

TEODOR JUSZKIEWICZ, JADWIGA PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA

Zawartość aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂, ochratoksyn A i B, sterygmatocystyny i zearalenonu w śrutach zbożowych

Z Zakładu Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Problem skażenia mikotoksynami pasz i żywności stał się w ostatnich latach przedmiotem żywego zainteresowania w wielu krajach. Zagadnienie to posiada duże znaczenie ekonomiczne i zdrowotne. Oprócz ogólnego działania toksycznego, a zwłaszcza hepatotoksycznego, szereg mikotoksyn posiada właściwości rakotwórcze, teratogenne i mutagenne. Prace lat ostatnich dowiodły również, że najlepiej poznane i najsilniej działające rakotwórcze aflatoksyny można stwierdzić w mleku, narządach wewnętrznych i mięsie zwierząt żywionych paszą skażoną tymi mikotoksynami. Należy jednak podkreślić, że obecność toksynotwórczych pleśni w badanych materiale nie jest jeszcze dowodem obecności mikotoksyn i odwrotnie, brak pleśni nie znaczy, że materiał jest od nich wolny. Nic więc dziwnego, że skażenia mikotoksynami żywności i pasz stały się w ostatnich latach przedmiotem badań wielu laboratoriów na całym świecie. W skażonych zbożach stwierdzano obecność aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂, aflatoksyn M₁ i M₂, ochratoksyn A i B, kwasu penicylowego, patuliny, cytryniny, sterygmatocystyny i innych (1, 2, 4, 10, 11).

W Polsce brak jest dotychczas obszerniejszych badań na temat częstości występowania mikotoksyn w zbożach, chociaż czynione były próby oznaczania aflatoksyn w paszach i ich komponentach (14). W związku z powyższym postanowiono rozpocząć badania zmierzające do określenia stopnia skażenia mikotoksynami śrut zbożowych przeznaczonych na paszę dla zwierząt.

Materiał i metody

Dzięki pomocy Zjednoczenia Przemysłu Paszowego „Bacutil” i CRS „Samopomoc Chłopska” otrzymano do badań próbki zboża z mieszalni pasz rozmieszczonych na terenie całego kraju. Były to śruty: jęczmień, pszenicy, żyta, owsa i kukurydzy, pochodzące ze zbiorów roku 1974 i przeznaczone do sporządzenia mieszanek paszowych dla zwierząt. Próbkę pobrane zostały w miesiącach lutym i marcu 1975 r. w jednakowym czasie i według jednolitej instrukcji. W sumie otrzymano do badań z całego kraju 302 próbki, z których do analiz wybrano losowo 150 próbek pochodzących ze wszystkich byłych województw.

Spośród dostępnych metod analizy wieloskładnikowej wybrano do badań metodę Stoloffa i wsp. z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej (13). Po wprowadzeniu własnych modyfikacji, metoda ta pozwalała na jednoczesne wykrywanie wszystkich wymienionych w tytule mikotoksyn. W przypadku uzyskania wyników pozytywnych próby analizowano powtórnie według metod specyficznych dla poszczególnych mikotoksyn (6—9, 12). Posiadane metody i standardy analityczne mikotoksyn pozwalały ilościowo

oznaczyć w paszach zawartość aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂, ochratoksyn A i B, sterygmatocystyny i zearalenonu.

Dla potwierdzenia obecności aflatoksyn stosowano oprócz powtórnej analizy I metodą AOAC (8), metodę standardów wewnętrznych, spryskiwanie chromatogramów kwasami nieorganicznymi oraz tworzenie pochodnych z kwasem trójfluorooctowym według reakcji opisanej przez Przybylskiego (9). Powstałe pochodne aflatoksyn B₁ i G₁ różnią się od związków macierzystych wartością R_f na chromatogramach, nie zmieniając przy tym koloru fluorescencji. Dodatkowym potwierdzeniem było spryskiwanie tego samego chromatogramu roztworem 25% kwasu siarkowego lub innego kwasu nieograniczonego, w wyniku czego fluorescencja wszystkich czterech aflatoksyn oraz powstałych pochodnych aflatoksyn B₁ i G₁ przechodziła w kolor żółty.

Dla potwierdzenia obecności sterygmatocystyny stosowano preparatywną chromatografię cienkowarstwową. Zeskrobaną z płytki warstwę żelu eluowano metanolem i eluat dzielono na trzy części, z których jedną poddawano reakcji z kwasem solnym, drugą z pirydyną i bezwodnikiem kwasu octowego a trzecią służyła do porównywania wartości R_f. Podobnie postępowano ze standardem sterygmatocystyny (12). Utworzona w wyniku reakcji z kwasem solnym pochodna sterygmatocystyny fluoryzowała na żółto i miała wartość R_f odpowiadającą 1/4 R_f standardu. Natomiast octanowa pochodna pojawiała się jako niebiesko fluoryzująca plamka o R_f równym 1/2 wartości R_f sterygmatocystyny.

Ponadto obecność mikotoksyn potwierdzano również spryskując chromatogramy 25% roztworem alkoholowym chlorku glinu oraz 1,2% roztworem metanolem kwasnego węglanu wapnia. Po lekkim podgrzaniu różowy kolor sterygmatocystyny przechodził w reakcji z chlorkiem glinu w kolor żółty a lekko fioletowy zearalenon uzyskiwał barwę intensywnie fioletową. Zearalenon był widoczny na płytkach zarówno przy długości fali 365 nm jak i 254 nm.

W przypadku wstępnego stwierdzenia obecności ochratoksyn A i B potwierdzano to przez powtórny analizę i testy potwierdzające według procedury opisanej przez Nesheima i wsp. (7).

Wyniki i omówienie

Wyniki analizy 150 śrut zbożowych, przeznaczonych do produkcji mieszanek paszowych, zebrano w tab. 1. W żadnej z badanych śrut nie stwierdzono obecności aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂ ani też sterygmatocystyny, zearalenonu i ochratoksyny B. Natomiast w 8 śrutach (5%) można było potwierdzić obecność ochratoksyny A w stężeniu wahającym się w zakresie 50—200 µg/kg.

Ponadto 50% próbek śrut zbożowych, analizowanych według wieloskładnikowej metody Stoloffa i wsp. (13) dawało na chromatogramach fluoryzujące plamki, które wyglądem i wartościami R_f odpowiadały aflatoksynom.

Tab. 1. Zestawienie liczbowe próbek zboża badanego, w których stwierdzono metodą chromatografii cienko-warstwowej fluorescencją (F) mikotoksyn i próbek, w których obecność mikotoksyn potwierdzono testami chemicznymi (C)

Rodzaj zboża	Prób badanych	Aflatoksyny		Ochratoksyny		Sterygmatocystyna		Zearalenon		Stężenie ochratoksyny A $\mu\text{g}/\text{kg}$
		F	C	F	C	F	C	F	C	
Jęczmień	33	20	0	7	2	1	0	2	0	100 — 200
Pszenica	33	19	0	2	2	1	0	3	0	60 — 100
Zyto	25	16	0	5	4	3	0	4	0	50 — 200
Owies	27	14	0	2	0	0	0	2	0	
Kukurydza	32	8	0	8	0	0	0	0	0	
Razem	150	77	0	24	8	5	0	11	0	
%	100	51	0	16	5	3	0	7	0	

Część z nich znikła przy stosowaniu swoistej dla aflatoksyn I metody AOAC (8). W żadnym przypadku nie udało się jednak potwierdzić występowania którejkolwiek aflatoksyny za pomocą zastosowanych do badań testów chemicznych. Podobne spostrzeżenia poczyniono również w przypadku 16 próbek, w których na podstawie analizy wieloskładnikowej można było podejrzewać obecność sterygmatocystyny i zearalenonu. Podobnie też spośród 24 próbek śrut zbożowych wykazujących początkowo obecność ochratoksyn, po przeprowadzeniu pełnej analizy wraz z testami potwierdzającymi należało wykluczyć we wszystkich próbkach obecność ochratoksyny B a w 16 próbkach także obecność ochratoksyny A. Fakty te wskazują na potrzebę stosowania metod swoistych dla poszczególnych mikotoksyn i testów potwierdzających w każdym przypadku stwierdzenie obecności mikotoksyn metodą analizy wieloskładnikowej lub też innymi, wstępnymi metodami orientacyjnymi. Świadczy to również o konieczności bardzo ostrożnego wnioskowania na temat skażenia zbóż mikotoksynami, zwłaszcza jeżeli laboratorium wykonujące analizy nie jest w stanie sprawdzić wyniki testami potwierdzającymi lub też ma zbyt mało doświadczenia w zakresie pełnej analizy mikotoksyn.

Ochratoksynę A znaleziono w ziarnie zbóż i paszach w krajach Europy, Ameryce Północnej i Kanadzie. W Danii przeprowadzono badania próbek zboża paszowego, głównie jęczmienia, pobieranego z chlewni gdzie w latach 1969—71 stwierdzano schorzenia nerek u świń — okazało się, że 58% próbek zawierało ochratoksynę A w stężeniu od 9 do 27 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (4). W Szwecji badano próbki paszowego jęczmienia i owsa z 84 gospodarstw i wykryto ochratoksynę A w stężeniach wahających się w zakresie 16—409 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w 8% prób (5). Z innych opublikowanych dotychczas danych wiadomo, że ochratoksynę A stwierdza się w różnych zbożach rosnących w odmiennych strefach klimatycznych — oprócz wymienionej już Danii i Szwecji stwierdzono ją w Kanadzie w ziarnie pszenicy, żyta, jęczmienia i owsa, w Stanach Zjednoczonych w ziarnie kukurydzy i jęczmienia a w Jugosławii również w ziarnie kukurydzy (2).

Stwierdzone stężenia bardzo różniły się sięgając aż wartości 22 mg/kg i najprawdopodobniej zależały mniej od temperatury a bardziej od wilgotności i lokalnych warunków, sprzyjających rozwojowi pleśni ochratoksynotwórczych a zwłaszcza szczepów *Penicillium viridicatum* (2).

Stwierdzone w tej pracy skażenia krajowych zbóż paszowych tylko ochratoksyną A w stężeniu do 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ przy braku aflatoksyn, sterygmatocystyny, zearalenonu i ochratoksyny B pozwalają sądzić, że problem mikotoksynowości śrut zbożowych przeznaczonych na paszę mógł występować w naszym kraju w latach 1974—75 jedynie sporadycznie. Zważyć przy tym trzeba, że w okresie lata i jesieni 1947 r. notowano w Polsce liczne opady i dość niskie temperatury, które są zwykle korzystne dla rozwoju pleśni na zbożach. Podobne układy meteorologiczne mogą w naszym klimacie często powtarzać się. Rozwojowi pleśni na ziarnie paszowym i paszach sprzyja również niewłaściwie i zbyt długo trwałe ich przechowywanie. Problem ten powinni mieć na uwadze producenci pasz, zootechnicy i lekarze weterynarii zajmujący się rozpoznawaniem chorób zwierząt. Zagadnienie to nabiera znacznie szerszego znaczenia, jeżeli weźmie się pod uwagę fakt przechodzenia rakotwórczych i hepatotoksycznych mikotoksyn i ich metabolitów do żywności pochodzenia zwierzęcego (3).

Piśmiennictwo

- Anderson H. W., Nehring E. W., Wichser W. R.: J. Agric. Food Chem. 23, 775, 1975.
- Hesseltine C. W.: Mycopath. Mycol. Appl. 53, 141, 1974.
- Juszkiewicz T., Piskorska-Pliszczynska J., Cybulski W.: IUPAC Symposium: Mycotoxins in Food, Puławy, 1974.
- Krogh P., Hald B., Pedersen J.: Acta Path. Microb. Scand. B. 81, 689, 1973.
- Krogh P., Hald B., Englund P., Rutqvist L., Swahn O.: Acta Path. Microb. Scand. B. 82, 301, 1974.
- Mirocha C. J., Schauerhamer B., Pathr S. V.: JAOAC 57, 1104, 1974.
- Nesheim S., Hardin N. F., Francis O. J., Langham W. S.: JAOAC 56, 817, 1973.
- Official Methods of Analysis, 11th Ed., AOAC, Washington, D.C., 1970.
- Przybylski W.: JAOAC 58, 163, 1975.
- Scott P. M., Walbeek van W., Harwig J., Fennel D. I.: Can. J. Plant Sci. 50, 583, 1970.
- Shotwell O. L., Hesseltine C. W., Goulden M. L., Vandegraff E. E.: Cereal Chem. 47, 700, 1970.
- Stack M., Rodricks J. V.: JAOAC 54, 86, 1971.
- Stoloff L., Nesheim S., Yin L., Rodricks J. V., Stack M., Campbell A. D.: JAOAC 54, 91, 1971.
- Strzelecki E. L., Gąstorowska U. W.: Zbl. Vet. Med. B., 21, 395, 1974.

Adres autora: prof. dr Teodor Juszkiewicz, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.

Юшкевич Т., Пискорска-Плищиньска Я. — Содержание афлатоксинов B₁, B₂, G₁, G₂, охратоксинов А и В, стеригматоцистина и зеараленона в дертях злаковых.

Из кормовых заводов всех воеводств страна, получили 302 пробы злаковых дертей: ячменя, пшеницы, ржи, овса и кукурузы, предназначенных для приготовления коромовых смесей для животных. Из этого числа исследовали 150 проб на микотоксины многоэлементным методом по Столоффу и сотр. (JAOAC 54, 91, 1971). Все пробы в которых установили на хроматограммах флуоресценцию пятен и числа R_f, характерные для афлатоксина, охратоксина, стеригматоцистина, и зеараленона, анализировали методами специфическими для отдельных микотоксинов и подтверждающими химическими тестами. Из 150-ти проб, анализированных многоэлементным методом, 77 (51%) проявили флуоресценцию и число R_f аналогичные для афлатоксина, 16% — для охратоксина, 7% — для зеараленона, 3% — для стеригматоцистина. При последующим анализе методами специфическими для отдельных микотоксинов обнаружили только присутствие охратоксина А — в 8% проб в концентрациях 50—200 мкг/кг. Не подтвердили загрязнения дерти афлатоксином, зеараленоном, стеригматоцистином и охратоксином В.

Juskiewicz T., Piskorska-Pliszczynska J. — Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, ochratoxins A and B, sterigmatocystin and zearalenone in cereals.

A total of 302 crushed grain samples of barley, wheat, rye, corn and oats from the crop year 1974 were collected from commercial feed processing plants situated in the all provinces (voivodeships) of Poland. For the mycotoxin survey, performed acc. to the multimycotoxin detection method by Stoloff et al. (JAOAC 54, 91, 1971), 150 grain samples were taken. The positive samples were analyzed for the second time by the methods for specific mycotoxins and chemical confirmatory tests.

Of the 150 samples tested by the multimycotoxin detection method, 77 (51%) showed fluorescing spots an R_f values of aflatoxins, 24 (16%) of ochratoxins, 11 (7%) of zearalenone and 5 (3%) of sterigmatocystin. However, when these samples were assayed by the specific methods and confirmatory procedures, only 8 (5%) samples were found to be positive containing ochratoxin A at the level ranged from 50 to 200 µg/kg. In the crushed grain samples there were not found aflatoxins, zearalenone, sterigmatocystin and ochratoxin B.

EDWARD KOMAR

Stan czynnościowy wątroby i zawartość elektrolitów w surowicy krwi świń zdrowych

Z Kliniki Chirurgicznej Instytutu Chorób Niezakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Celem badań było określenie stanu czynnościowego wątroby u świń zdrowych na podstawie n/w testów: zawartości białka całkowitego i jego frakcji, aktywności aminotransferaz asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (AlAT), aldolazy (ALD), poziomu bilirubiny bezpośredniej i całkowitej, retencji bromsulfaleiny w surowicy i zawartości glukozy we krwi oraz zawartości elektrolitów: sodu, potasu, wapnia, magnezu, chloru i fosforu nieorganicznego w surowicy.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 60 świń, loszek i kastratów, w wieku 3—7 miesięcy, wagi 40—70 kg, rasy w.b. i jej krzyżówek. Zwierzęta były użyte do badań w 2 tygodnie po odrobaczeniu i w około 4 tygodnie po ostatnim szczepieniu zapobiegawczym. Były one trzymane w jednakowych warunkach i jednakowo żywione. Klinicznie nie wykazywały objawów chorobowych. Rozwój ich i przyrost na wadze były wyrównane i prawidłowe. Krew do badań pobierano z żyły czejkiej przedniej w sposób uprzednio opisany (12). Po skrzepnięciu krwi wirowano ją i uzyskiwano surowicę, w której oznaczano:

1. zawartość białka całkowitego — wg metody refraktometrycznej (16) przy użyciu refraktometru Pulfricha f-my Zeiss. Odczyty przeprowadzano w temp. 20°C. Wyniki uzyskiwano w g%;

2. frakcje białkowe surowicy — wg metody elektroforezy bibułowej (5). Używano buforu weronalowo-medialowego; pH — 8,6; siła jonowa 0,06; napię-

cie — 170 V, natężenie około 2 mA na pasek, czas rozdziału — 15 godzin na bibule Whatman 1. Po zakończeniu rozdziału paski utrwalano i barwiono roztworem błękitu bromofenolowego z dodatkiem kwasu octowego lodowatego — przez 20 minut. Po tym okresie odbarwiano je 2% vol/vol roztworem kwasu octowego lodowatego. Po wysuszeniu paski cięto i eluowano je w 0,01 n NaOH przez 60 minut, a następnie oznaczano ekstynkcję na fotokolorymetrze przy długości fali 580 milimikronów, po czym obliczano procentową zawartość poszczególnych frakcji;

3. aktywność AspAT i AlAT oznaczano wg metody Reitmana i Frankela (17). Wyniki oznaczeń odczytywano z krzywej wzorcowej w jednostkach międzynarodowych (mU/ml). Używano zestawów f-my Germed;

4. aktywność ALD — oznaczano wg metody Brunsza (4). Wyniki odczytywano w jednostkach międzynarodowych z tabeli. Używano testów f-my Germed;

5. poziom bilirubiny bezpośredniej i całkowitej w surowicy oznaczano wg metody Jendrassika i Clegghorna (11). Wyniki podano w mg%;

6. retencję bromsulfaleiny określano drogą pomiarów bezpośrednich. Próbkę krwi pobierano przed podaniem barwnika i w 15 minucie po dożylniej iniekcji Bromthaleiny Merck w dawce 5 mg/kg c.e. W surowicy uzyskanej z pobranych próbek krwi oznaczano kolorymetrycznie zawartość barwnika po dodaniu 0,1 n HCl (do próby ślepiej) i 0,2 n NaOH (do próby badanej) zarówno z pobrania zerowego (przed podaniem Bromthaleiny) jak i 15-minutowego. Procentową wartość retencji uzyskiwano przez przemnożenie różnicy ekstynkcji przez współczynnik określony w czasie kalibracji odpowiednich rozcieńczeń Bromthaleiny. Stosowano metodykę opisaną szczegółowo w odpowiednich pracach (7, 15);