

vious investigations concerning the useful value of European breeds reared in Poland during 1956—60. The following conclusions were drawn on the basis of this analysis: 1) The breeding effectiveness and survival rate of polyhybrid caterpillars is approximate to European breeds and the raw silk yield from cocoons is 33,3 per cent higher. 2) Imported hybrids retain their full value only in early breedings. The later the breeding begins, the worse is the hatching of caterpillars and their survival rate. 3) Losses caused by diseases are higher among polyhybrids. Losses caused

by other factors both among European breeds and polyhybrids are 2—3 times higher than those caused by diseases. 4) A low percentage of caterpillar hatching, an inadequate feeding and caterpillar cultivation and lately in some regions the contamination of mulberry leaves by toxic chemical compounds may be numbered among the factors causing the highest losses apart from diseases. 5) The total losses of cocoons in breedings caused by different factors amounted to 34,92 per cent during 1956—60 and out of the graine imported to 36,6 per cent during 1960—65.

ADAM CZARNOWSKI, WANDA CZARNOWSKA, ZOFIA PAWLAK

## Badania nad szkodliwością karmy dla drobiu zawierającej aflatoksynę

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku  
Kierownik: dr A. CZARNOWSKI

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna  
w Gdańsku

Dyrektor: lek. med. W. KARMAZYN

Grzyby rozwijające się na paszach dla zwierząt i na środkach spożywczych dla ludzi, wytwarzają substancje toksyczne, wywołujące u ludzi przeważnie schorzenia chroniczne, a w hodowli poważne straty powodowane zmniejszoną produktywnością zwierząt i nierzadko padaniem przychowka.

Ilość i toksyczność tych substancji jest różna dla różnych rodzajów pleśni, z których do najbardziej toksycznych należy rodzaj *Aspergillus* (grupa *Aspergillus flavus orizae*).

*Aspergillus flavus* stwierdzano w importowanych arachidach, które stosuje się jako dodatek do mieszanek paszowych w Polsce. Zatrucia takimi mieszanekami stwierdzone u nas w Polsce dotyczą kurcząt w wychowalni, gdzie obserwowano u około 20% objawy ostrych śmiertelnych intoksykacji po karmieniu pogłowa mieszaną DK-A Starter, zawierającą sruć arachidową. U nutrii wystąpiły objawy śmiertelnego zatrucia po podaniu karmy z dodatkiem makuchu arachidowego (7, 6).

Badania doświadczalne wykonane w Polsce na 25 dniowych kaczetach, którym podawano pokarm zawierający 0,6 mg/kg aflatoksyny B<sub>1</sub> i 0,3 mg/kg aflatoksyny G<sub>1</sub>, wykazały już po tygodniu wystąpienie zespołu objawów, określonych jako aflatoksykoza, prowadzących do wychudzenia ptaków i do powstania zmian biochemicznych we krwi (3).

Autorzy zagraniczni, głównie anglosascy, stwierdzają niewątpliwą szkodliwość dla zwierząt i ludzi pokarmu zawierającego aflatoksynę. Szczególną toksyczność wykazuje aflatoksyna dla organizmów młodych, z których najwrażliwsze są kacząta. Jedyny opisany przypadek śmiertelnego zatrucia człowieka stwierdzono w Gujanie Brytyjskiej po spożyciu orzeszków ziemnych zakażonych grzybem *Aspergillus flavus* (2). Często natomiast opisuje się przypadki schorzeń chronicznych wątroby, po spożyciu toksycznych arachidów, które wykazują aktywność rakotwórczą.

Czy produkty zwierzęce pochodzące od sztuk

karmionych paszą z aflatoksyną są toksyczne dla człowieka i w jakim stopniu, nie zostało jednoznacznie ustalone, jak wynika z dostępnej nam literatury. W przeglądzie literatury, dotyczącej badań nad aflatoksyną, Lys Arvid podaje, że mleko od krów karmionych paszą z dodatkiem mączki arachidowej, zawiera aflatoksynę. W jajach kur, którym podawano karmę z dodatkiem aflatoksyny nie wykazano jej obecności (4). Goldbach donosi, że w mięśniach i w wątrobie świń, karmionych paszą z aflatoksyną, substancja ta nie została wykazana (2).

W badaniach własnych staraliśmy się dać przyczynki do wyjaśnienia toksyczności paszy z dodatkiem arachidów, zakażonych grzybem *Aspergillus flavus*, dla drobiu, w naszych warunkach hodowlanych, oraz ewentualnego występowania tej toksyny w mięsie drobiu karmionego paszą zawierającą toksyczne arachidy lub hodowlę grzyba *Aspergillus flavus*.

Jako materiału do badań użyto prób orzeszków ziemnych *Arachis hypogea* (*Leguminozae*), w których chemicznie stwierdzono obecność aflatoksyny i wykazano zapleśnienie jąder wskazujące na grzyby z rodzaju *Aspergillus flavus*. Próby pobierane były z transportów, nadchodzących do Polski z krajów tropikalnych, jako kontrola importu w latach 1967 i 1968.

Wybrane jądra orzeszków, w których występowało widoczne gołym okiem zapleśnienie, umieszczano w komorze wilgotnej o temperaturze pokojowej 20 do 22°C. W ciągu 6 dni obserwowano wzrost pleśni o barwach szarej, szarobiałej, czarnej i żółtawej. Badanie mikroskopowe wykazało we wroście pleśni z rodzaju *Aspergillus niger*, *glaucus* i *flavus* oraz *Rhizopus nigricans* i *Penicillium*.

Zapleśniałe jądra opłukano jałowym płynem fizjologicznym i popłuczynę tą wysiano na pożywkę agarową z dodatkiem brzezki. Po 3 dniach inkubacji w temperaturze 37°C i równoległe w temperaturze pokojowej 20—22°C, wilgotności powietrza 62—75% uzyskano wzrost kolonii pleśni, jednakowy w obu temperaturach. Uzyskane kolonie przeszczepiano kilkakrotnie na pożywkę z brzezka, do otrzymania czystych szczepów pleśni *Aspergillus*, *Rhizopus* i *Penicillium*. Kolonie pleśni *Aspergillus* wykazujące barwę żółtą, przechodzącą w cytrynowo-zielonkawą aż do brunatnej, przesiano na flaszki Roux z półpłynną

pożywką ziemniaczaną. Jedną partię zasianych flaszek umieszczono w temperaturze 37°C, a drugą w temperaturze pokojowej tj. 20–22°C, o wilgotności względnej 62–75%. Po siedmiu dniach inkubacji w obu temperaturach otrzymano jednakowy obfity, bujny wzrost pleśni.

Część otrzymanych hodowli użyto do badań chemicznych, a część do badań biologicznych na kaczkach.

### Badania biologiczne

1. Cztery kurczęta około trzymiesięczne karmiono w ciągu 26 dni mielonymi orzeszkami arachidowymi zakażonymi pleśniami i zawierającymi aflatoksynę wykazaną chemicznie. U kurcząt tych wystąpiły porażenia kończyn, przypominające chorobę Mareka. Jedno z nich padło, a trzy pozostałe ubito. Wątroby i mięśnie pobrano do badania chemicznego.

2. Cztery kurczęta trzydniowe, własnego wylęgu karmiono płatkami owsianymi z dodatkiem *aa* mielonych orzeszków ziemnych. W ciągu dwu tygodni kurczęta padły z objawami intoksykacji oraz porażenia kończyn. Sekcyjnie stwierdzono zwyrodnienie wątroby oraz niezbyt błony śluzowej jelit. Wątroby i mięśnie pobrano do chemicznego badania na obecność aflatoksyny.

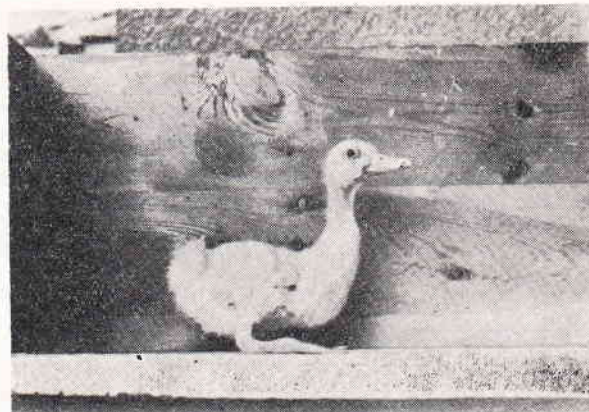
3. Szesnaście kacząt jednodniowych własnego wylęgu podzielono na cztery grupy po cztery sztuki i umieszczono w klatkach metalowych stosując następujące żywienie:

I grupa — kontrolna otrzymywała w pierwszych dniach mieszankę paszową cztery razy dziennie. Mieszanka ta była świeżo wyprodukowana w Gdańsku, zgodnie z normą ZN-65 MPSS/P-16 i sprawdzona na nieszkodliwość w wychowalni drobiu. Następnie po kilku dniach rozpoczęto karmienie kacząt gotowaną kaszą jęczmienną, płatkami owsianymi, chlebem, sałata itp.

II, III, IV grupy po cztery kaczęta stanowiły zwierzęta doświadczalne, które otrzymywały dwa razy dziennie — do południa, paszę zawierającą aflatoksynę, a po godzinie 14-tej karmiono je tym samym pokarmem co grupę I — kontrolną.

Grupa II otrzymywała dwa razy dziennie płatki owsiane zmieszane w równych częściach z podsuszoną hodowlą agarową pleśni otrzymanej na flaszkach Roux.

Grupa III otrzymywała dwa razy dziennie od rana do godz. 14-tej płatki owsiane zmieszane w równych



Fot. 2. Dwumiesięczne kaczkę żywnie paszą z dodatkiem mielonych orzeszków arachidowych. Zahamowany rozwój, niedowład kończyn.

częściach z mielonymi toksycznymi arachidami, pochodzącymi z prób, z których wydzielono hodowlę *Aspergillus* i stwierdzono chemicznie obecność aflatoksyny.

Grupa IV otrzymywała w ten sam sposób makuch arachidowy, w którym stwierdzono obecność aflatoksyny.

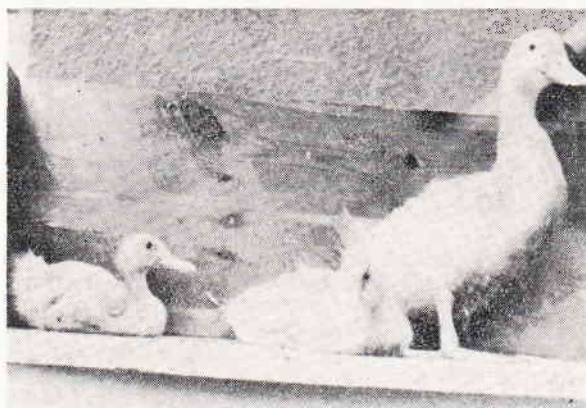
W ciągu pierwszych trzech dni wszystkie cztery grupy zachowały jednakowy apetyt i nie wykazywały jakichkolwiek objawów chorobowych. W ciągu czwartego i piątego dnia kaczęta z grupy II karmione hodowlą agarową pleśni, zaczęły tracić apetyt, tak w stosunku do pokarmu z aflatoksyną, jak i w stosunku do karmy normalnej. W następnych dniach kaczęta wykazały chwiejność chodu oraz jakgdyby zmniejszoną żywotność i ruchliwość. Objawy te pogłębiały się w ciągu następnych dni. W dniach siódmym, ósmym i dziesiątym wszystkie kaczęta padły, przy czym śmierć następowała nagle, bez zapaści i bez ciężkich objawów chorobowych. Jeszcze na trzy, a nawet na dwie godziny przed śmiercią, wygląd zewnętrzny ptaków nie wskazywał na zbliżającą się śmierć, która następowała nagle i bez objawów bolesności, spokojnie.

Badania sekcyjne padłych kacząt wykazywały zwyrodnienie wątroby, która była barwy cynobrowo-jasno-żółtej o różnym nasileniu barwy żółtej u poszczególnych sztuk. W błonie śluzowej jelit cienkich, szczególnie w dwunastnicy, stwierdzano rozpułchnienie i nieliczne wynaczynienia krwi.

Badania bakteriologiczne i mykologiczne narządów wewnętrznych i mięśni dawały wyniki ujemne.

Mięśnie i wątroby padłych kacząt pobrano do badania chemicznego na obecność aflatoksyny.

Obserwacja III i IV grupy kacząt wykazała, że w pierwszym tygodniu kaczęta zachowały się jak w grupie I — kontrolnej. Chętnie pobierały pokarm zawierający orzeszki lub makuch arachidowy i pokarm normalny, taki jaki dawano grupie I. Zauważono jednak, że upierzenie kacząt doświadczalnych nie ulega zmianie jak to miało miejsce u sztuk kontrolnych,



Fot. 1. Od lewej: dwumiesięczne kaczęta — karmione paszą z dodatkiem mielonych orzeszków arachidowych, karmione paszą z dodatkiem makuchów arachidowych, żywnie paszą normalną.

u których barwa żółta przechodziła w białą. Różnice te stawały się z każdym dniem wyraźniejsze. Równocześnie obserwowano wolniejszy rozwój kacząt doświadczalnych w stosunku do kontrolnych, oraz rozwijające się wolno porażenia kończyn i chwiejny chód. Po trzech tygodniach różnice w rozwoju były bardzo wyraźne. Szczególnie kaczęta grupy III karmione kaszą z dodatkiem mielonych arachidów były bardzo zahamowane w rozwoju i co najmniej o połowę mniejsze od kontrolnych.

Kaczęta kontrolne rosły szybko i pokrywały się piórami, natomiast kaczęta doświadczalne wykazywały wygląd piskląt, przy czym pogłębiały się u nich zaburzenia ruchowe, niepewne stanie na nogach i zataczanie się. U kacząt z grupy IV objawy te były mniej nasilone i rozwój ogólny mniej zahamowany.

Badania chemiczne wykonano osobno z hodowlą otrzymaną na flaszki Roux inkubowaną w temperaturze pokojowej tj. 20—22°C i osobno inkubowaną w temperaturze termostatu 37°C.

Za pomocą bagietki szklanej odcięto część pożywki z hodowlą na flaszce Roux w ilości około 50 g i przeniesiono do parownicy, wymytej dokładnie alkoholem metylowym i chloroformem. Następnie dodano czystego analitycznego piasku morskiego, w ilości około 15 g, dokładnie wymieszano pod przykryciem, postawiono na łaźni wodnej o temperaturze 60—70°C pozostawiając do wysuszenia na przeciąg 4—5 godzin. Tak przygotowany materiał poddano badaniu na obecność aflatoksyny, stosując metodę chromatografii cienkowsarstwowej, według przepisu PZH z modyfikacją własną, a mianowicie opuszczono ekstrakcję eterową jako nieistotną. Ekstrakcję chloroformową z metanolem w aparacie Soxhleta przeprowadzono w ciągu 3,5 godziny, stosując 5—6 cykli syfonowych na godzinę. Na płytkach w obecności wzorca aflatoksyny B<sub>1</sub> otrzymano plamę odpowiadającą R<sub>f</sub>-0,38, silnie fioletowo fluoryzującą. Plamy spryskane kwasem solnym dały barwę zielonkawo-żółtawo-fluoryzującą, odpowiadającą aflatoksynie B<sub>1</sub>, z tym, że intensywność barwy w obu przypadkach przekraczała wielokrotnie intensywność barwy wzorca o 0,1 µg/ml, a więc powyżej 8 mg/kg.

Badania chemiczne na obecność aflatoksyny wykonano także z wątrokami i mięśniami drobiu padłego i ubitego, któremu podawano w karmie hodowlę agarowo-ziemniaczaną pleśni *Aspergillus flavus*, mielone orzeszki ziemne oraz makuchy z orzeszków ziemnych zawierających aflatoksynę.

I tak osobne próby wykonano:

1. Wątroby kacząt z grupy II, które karmiono hodowlą pleśni inkubowanej w temperaturze 20—22°C i 37°C.
2. Mięśnie kacząt jak wyżej.
3. Wątroby kurcząt karmionych płatkami owsianymi z dodatkiem mielonych arachidów, padłych po około 2 tygodniach.
4. Mięśnie kurcząt jak wyżej.

5. Wątroby kur karmionych jedynie mielonymi orzeszkami.

6. Mięśnie kur jak wyżej.

Wątroby i mięśnie rozdrabniano w maszynce do mielenia mięsa, następnie rozcierano z piaskiem w moździerzu porcelanowym na jednorodną papkę. Papkę tę suszono na łaźni wodnej i badano jak hodowlę agarową pleśni z uwzględnieniem ekstrakcji eterowej.

We wszystkich przypadkach wyniki były ujemne, aflatoksyny nie stwierdzono to znaczy nie stwierdzono fluorescencji.

Z przeprowadzonych badań mykologicznych, biologicznych i chemicznych wynika niewątpliwa szkodliwość dla młodego drobiu mączki i makuchów arachidowych, pochodzących z zakażonych grzybem *Aspergillus*, orzeszków ziemnych.

Grzybnia *Aspergillus flavus* rozwija się i produkuje toksynę zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w temperaturze termostatu 37°C. Hodowla agarowa grzyba *Aspergillus* dodana do karmy w stcsunku 1/3 powoduje śmiertelną intoksykację u kacząt, padających w ciągu siedmiu do dziesięciu dni, a zatem ilość toksyny zgodnie z tzw. Ententest dla B<sub>1</sub> odpowiada około 18,2 µg.

W mięśniach i wątrobach padłych po zatruciu aflatoksyną ptaków nie daje się wykazać obecności aflatoksyny za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej. Także ujemne są wyniki badań chemicznych wątroób i mięśni kur karmionych około 4 tygodni mączką z toksycznych arachidów.

#### Piśmiennictwo

1. Bohosiewicz M.: Medycyna Wet. 23, 705, 1967.
2. Goldbach W.: Die Nahrung 12, 283, 1963.
3. Juskiewicz T., Stefaniakowa B., Rutkowska I.: Sympozjum Toksykologiczne, Wrocław 1968.
4. Lys Arvid Melding. norg. Lndbr. H. S. K. 45, 16, 1966. Karty dokumentacyjne.
5. Lemieszek-Chodorowska K.: Roczniki P.Z.H. 67, 563, 1967.
6. Mirocha C. J., Christensen C. M., Nelson M.: Medycyna Wet. 24, 129, 1968.
7. Stec J.: Medycyna Wet. 23, 709, 1967.
8. Steffen J.: Medycyna Wet. 23, 302, 1967.
9. Szpakowski J.: Medycyna Wet. 22, 552, 1966.
10. Biuletyn Informacyjny, C.L.A.S. 7, 27, 1968.

Adres autorów: Zakład Higieny Weterynaryjnej, Gdańsk-Oliwa, ul. Kaprów 10.

**FAJTELBERG-BLANK W. R.:** Wykłady biofizyki na wydziałach weterynaryjnych (Priepodawanije biofiziki na wietierinarnych fakultietach). Wietierinaria, Moskwa, 45, 8, 112.

W ostatnich latach w programach studiów weterynaryjnych w Związku Radzieckim uwzględniono biofizykę. Zajęcia obejmują 30 godzin wykładów i 30 godzin ćwiczeń. Tymczasowy program przewiduje, że studenci winni poznać: metody badań biofizycznych, zasady cybernetyki i jej zastosowanie w weterynarii, bionikę, fizyczne metody badania biologicznych mikro- i makrostruktur, biernie i czynne właściwości żywego ustroju. Szereg wykładów będzie poświęconych badaniu potencjału bioelektrycznego, działaniu elektrycznej, elektromagnetycznej i promienistej energii, biofizyce narządów wzroku i słuchu, zagadnieniu programowego nauczania. Główna część ćwiczeń będzie polegała na zaznajomieniu studentów z nowoczesną aparaturą fizyczną stosowaną w diagnostyce i terapii.

T. Jastrzębski