz zwiększają podatność na alergie. Niektóre mikotoksyny działają estrogennie, wywołując tzw. ruje rzekome. Bardzo często wykrywana w krajowych zbożach i produktach zbożowych ochratoksyna A, powodująca uszkodzenia nerek, występowała w 5-7% próbek krwi ludzkiej (Goliński i wsp., 1997). Mikotoksyny zabijają tylko w bardzo dużych dawkach, działają więc podstępnie, niszcząc organizmy powoli, ale skutecznie. Wiadomo, że mogą działać synergistycznie, wzmagając działanie bakterii chorobotwórczych, ograniczając natomiast rozwój bakterii kwasu mlekowego. **Nie ustalono jeszcze, jakie są skutki współdziałania np. ze środkami ochrony roślin, metalami ciężkimi czy nawet ze środkami grzybobójczymi.** Coraz częściej opisuje się przypadki, że np. niektóre środki przeciwgrzybicowe dodawane do paszy wzmagają wytwarzanie toksyn (Grajewski za Petersonem, 1995), podobnie jak niektóre pestycydy (Monastyrski, 1996).

Metabolity grzybów, szczególnie z rodzaju *Aspergillus, Penicillium* i *Fusarium* znajdowane są w mięsie i jego przetworach, wyrobach piekarskich, w piwie, ziarnie kawy i wielu innych produktach. Trzeba bowiem podkreślić, że niektóre z nich są bardzo odporne na wysokie temperatury i były jeszcze wykrywalne w próbkach poddanych temperaturze 250°C (Boudra i wsp., 1995). W Stanach Zjednoczonych, oprócz trzech wymienionych rodzajów grzybów toksynotwórczych, wyodrębnia się jeszcze czwarty: *Claviceps purpurea*, wytwarzający alkaloid sporysz w zbożach (Diekman i wsp., 1997).

Dobre warunki do namnażania grzybów sprzyjają wytwarzaniu mikotoksyn

Mikotoksyny powstają w niezupełnie jeszcze określonych warunkach rozwoju grzybów. Mimo spełnienia wszystkich wymogów, bardzo trudno je np. wyprodukować w laboratoriach w miesiącach zimowych. W okresie po żniwach (1-4 miesiące) ziarna zbóż, mimo bardzo dużych ilości grzybów (powyżej 100 tys. jtk/g), zawierały bardzo małą ilość ochratoksyny A (Jarczyk i wsp., 1997). W sprzyjających jednak warunkach potrafiły one wyprodukować, na inokulowanym podłożu, już po 7 dniach 53±9 µg/g ochratoksyny A (OA), czyli ponad 10 tysięcy razy więcej niż dopuszczają w zbożach normy krajów UE (5 µg/kg). Po miesiącu w próbkach stwierdzono już 130 µg/g OA (Lu Ping i wsp., 1995).

Złe warunki magazynowania, duża wilgotność (pow. 15%), połączona z optymalną temperaturą (ok. 25°C), oraz nie oczyszczenie ziarna z plew, pyłów i pośladu mają niewątpliwy wpływ na szybki rozwój grzybów, co podkreśla wielu autorów (m.in. Borkowska-Opacka, 1980; Goliński i wsp., 1997; Jarczyk i wsp., 1998b; Perkowski, Miedoner, 1994). Z własnych badań wynika, że w przypadku mieszanek pełnoporcjowych dochodzi jeszcze czynnik dodatkowego natlenienia, podgrzania się paszy przy 10–15-minutowym mieszaniu oraz mechaniczny podział strzępków grzybów. Istotny okazuje się czas magazynowania zbóż oraz, wspomniany już, początkowy stopień skażenia grzybami. Nie można także pominąć czynnika prawidłowego pobrania próby oraz metody i techniki oznaczania mikotoksyn. Wpływają one decydująco na prawdziwość informacji dotyczącej jakości pasz (Jarczyk i wsp., 1998b).

Z badań Golińskiego i wsp. (1997) wynika, że stopień kontaminacji 18 odmian pszenicy fuzariozą i biosynteza moniliforminy w okresie wegetacji mogą być bardzo zróżnicowane w poszczególnych latach. Średni procent ziarniaków wykazujących w tych badaniach typowe objawy fuzariozy w roku 1995 wynosił 39,2, natomiast w 1996 r. – aż 84,7%. Wynika stąd, że zwierzęta, a w konsekwencji i ludzie spożywający produkty zbożowe i zwierzęce są narażeni w kolejnych latach na działanie mikotoksyn w bardzo zróżnicowanym stopniu.

W omówieniu tym nie sposób pominąć czynników związanych ze stanem technicznym silosów i magazynów do przechowywania ziarna zbóż i komponentów paszowych oraz wyposażeniem gospodarstw rolnych w urządzenia do czyszczenia i suszenia. Na rysunku 1 przedstawiono poziom zanieczyszczeń grzybami 371 próbek zbóż tuż po zbiorach (I okres magazynowania) oraz po 9-11 miesiącach ich magazynowania (II okres), z uwzględnieniem niektórych komponentów i importowanych mieszanek pełnoporcjowych dla trzody chlewnej.

Próbki zbóż zbierano z wielu gospodarstw rolnych i wytwórni pasz z woj. warmińsko-mazurskiego. Poziom zanie-

Tabela 1
Częstość (%) występowania zanieczyszczeń toksynotwórczymi grzybami pleśniowymi oraz bakteriami *Clostridium perfringes* zbóż i mieszanek pełnoporcjowych w okresie po zbiorach (I okres) oraz po 9-11 miesiącach (II okres) magazynowania, 1996/1997

Rodzaj grzybów	I okres (171 prób)		*Clostridium perfringens*	II okres (86 prób)		*Clostridium perfringens*
	n	%		n	%	
Aspergillus (Asp.)	102	59,6		72	83,7	
Penicillium (Pen.)	55	32,2		44	51	
Fusarium (Fus.)	3	1,7		0	0	
Próbki bez grzybów toksynotwórczych	11	6,5	8,1	14	16,2	37,9
Asp. + Pen.	24	14,0		40	46,5	
A. candida				1	1,2	

czyszczenia badano w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Olsztynie. Z rysunku 1 wynika, że w I okresie zboża charakteryzowały się niewielkim zanieczyszczeniem grzybami wynoszącym od 3,2 do 28 tys. jednostek tworzących kolonie – jtk/g. Obecna Polska Norma dopuszcza w zbożach i mieszankach 200 jtk/g. Mieszanki pełnoporcjowe dla loch, prosiąt i tuczników były skażone średnio 2,5 razy więcej niż zboża, co wykazano również we wcześniejszych badaniach (Jarczyk, 1996). Podobny jak w mieszankach poziom zanieczyszczeń występował w otrębach pszennych.

Importowana śruta sojowa była zanieczyszczona w I okresie w najwyższym stopniu, co wynikało z tego, że jedna ze sprowadzonych partii była skażona w nie spotykanym stopniu (3,8 mln jtk/g). Po 9-11 miesiącach magazynowania ziarna zbóż były zanieczyszczone sześciokrotnie bardziej niż w I okresie, jednak najmniej skażona była pszenica. Z kolei ziarna zbóż, mające łuski okrywowe, zdają się być szczególnie podatne na zagrzybienie. Po 9-11 miesiącach magazynowania liczba jtk/g wzrosła w jęczmieniu i owsie z 20-24 tys. do 140-150 jtk/g.

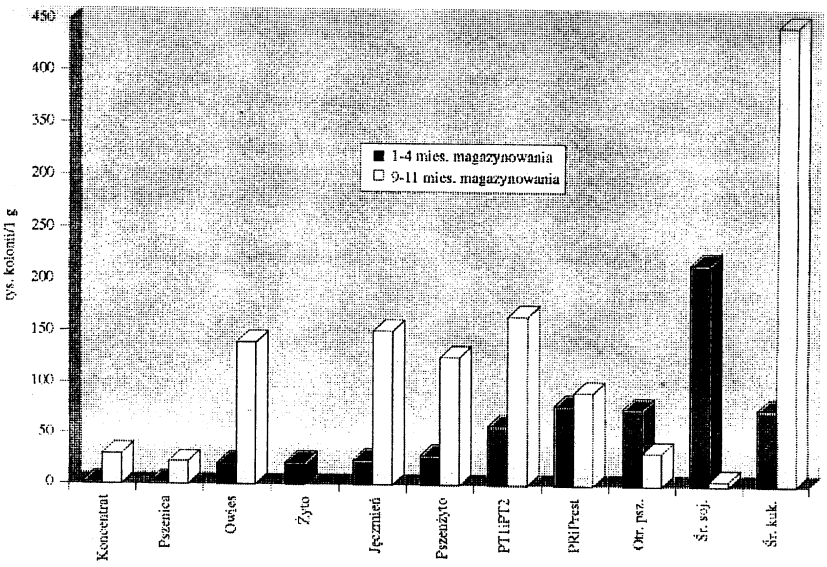
Znamienne jest, że w drugim importowanym komponencie, czyli śrucie kukurydzianej zanieczyszczenie osiągnęło najwyższy poziom, wynoszący średnio 442,9 tys. jtk/g (7 prób). Wyjaśnia to w jakimś stopniu dlaczego mieszanki pełnoporcjowe dla loch i prosiąt (36 prób) były bardziej zanieczyszczone (o 40 tys. jtk/g) niż mieszanki dla tuczników. W świetle tych danych należy zweryfikować ogólną opinię, że śruta kukurydziana doskonale nadaje się jako komponent pasz dla młodych zwierząt. Kontrola celna nie dysponuje odpowiednimi przepisami prawnymi, stąd jej jakość oraz jakość innych komponentów stają się wręcz ekologicznie niebezpieczne.

Przedstawione dane ukazują, że polski rynek narażony jest na otrzymywanie z importu nieraz bardzo złej jakości surowca. Jak zaznaczono, wynika to z braku przepisów prawno-celnych, które by nakładały na importera obowiązek posiadania certyfikatu jakości mikologicznej oferowanych zbóż i komponentów paszowych. Przykładem skutku braku takich przepisów może być import 6 wagonów pszenicy. W dwóch wagonach pszenica była zanieczyszczona, a właściwie skażona ponad Polską Normę, czyli ponad 200 tys. jtk/g. Była ona kwestionowana przez kupujących producentów dopiero w obrocie krajowym, jednak bez możliwości zwrotu, a nawet odszkodowań. Należy zaznaczyć, że już zanieczyszczenie od 30 tys. jtk/g łączyło się w okresie wiosenno-letnim z występowaniem w próbkach ochratoksyny A powyżej normy dopuszczanej przez większość krajów UE, czyli ponad 5 µg/kg (Jarczyk i wsp., 1998b).

Podsumowując można stwierdzić, że Polska jest krajem, do którego zbyt łatwo wwożone są produkty mikologicznie złej jakości. Można także ponowić wniosek, który już wcześniej skierowano do Polskiego Komitetu Normalizacyjnego (Jarczyk i wsp., 1999), w sprawie zmniejszenia dopuszczalnej normy zagrzybienia ziarna zbóż i pasz. W okresie wiosenno-letnim, czyli po 9–11-miesięcznym magazynowaniu, norma jakościowa nie powinna przekraczać 30 tys. grzybów w 1 gramie produktu.

Tabela 2
Grzyby toksynotwórcze i ich mikotoksyny oraz główne działanie toksyn, z uwzględnieniem produktów roślinnych, na których się namnażają

Rodzaj grzybów toksynotwórczych	Rodzaj mikotoksyn	Rodzaj skażonego produktu	Główny efekt toksyczny	Wrażliwość gatunkowa zwierząt domowych
Aspergillus				
flavus	aflatoksyny	śruta arachidowa, śruta	zapalenie, rak wątroby	przeżuwacze oraz
parasitcus	B_1 B_2 + G_1 G_2	bawełniana, strączkowe	immunosupresja, redukcja	monogastryczne (samce)
nominus	M_1 M_2 (pochodne)	mączki mięsne, zboża	aktywności enzymów trawiennych	
ochraceus	ochratoksyna A, B	magazynowane zboża i kukurydza, mieszanki pełnoporcjowe	nefropatia, mutagenność-potworkowatość	świnie, drób
Penicillum				
viridicatum	ochratoksyna A, B oraz cytrynina	magazynowane zboża i kukurydza, mieszanki pełnoporcjowe	nefropatia, mutagenność-potworkowatość	świnie, drób
Fusarium				
graminearum	trichotoceny:	zboża, kukurydza	neurotoksyczność,	cielęta i monogastryczne
culmorum	DON – deoxynivalenol		oszołomienie, wymioty,	świnie
avenaceum	NIV – nivalenol		wybroczyny, nekroza skóry	drób, konie
	DAS – diacetylnivalenon		i błon śluzowych (efekt	
	toksyna T-2		gazów bojowych)	
	zearalenol, zearalenon		estrogenne, ruje rzekome,	
			obniżona płodność	świnie
moniliformae	fumonizyny: B-1, B-2, B-3		porażenia, obrzęk płuc	drób, świnie
Claviceps purpurea	sporysz: alkaloidy, ergotamina, ergotoksyna i ergobazyna	żyto, pszenżyto, jęczmień, pszenica	efekt oksytocynowy: niedokrewienie, bezmleczność, gangrena ogonów u prosiąt i szczurów oraz grzebieni u kogutów	drób, świnie



Rys. 1. Występowanie skażeń grzybami pleśniowymi w zbożach oraz mieszankach pełnoporcjowych i koncentratach dla trzody chlewnej w I i II okresie badań w roku 1996 (mokre żniwa)

W tabeli 1 przedstawiono rodzaje najczęściej wykrywanych grzybów w próbkach zbóż i pasz. W testach ZHW w Olsztynie dominowały grzyby z rodz. *Aspergillus* (58,9 do 83,7%) oraz *Penicillium* (od 31,8 do 51,1%). Od 14,0 do 46,5% z 272 badanych próbek zawierało równocześnie dwa rodzaje grzybów: *Aspergillus* i *Penicillium*. Niebezpieczna może okazać się obecność w badanych próbkach bakterii *Clostridium perfringens*. Po 9-11 miesiącach magazynowania występowały w prawie 40% badanych próbek. Możliwość interakcji, czyli współdziałania i potęgowania negatywnego działania dwóch czynników patogennych, sugerowała m.in. Borkowska-Opacka (1980).

Grzyby z rodzaju *Fusarium* w okresie po żniwach stwierdzono tylko w 3 przypadkach (1,7% ze 173 prób). Należy jeszcze raz przypomnieć, że w badaniach Golińskiego i wsp. (1998) ten rodzaj grzybów stwierdzono nieraz w 85% ziarniaków pobranych w warunkach polowych. Z kolei w badaniach Perkowskiego (za Korolem, 1996) w 30-50% ziarniaków wykryto mikotoksyny z grupy trichotecenów (DON, NIV Toksynę T-1). Stąd, zdaniem Korola (1996), grzyby z rodzaju *Fusarium* mogą rozwijać się i wytwarzać mikotoksyny w warunkach polowych, a grzyby z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* są grzybami, które wytwarzają toksyny podczas magazynowania. Dominowanie grzybów z rodzaju *Aspergillus* w magazynowanych zbożach i mieszankach pełnoporcjowych wykazali także Jakubczak i Kleczkowski (1996). W 47 próbkach dodatnich stwierdzono w 80,8% grzyby z rodzaju *Aspergillus*, a w 19,2% – grzyby z rodzaju *Penicillium*. Grzybów z rodzaju *Fusarium* nie wykryto, co, jak już zaznaczono, nie oznacza, że zboża te nie zawierały mikotoksyn fuzaryjnych.

Charakterystyka podstawowych metabolitów grzybów

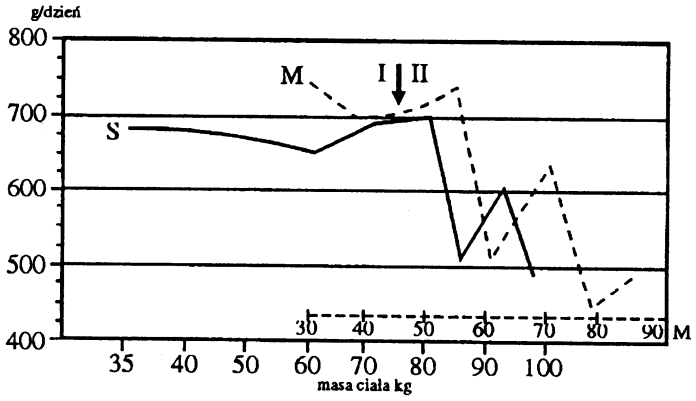
W tabeli 2 zestawiono rodzaje pleśni, wytwarzające specyficzne dla nich mikotoksyny, oraz przedstawiono, jakie są ich główne efekty toksyczne. Jak widać, większość opisywanych do tej pory mikotoksyn produkowanych jest przez grzyby z rodzaju *Aspergillus, Penicillium* i *Fusarium*. Skutki ich oddziaływania są bardzo zróżnicowane, mogą też atakować rozmaite narządy. Mogą to być nerki, wątroba, układ nerwowy, a pośrednio cały organizm.

Aflatoksyny (AF). Nauka poświęciła i poświęca wiele uwagi grupie czterech aflatoksyn: B_1, B_2, G_1 i G_2, wytwarzanym głównie przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, a szczególnie *A. flavus* i *A. parasiticus*. W naszych warunkach grzyby z rodzaju *Aspergillus flavus* są często wykrywane w oznaczonych próbkach pasz, co widać na załączonej fotografii (fot. 1).

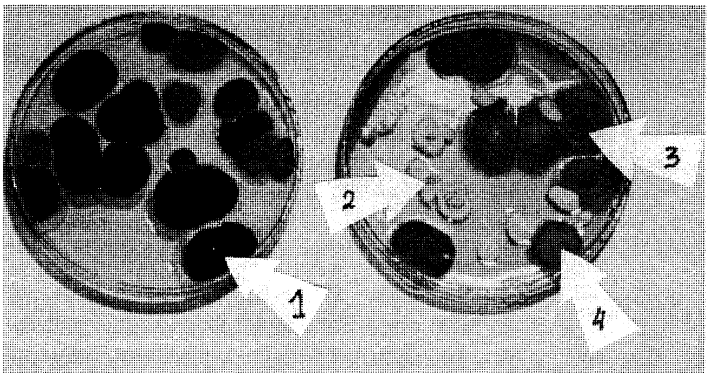
Aflatoksynę B_1 uważa się za najbardziej rakotwórczą, atakującą głównie wątrobę. Ostre uszkodzenia tego organu polegają na obumieraniu hepatocytów i na proliferacji przewodu żółciowego. Występowanie nowotworów u szczurów i pstrągów wystąpiło już przy dawkach aflatoksyny B_1 w paszach wynoszących odpowiednio 1,0 i 0,1 µg/kg. Aflatoksyny powodują także aberrację chromosomów i mutacje genów w szeregu testach bakteryjnych (Kryteria zdrowotne środowiska, 1984). Działają także immunosupresyjnie. Aflatoksyny, podobnie jak i inne mikotoksyny, działają podstępnie, szczególnie gdy ludzie lub zwierzęta narażeni są na małe dawki. Jedenastu z grupy 55 robotników narażonych przez 2-9 lat na pył zawierający aflatoksyny, w młynie rozdrabniającym orzechy ziemne i inne nasiona oleiste, miało raka różnych organów w czasie 11 lat obserwacji. Obliczono, że w powietrzu znajdowało się ok. 0,87 ng/m^3, czyli prawie jedna miliardowa grama w 1 metrze sześciennym (Kryteria zdrowotne środowiska, 1984).

U bydła aflatoksyny hamują trawienie celulozy i syntezę lotnych kwasów tłuszczowych. Zmniejsza się więc produkcyjność, notuje się także zmniejszenie masy ciała urodzonych cieląt (Kubiński, 1995).

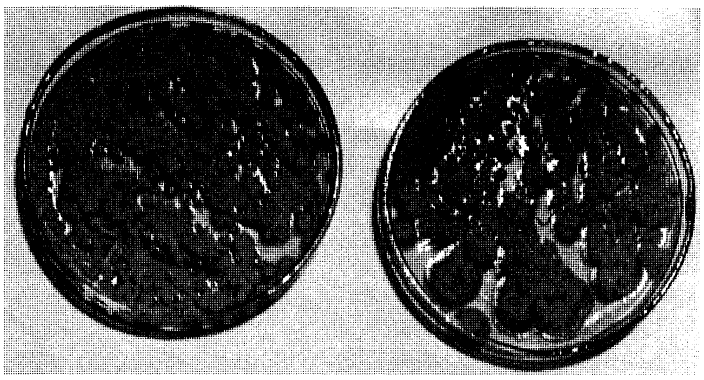
W Polsce w badanych próbkach pasz i koncentratów nie stwierdzono występowania aflatoksyn, sterigmatocystyny (prekursor aflatoksyn), zearalenonu, ale wykryto w 9,6% próbek ochratoksynę A w ilości od 25 do 125 µg/kg (Juszkiewicz i wsp., 1993). Uważa się, że zakaz importu śruty arachidowej zmniejszył do zera zagrożenie aflatoksynami. Niepokojące są jednak wyniki badań Domagały i Kiszy (1997), którzy stwierdzili, że z 42 próbek mleka 6 zawierało AF M_1 w stężeniach od 0,003 do 0,01 µg/kg. Próbki pochodziły z 10 gospodarstw woj. krakowskiego w okresie żywienia alkierzowego. Także mleko pochodzące z punktów skupu w tym województwie zawierało tę mikotoksynę (23,6% z liczby 157 prób).



Rys. 2. Kształtowanie się przyrostów dziennych tuczników młodszych (M) i starszych (S) przed (I) i po (II) żywieniu mieszanką skażoną grzybami pleśniowymi (Jarczyk, 1996)



Fot. 1. Różne szczepy grzybów z rodzaju *Aspergillus*: 1 – *A. niger*, 2 – *A. candidus*, 3 – *A. flavus*, 4 – *A. fumigatus* (fot. A. Jarczyk)



Fot. 2. Ochratoksynę A wytwarzają m.in. grzyby należące do gatunku *Aspergillus ochraceus* (fot. A. Jarczyk)

W świetle tych danych dość dziwnie brzmią projekty Komisji CCFAC, organu pomocniczego FAO/WHO, by dopuścić 0,05 µg/kg aflatoksyny M_1 w 1 litrze mleka, a w związku z tym 5 µg AF B_1/kg paszy podanej bydłu mlecznemu w okresie laktacji. Rozważany poziom 15 µg/kg uznano jednak za wysoki (Szteke, 1995).

Z badań Domagały i Kiszy (1997) wynikało by, że aflatoksyny produkowane są nie tylko w warunkach tropikalnych. Być może mogą się one wytwarzać w naszych warunkach w zagrzanej zielonej paszy lub w wilgotnym zagrzanym sianie, gdy temperatura odpowiednio wzrośnie i uruchomione zostanie wytwarzanie aflatoksyn przez grzyby z rodzaju *Aspergillus flavus* i *parasiticus*.

Zdaniem Diekmana i wsp. (1997) na aflatoksyny są ekstremalnie wrażliwe młode prosięta. Niska koncentracja 0,02 do 0,2 µg/kg (20-200 ppm) zmniejszała pobranie paszy, zmniejszały się też przyrosty i odporność. Stwierdzono jednak, że zwiększenie zawartości białka ogólnego (do 20%) oraz L-lizyny HCl zwiększało spożycie, ale nie zwiększało przyrostów dziennych. Duże stężenie aflatoksyn (1 do 5 µg/kg – 1000 do 5000 ppm) w paszy powodowało groźne skutki, z upadkami włącznie. Lochy pobierające skażoną paszę produkowały w mleku pochodną aflatoksyny B_1, czyli aflatoksynę M_1 o stężeniu od 0,5 do 0,75 µg/kg (500 do 750 ppm). Prosięta tych loch były niedorozwinięte, a wagę końcową osiągały mniejszą nawet wtedy, gdy zadawana im po odsadzeniu pasza nie zawierała już aflatoksyny. Wpływ aflatoksyn na układ rozrodczy świń jest niewielki lub żaden (Kubiński, 1995).

U drobiu groźne skutki żywienia paszą skażoną aflatoksynami wystąpiły w Anglii w roku 1960, gdy notowano masowe upadki młodych indyków. Padło wtedy ok. 100 tys. tych ptaków. Aflatoksyny stwierdzono w orzeszkach ziemnych importowanych z Brazylii. Stężenie aflatoksyny B_1 wynosiło 10 µg/kg. Chorobę cechowało szybkie pogorszenie się stanu zdrowia, podskórne krwotoki, a następnie upadki. Nawet podanie nioskom niskich dawek tej aflatoksyny w paszy – 0,01 µg/kg (10 ppm) przez 4 tygodnie, powodowało zmniejszenie całkowitej masy żółtka i jego procentowego udziału w masie jaja. W badaniach biochemicznych stwierdzono zmniejszenie aktywności kilku enzymów niezbędnych do trawienia skrobi, białek i fosfolipidów (Kubiński, 1995). Wpłynęło to na osiąganie mniejszych przyrostów, gorsze wykorzystanie paszy oraz zmniejszenie mięsności. Wzrastała ponadto wrażliwość na choroby. Warto zaznaczyć, że w licznych badaniach na szczurach działanie aflatoksyny miało mniejszy wpływ na upadki i zachorowania na raka wątroby wtedy, gdy otrzymywały one 20% dodatek kazeiny, w porównaniu do zwierząt otrzymujących w diecie tylko 5% tego białka. Dieta bogata w tłuszcz także zabezpieczała szczury samce (wrażliwsze niż samice) przed ostrym działaniem toksyny. Zwiększoną odporność wykazywały zwierzęta, które otrzymywały w paszy dodatek witaminy A, w porównaniu do szczurów z niedoborem tej witaminy (Kryteria zdrowotne środowiska, 1984).

Ochratoksyny. Jest to grupa czterech toksyn (A, B, C i α), z których ochratoksyna A (OA) jest najbardziej niebezpieczna i najczęściej spotykana w magazynowanych zbożach i produkowanych z nich mieszankach pełnoporcjowych. Wytwarzają ją grzyby z rodzaju *Aspergillus ochraceus* (fot. 2) lub *Penicillium viridicatum*, rozmnażające się w klimacie umiarkowanym w optymalnej temperaturze ok. 25°C. Jednakże rozwój grzybów przebiega w dużym spektrum temperaturowym od 13 do 37%. W Polsce stwierdzono OA w 9,6% mieszankach paszowych i koncentratach w stężeniach od 25-120 µg/kg (Juszkiewicz i wsp., 1993). Przepisy WHO/FAO dopuszczają w zbożach nie więcej niż 5 µg OA/kg. W Kanadzie obecność OA stwierdzono w 61% próbek surowicy krwi świń (Marquard i wsp., 1988). W Polsce badania wykazały obecność OA w 94% próbek surowicy krwi pochodzących od trzody chlewnej (Kotowski i wsp., 1993).

Na początku lat dziewięćdziesiątych, kiedy nie dysponowaliśmy w województwie olsztyńskim metodami oznaczeń ilościowych toksyn, stopień zagrzybienia pasz był podstawowym kryterium oceny ich jakości mikologicznej. Przekroczenie Polskiej Normy z 1976 r. o 200 razy pod względem występowania w paszy grzybów toksynotwórczych z rodzaju *Penicillium* spowodowało, że już po tygodniu tuczniki zareagowały obniżeniem przyrostów dziennych z ok. 700 g do 550-600 g (rys. 2). Nie wiadomo jednak jakiego rodzaju toksyna czy toksyny występowały w tej paszy. Najprawdopodobniej była to ochratoksyna A, gdyż rodz. *Penicillium* taką toksynę w naszych warunkach wytwarza (oraz cytryninę). Należy zaznaczyć, że w paszy tej stwierdzono również bakterie *Clostridium perfringens*.

Ochratoksyna A działa nefropatycznie (uszkadza nerki), ale również rakotwórczo, mutagennie i teratogennie (anomalia genetyczne). Zmniejsza aktywny transport glikogenu do wątroby oraz syntezę glikogenu. Hamuje także syntezę białek. Współdziała synergistycznie z inną mikotoksyną, również uszkadzająca nerki – cytryniną (Kryteria zdrowotne środowiska, 1984). W Polsce OA była wykrywana w 7,2%

Tabela 3
Poziomy stężeń ochratoksyny A w surowicy krwi, moczu oraz narządach wewnętrznych po krótszym i dłuższym okresie żywienia paszami o wysokiej, średniej i niskiej zawartości OA (oznaczenie HPLC)

Poziomy OA w paszy w trzech okresach żywienia µg/kg			Przyrosty dzienne w okresach g		Stężenia OA, µg/kg							
					surowica		nerka		wątroba		mocz	
37 dni	28+30 dni											
I	II	III	I+II	III	I+II	III	I+II	III	I+II	III	I+II	III
Wysoki 32,0			601[a]		10,5		2,45		0,19		2,17	
	niski 5,7			688		3,34		1,47		0,12		1,67
Średnio I+II+III			638		–		–		–		–	
Średni 22,5 (Mycofix Plus)			512[b]		9,26		2,48		0,40		3,01	
	niski 4,1			729		3,46		1,06		0,31		1,24
Średnio I+II+III			604		–		–		–		–	
Niski 10,3			622[a]		4,89		1,112		0,1		1,63	
	niski 3,0			674		2,74		0,88		0,00		–
Średnio I+II+III			644		–		–		–		–	

a,b – P≤0,05
FAO/WHO – 5 µg OA/kg paszy

próbek krwi ludzkiej. Częstość ta była 2,5 razy niższa niż w Jugosławii (Goliński i wsp., 1995).

Przeżuwacze są mniej podatne na działanie OA niż zwierzęta monogastryczne. Wynika to z działania mikroflory żwacza, która produkuje enzymy powodujące rozpad OA do nieszkodliwej fenoloalaniny i ochratoksyny α. U zwierząt monogastrycznych, jakimi są świnie, drób i konie, toksyny są wchłaniane w przewodzie pokarmowym. Ostrość działania OA przebiega w zależności od stężenia toksyny i wieku zwierząt. Prosięta w wieku 28-35 dni, spożywając z paszą stosunkowo niewielkie stężenie OA, wynoszące 19 µg/kg, traciły apetyt, miały biegunki, często zakończone śmiercią nawet u 25% badanej populacji w ciągu 10 dni (Jarczyk i wsp., 2000).

W innych badaniach (Jarczyk, 1998), których wyniki zawarto w tabeli 3, tuczniki otrzymywały w paszy pełnoporcjowej wysokie stężenie OA, wynoszące 32 µg OA/kg, średnie – 20 µg/kg i niskie – 10,3 µg/kg (grupa K). Po 37 dniach wszystkie grupy otrzymywały paszę z niskim stężeniem OA. W grupie żywionej paszą o wysokim stężeniu przyrosty dzienne wynosiły w dwóch okresach tuczu od 601 do 688 g (średnio 638 g), a w grupie tuczników cały czas żywionych paszą o niskim poziomie OA przyrosty te były bardzo zbliżone i kształtowały się w granicach 622-674 g (średnio 644 g). Najgorzej przyrastała grupa, która otrzymywała w paszy dodatek Mycofix Plus. W założeniu ma on enzymatycznie rozkładać ochratoksynę A, zearalenony oraz trichoteceny.

Aktywność enzymów w surowicy krwi tuczników, a szczególnie kinazy kreatynowej, była bardzo wysoka. Powróciła ona do normy fizjologicznej tylko w grupie kontrolnej i to dopiero po ponadmiesięcznym żywieniu tuczników tej grupy paszą o bardzo niskim stężeniu ochratoksyny A, wynoszącym 3 µg/kg. U pozostałych dwóch grup tuczników aktywność kinazy kreatynowej najpierw była bardzo wysoka, a potem do końca tuczu podwyższona. Wyniki te uzasadniają prawidłowość normy zalecanej przez FAO/WHO, dopuszczającej w paszy, jak już zaznaczano, nie więcej niż 5 µg OA/kg. W tabeli 3 przedstawiono obecność OA także w nerce i surowicy krwi oraz wątrobie tuczników żywionych paszą skażoną OA na różnych poziomach. Maksymalna ilość OA w surowicy krwi, wynosząca 10,5 µg/L być może jest bezpieczna. W Danii dyskwalifikacja tuszy następuje dopiero wtedy, gdy w nerce stwierdzi się pow. 25 µg OA/kg, co odpowiada około 219 µg OA/l surowicy krwi (Hult i wsp., 1980). Dość duża ilość tej mikotoksyny w moczu tuczników (tab. 3) świadczy, że były one jeszcze zdolne do wydalania jej z organizmu. Tym niemniej u części zwierząt stwierdzono na podstawie badań histologicznych nerki zmiany nefropatyczne, świadczące o rozpoczęciu się procesu degeneracji tego narządu.

Podobnie jak prosięta, wrażliwe są kurczęta brojlery, u których stwierdzono 25% upadków (Niemiec, 1998). U niosek z kolei notowano mniejsze spożycie paszy i zmniejszenie nieśności (o 30%), różnice w jakości jaj i zawartości frakcji białkowych, a ponadto obniżoną zdolność wylęgową jaj i zahamowanie wzrostu zarodków. Występowały również wady ułożenia oraz zniekształcenia budowy ciała (teratogenność), np. anomalia rozwojowe gałek ocznych i niezrośnięte powłoki brzuszne w końcowym okresie rozwoju.

Według Paciejewskiego (1996) u koni mikotoksyny uszkadzają wiele tkanek i narządów, co prowadzi do upośledzenia ich funkcji. W zatruciach ostrych stwierdza się bóle morzyskowe, zanik perystaltyki jelit i osowiałość. Przy mniejszych stężeniach mikotoksyn w paszach właściwe zdiagnozowanie jest bardzo trudne, zwykle zwierzę traci kondycję, a wśród źrebiąt notuje się zwiększone upadki.

Zearalenony. Wyróżnia się wśród nich siedem pochodnych, spośród których najczęściej występują zearalenon i zearalenol. Mikotoksyny te działają estrogennie, a wytwarzają je grzyby z rodzaju *Fusarium*, które atakują ziarna zbóż już w okresie wegetacji. Z badań amerykańskich (Diekman i wsp., 1995) wynika, że zearalenon może powodować objawy ciągłej rui nawet u niedojrzałych płciowo loszek. Niskie stężenia tej mikotoksyny (3,6-4,3 µg/kg) w paszach podawanych lochom w okresie od pokrycia do 80 dnia ciąży nie wpływały negatywnie na rozwój embrionów. Jednakże stężenia 60-90 µg/kg powodowały całkowite wstrzymanie rozwoju embrionów w okresie od 2 do 15 dnia po zapłodnieniu lochy. W 14 przypadkach polowych, zarejestrowanych w USA i Kanadzie w związku z objawami estrogennymi u świń, stężenie zearalenonu w paszach i ziarnie wynosiło od 66 µg/kg do 6,8 mg/kg (Kryteria zdrowotne środowiska, 1984).

Działania zearalenonów kojarzą się z objawami parwowirozy u loch, czyli zamieralnością embrionów, często notowanej choroby w większości krajowych chlewni. Z kolei ruje rzekome, wywoływane przez zearalenony, mogą łączyć się lub też potęgować objawy bardzo niskiej skuteczności zapłodnień loch, jakie często obserwuje się (ale nie zawsze) w okresie lata. Należy zaznaczyć, że w Afryce wykryto duże ilości zearalenonów w piwie i kwaśnych kleikach dla dzieci. W USA

związek ten wykryto w 9 na 11 badanych próbek handlowej mączki kukurydzianej, w ilości 12-69 μg/kg (Kryteria zdrowotne środowiska, 1984).

Kubiński (1995) przytacza prace wykazujące, że najmniej wrażliwe na zearalenony jest bydło, a następnie drób. U bydła dopiero przy stężeniu 15 mg/kg w paszy obserwowano dużą nerwowość, biegunki, powiększenie gruczołu mlekowego, zapalenie pochwy, ronienia i niepłodność. U drobiu objawy obserwowano dopiero przy olbrzymich stężeniach, wynoszących od 0,8 do kilku gramów czystej substancji w kilogramie paszy.

Trichoteceny. Pierwsze informacje o zatruciach pochodzą z raportu Worononinа z 1891 r., który opisał działanie oszałamiające ziarna, powodującego kołowaciznę u zwierząt i ludzi ze wschodniej Syberii. U ludzi, którzy spożywali zatrute ziarno obserwowano ponadto nudności, wymioty i zaburzenia wzrokowe (Jędryczko, 1998). Trichoteceny, obejmujące około 150 strukturalnie pokrewnych związków, produkowane są przez kilka rodzajów grzybów, a szczególnie *F. nivale, F. poal, F. trincictum, Gibberella zeae (Fusarium)* i inne. Na przykład spośród 32 szczepów *F. graminearum (Giberella zea)* wszystkie wytwarzały zearalenony, 20 wytwarzało NIV, 15 Fusareon-X, 4 DON (czyli womitoksynę), a toksynę T-2 wytwarzał tylko jeden szczep. 13 szczepów produkowało co najmniej dwa rodzaje trichotecenów (Ueda i wsp., 1990). Trichoteceny wytwarzane są także przez *F. culmorum i F. avenaceum* (Goliński i wsp., 1997)

Do najgroźniejszych zalicza się Nivalenol (NIV), Deoxynivalenol, czyli Vomitoksynę (DON), toksynę T-2 i Diacetoxyscirpenol (DAS).

W Europie opisano występowanie zatruć głównie u koni, świń, cieląt oraz drobiu. Najczęstszymi objawami był szok, zaburzenia nerwowe, krwawe wybroczyny na skórze oraz w obrębie opon mózgowych i błonach śluzowych żołądka. W dalszej fazie działania tej mikotoksyny notowano nekrozę skóry, oligurię (zmniejszenie wyd. moczu), niewydolność układu oddechowego i śmierć. **Częstym objawem u zwierząt są wymioty i zaprzestanie pobierania paszy.** Dotyczy to szczególnie świń. Do organizmu trichoteceny mogą dostawać się jednak również z pyłem oraz przez kontakt z powierzchnią ciała. Działanie trichotecenów jest zbliżone do działania środków bojowych i według wszelkich danych były one stosowane (testowane) w Laosie, Kampuczy i Iranie (Kubiszyn, 1995). Należy podkreślić, że w przypadku trichotocenów stwierdzono ich synergistyczne działanie na zakażenia bakterii (za Jędryczko, 1998). Myszy wykazywały zmniejszenie oporności na *Salmonella typhimurium* oraz inne bakterie Gram-ujemne w obecności toksyn T-2. Dootrzewnowa inokulacja listerii oraz DAS (3 mg/kg m.c.) powodowała wzrost śmiertelności myszy oraz ilości bakterii izolowanych ze śledziony. Grupa kontrolna, której DAS podano 4 dni przed inokulacją listeriami, nie wykazywała zmian chorobowych (Kryteria zdrowotne środowiska, 1984).

Fumonizyny. Grupa najpóźniej poznanych mikotoksyn, produkowanych głównie przez grzyby z rodzaju *Fusarium moniliformea.* Według Kubińskiego (1996, za Chamleyem) oraz Nelsona i wsp. (1993) fumonizyny, a szczególnie B_1 wywołują trzy zespoły chorobowe:

1) leukoencefalomację u koni – charakteryzująca się niezbornością i porażeniami warg lub policzków, brakiem apetytu, w końcu delirium, atakowaniem ogrodzeń i ścian;

2) obrzęk płuc u świń – prowadzący do śmierci na skutek gromadzenia się płynów w jamie opłucnej; śmiertelność może dochodzić do 10-40% (Diekman i wsp., 1997);

3) tzw. efekt toksyczny u drobiu – występujący przy stężeniach fumonizyny B_1 w ilości 10-15 mg/kg paszy; notowane są porażenia i duszność; przy stężeniach 60-200 mg/kg produkcja jaj spadała do 50% (Kubena i wsp., 1999).

Sporysz. Jest przetrwalnikiem grzybów z rodzaju *Claviceps purpurea*, wytwarzanym na kłosach zbóż. Na ogół sporysz, który zawiera alkaloidy, nie jest wyszczególniany w literaturze przy omawianiu mikotoksyn. Jak już zaznaczono, czyni się to jednak w Stanach Zjednoczonych, najprawdopodobniej na skutek wyraźnych ujemnych skutków produkcyjnych i częstości występowania (Diekman, 1997). Według Ożarowskiego (1960) alkaloidy zawarte w sporyszu (m.in. ergotoksyna, ergotamina i ergobazyna) powodują skurcz mięśni gładkich i zwężenie włosowatych naczyń krwionośnych. U ludzi powodowało to zgorzel kończyn, u szczurów i prosiąt – gangreny ogonków, a u kogutków – grzebieni. U szczurów jest to rodzaj testu do oznaczeń jakościowych tych alkaloidów. Wymienione alkaloidy wykorzystywane są od dawna w medycynie ludzkiej, m.in. do prowokowania porodów (efekt zbliżony do oksytocyny) oraz jako środek znoszący bóle migrenowe.

Podsumowując omówienie występowania ważniejszych mikotoksyn można uznać, że wszystkie aflatoksyny mogą występować łącznie w krajowych paszach. Stężenia występujące w Polsce są na ogół niższe niż w innych krajach, co nie powinno jednak uspokajać, gdyż istnieje możliwość ich okresowego pojawiania się w znacznych stężeniach (np. w paszach importowanych).

Czy można zapobiegać rozwojowi grzybów? Jak zwalczać mikotoksyny w paszach?

Jak już wspomniano, oczyszczanie ziarna z plew, pyłów i pośladu oraz dosuszanie mokrego ziarna – to podstawowe czynniki, wstrzymujące rozwój grzybów. Z badań własnych (Jarczyk i wsp., 1997) wynika, że w pyle, plewach po oczyszczonym ziarnie było ponad 1,12 ml grzybów w 1 gramie (jtk)/g). W nieoczyszczonym ziarnie zbóż, w czasie transportu, pod wpływem drgań następuje sedymentacja pyłów w dolnej części. W czasie magazynowania grzyby te będą rozwijać się intensywniej w określonych częściach zbiorników lub pryzm. Przy dużym zanieczyszczeniu nie pomagają dodatki grzybobójcze oferowane przez różne firmy. Są to przeważnie preparaty zakwaszające, m.in. kwas mrówkowy i propionowy. Mogą one nawet intensyfikować rozwój grzybów (Grajewski, 1995; Jarczyk i wsp., 1997).

Wiele prac badawczych skierowanych jest na wytworzenie odmian zbóż, np. pszenicy, odpornych na fuzariozę (Goliński i wsp., 1997). Inne badania dotyczą możliwości inaktywacji mikotoksyn za pomocą enzymów lub różnych dodatków, aktywizujące enzymy organizmu zwierząt albo aktywizujące ich system obronny. Są to witaminy (m.in. A i E), niesteroidalne, antyzapalne leki, niektóre enzymy, jak np. nadtlenek desmutazy i katalazy (Wróblewska i wsp., 1998). Jeden z dostępwanych preparatów enzymatycznych oferowanych naszym producentom – Mycofix Plus – zmniejszał ilość ochratoksyny A w paszy o 30% (Jarczyk i wsp., 1998b). Jednakże przyrosty dzienne tuczników żywionych mieszanką z tym dodatkiem były gorsze od grupy kontrolnej oraz grupy, która Mycofixu Plus w paszy nie otrzymała (tab. 3).

Można więc uznać, że zapobieganie rozwojowi grzybów jest najefektywniejszym sposobem zmniejszania niebezpieczeństwa, wynikającego za skarmiania pasz skażonych mikotoksynami. Ponadto szybkie wprowadzenie przepisów celnych, dotyczących jakości ochrony mikologicznej importowanych zbóż oraz komponentów paszowych powinno przyczynić się do zwiększenia zdrowotności zwierząt w kraju, a tym samym bezpieczeństwa żywności pochodzenia zwierzęcego.

35 pozycji literatury do wglądu u Autora lub w Redakcji

Wykorzystanie genetyki molekularnej w hodowli i produkcji drobiu

Referat plenarny na LXV Zjazd Naukowy PTZ w Olsztynie

Marek Bednarczyk

Oddział Badawczy Drobiarstwa w Zakrzewie, IZ w Krakowie

Charakterystyka genomu kury. Materiał genetyczny kury (jak się przypuszcza od 50 000 do 80 000 genów) rozmieszczony jest na 39 parach chromosomów, w tym ośmiu dużych – zwanych makrochromosomami oraz na 30 małych, cytologicznie niezróżnicowanych chromosomach – zwanych mikrochromosomami. Płeć determinowana jest przez chromosomy oznaczone jako W i Z, przy czym płeć żeńska jest u ptaków heterogametyczna (ZW). Oszacowano [8], że makrochromosomy oraz chromosomy płciowe zawierają około 82% genomu kury (tab. 1).

Kura (*Gallus gallus domesticus*) stanowi w różnorodnych badaniach, w tym dotyczących poznania genomu organizmów żywych, doskonały z wielu względów gatunek modelowy. W badaniach molekularnych zaletą jest mały rozmiar genomu kury (około $1{,}2 \times 10^9$ pz), stosunkowo łatwa możliwość izolacji dużej ilości DNA (z jądrzastych erytrocytów) oraz duże zróżnicowanie genetyczne w obrębie gatunku. Kury charakteryzują znaczne możliwości reprodukcyjne (kilkaset sztuk potomstwa od kury w ciągu roku) oraz krótki odstęp między pokoleniami (około 7-8 miesięcy), toteż prowadzona przez człowieka od tysięcy lat selekcja doprowadziła do powstania wyspecjalizowanych, znacznie różniących się rodów hodowlanych. Z drugiej strony istnieją doświadczalne linie kur o znacznym stopniu homozygotyzmu, powstałe w wyniku krzyżowania krewniaczego, prowadzonego od stu i więcej pokoleń. Wreszcie dostępne są nadal populacje czerwonego kura dżungli, uznawanego powszechnie za protoplastę wszystkich użytkowanych obecnie kur. Taka różnorodność stanowi doskonały materiał badawczy umożliwiający poznanie organizacji i funkcjonowania informacji genetycznej, m.in. realizowany jest w ramach 5 Programu Ramowego projekt (AVIANDIV), którego celem jest [11] ocena bioróżnorodności 50 europejskich populacji kur, w tym naszej rodzimej zielononóżki kuropatwianej.

Projekt mapowania genomu kury. Jednak dopiero w ostatnich latach, w wyniku międzynarodowej współpracy powstał projekt mapowania genomu kury (Chick MaP), którego głównym celem jest:

– rozwój narzędzi i źródeł służących mapowaniu i identyfikacji genów;

– konstrukcja zintegrowanych, genetycznej i fizycznej mapy genomu kury;

– stworzenie ogólnodostępnej bazy danych;

– koordynacja działalności mapowania genomu kury.

Przydatne do konstruowania map sprzężeniowych są markery genetyczne. Markerem genetycznym jest dowolna cecha organizmu, której dziedziczenie można badać. Obecnie najczęściej stosowanymi są mikrosatelitarne sekwencje DNA, czyli krótkie, tandemowo powtarzające się dwu-, trzy- lub czteronukleotydowe motywy. Właściwości mikrosatelitów decydują o ich przydatności do mapowania genotypów, są bowiem łatwo wykrywalne, ich oznaczenie jest jednoznaczne, są wysoko polimorficzne, wreszcie bywają obficie i równomiernie rozproszone w genotypie. Zwłaszcza w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych, po identyfikacji wielu sekwencji mikrosatelitarnych, w połączeniu ze znakowanymi fluorescencyjnie starterami i automatycznym sekwencjonowaniem, nastąpiło w wielu laboratoriach na świecie prawdziwe polowanie na geny. Mapowanie genomu kury prowadzi się na podstawie informacji uzyskanych z trzech populacji ptaków utrzymywanych w Institute for Animal Health, Compton, w Michigen State University, East Leasing oraz w Wageningen Agricultural University, ich zebranie pozwoliło na opracowanie porównawczej mapy genomu kury. Obecnie (czerwiec, 2000) jej długość genetyczna wynosi 3800 cM i jest porównywalna z najbardziej zaawansowanymi u ssaków (tab. 2). Mapa zawiera 1889 loci w 50 grupach sprzężeniowych, w tym 350 markerów kodujących, z których 235 jest identyczna lub istotnie zbliżona do sekwencji znanych genów [6].

Przechowywanie, analiza lub interpretacja informacji, której źródłem są setki markerów jest praktycznie niemożliwa bez dostępu do nowoczesnej techniki informatycznej. Toteż w konstruowaniu map genetycznych podstawową rolę odgrywają odpowiednie programy komputerowe, np.: LINKAGE lub MAPMAKER. Ponadto w sieci INTERNET istnieje wiele baz danych gromadzących informacje o sekwencjach nukleotydowych, katalogach genów, poszczególnych chromosomach, ekspresji genów w różnych tkankach, sekwencjach kwasów

Tabela 1
Porównanie fizycznej długości makrochromosomów kury (na podstawie danych [8])

Chromosom	Zawartość DNA %	Długość fizyczna mln pz
1	20,8	250
2	15,1	181
3	11,5	138
4	9,1	109
5	5,3	64
6	3,5	42
7	3,4	41
8	2,5	30
Z	8,4	101
W	2,8	34