

HIGIENA ŻYWNOŚCI ZWIERZĘCEGO POCHODZENIA

TEODOR JUSZKIEWICZ

Źródła nitrozoamin w żywności pochodzenia zwierzęcego*)

Z Zakładu Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Spośród wszystkich związków chemicznych, jakie są stosowane w nowoczesnym rolnictwie, zapotrzebowanie na nawozy azotowe jest największe. Istnieje bowiem w otaczającej nas biosferze swoisty paradoks biologiczny. Rzecz można, że człowiek żyje w atmosferze azotu, gdyż gaz ten stanowi 79% powietrza, a jednocześnie brak azotu związanego, takiego który może być stosowany jako związek chemiczny w hodowli roślin i zwierząt, najdotkliwiej ogranicza rozwój produkcji żywności. Azot atmosferyczny jest, jak wiadomo, gazem obojętnym i jedynie bardzo ograniczona liczba organizmów może z niego tworzyć związki użyteczne dla własnych procesów metabolicznych. Pewne, raczej nieznaczne ilości azotu, wiązane są w reakcji z tlenem lub wodorem przez energię wytwarzaną w procesach jonizacji, zachodzących w trakcie promieniowania kosmicznego, powodowanych przez meteoryty i wyładowania energetyczne. W większych ilościach wiązany jest azot przez drobnoustroje, zwłaszcza grupę bakterii żyjącą w asocjacji z roślinami.

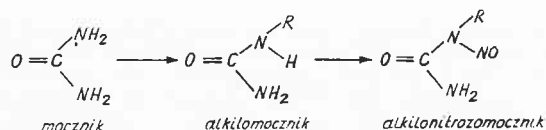
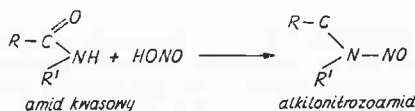
W latach ostatnich, człowiek opanował technologię przemysłowej ingerencji w naturalny cykl krążenia azotu. Obojętny azot jest obecnie wiązany z powietrza w związki chemiczne w ilościach, które znacznie przekroczyły wszelkie dotychczasowe procesy naturalne. Oblicza się, że w 1950 r. zużyto na świecie około 2 megaton nawozów azotowych, w 1960 r. około 9,7 megaton a w 1974 r. aż 40 megaton i jak przewiduje się, w 2000 r. będzie się zużywać 120—300 megaton. Inne dane wskazują z kolei na to, że światowa produkcja może podwajać się mniej więcej co sześć lat.

Dotychczas ilości azotu wiązane w przebiegu procesów naturalnych były równoważone przez ilości azotu uwalnianego do atmosfery przez organizmy zdolne rozkładać związki azotu i uwalniać azot gazowy. Obecnie zaczynają gwałtownie przeważać procesy wiązania wolnego azotu nad procesami denitryfikacji. Jeżeli więc w najbliższym czasie na świecie nie zostaną zastosowane rozsądne metody zużycia nadmiaru

związków azotowych, nadmiar związków azotu w środowisku a zwłaszcza w rzekach, jeziorach i wodach gruntowych może stać się poważnym problemem toksykologicznym. Tym bardziej, że prócz wzrastającego poziomu azotanów w ostatnim dziesięcioleciu stwierdza się w wodzie również duże ilości fosforanów, wyrzucanych obecnie w szybko zwiększających się ilościach przez przemysł chemiczny (środki piorące) i rolnictwo.

Nie będziemy tu jednak mówić o tym obszernym problemie biologicznym, jakim jest zjawisko eutrofizacji wód, choć jest to bardzo charakterystyczne dla naszych czasów zagadnienie.

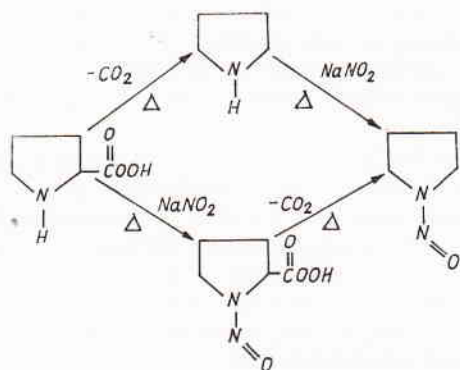
Omawiając toksykologiczne konsekwencje wysokich stężeń azotanów w środowisku musimy z braku czasu pominąć także omówienie dość częstego występowania w ostatnich czasach zatrucia u zwierząt i ludzi (zwłaszcza dzieci). Jak wiadomo w roślinach i w wodzie mogą niekiedy pojawiać się bardzo wysokie stężenia azotanów, a czasem także azotynów. W dodatku wzrost stężeń azotanów stymuluje również niektóre rolnicze środki chemiczne, np. herbicydy fenoksyoctowe. Drobnoustroje przewodu pokarmowego, a szczególnie mikroflora żwacza u przeżuwaczy (np. krów), szybko redukują azotany do 10-krotnie bardziej toksycznych azotynów. Niekiedy może to nastąpić pod wpływem drobnoustrojów już w przechowywanym materiale roślinnym. Znałe są, na przykład, zatrucia u dzieci szpinakiem.



Ryc. 1. Schemat powstawania nitrozoamin

*) Skróć referatu wygłoszonego w dniu 11.XI.1977 r. podczas konferencji naukowej nt. „Rola współczesnych technologii przemysłu spożywczego i rolnictwa w wytwarzaniu żywności wolnej od związków rakotwórczych”, która została zorganizowana w Łodzi z okazji 75-lecia Polskiego Towarzystwa Higienicznego.

Ze sprawą toksyczności azotynów wiąże się jednak inny problem toksykologiczny. Istnieje obecnie dostateczna liczba dowodów na to, że *in vitro* i *in vivo* zachodzi bardzo łatwo reakcja chemiczna między azotynami i aminami drugo-, trzecio- lub czwarto-rzędowymi, w wyniku której powstają nitrozoaminy (ryc. 1). Nitrozoaminy były od dawna znane i używane w wielu procesach przemysłowych. Jednakże zaczęły one budzić zrozumiałe zainteresowanie dopiero od 1956 r., kiedy Magee i Barnes wykazali, że dwumetylonitrozoamina wywołuje nowotwory u szczurów. Wkrótce okazało się, że spośród dużej grupy znanych związków o budowie nitrozoamin lub



Ryc. 2. Tworzenie się nitrozoprolidyny z prolina i azotynu pod wpływem ogrzewania

nitrozoamidów, większość przejawia właściwości karcinogenne, mutagenne i toksyczne, w tym zwłaszcza hepatotoksyczne. Obecnie wiadomo, że nitrozoaminy mogą wywoływać nowotwory u różnych gatunków zwierząt i w różnych częściach organizmu. Są to związki nietrwałe, ale niektóre z nich powodują powstawanie nowotworów u zwierząt doświadczalnych już nawet po jednorazowym podaniu (1, 6). Stąd nitrozoaminy stały się obok aflatoksyn niemal klasycznymi związkami, za pomocą których wywołuje się nowotwory dla celów doświadczalnych.

Nitrozoaminy stwierdzono w mączkach rybnych przeznaczonych na paszę dla zwierząt, w zbożu, dymie tytoniowym (zwłaszcza w tzw. tytoniu wysokogatunkowym), w niektórych napojach alkoholowych, grzybach, serach wędzonych, wędlinach i bekonie oraz w wielu innych produktach (7). Tworzenie się nitrozoamin z azotynu i prostych amin łatwo zachodzi w żołądku zwierząt i prawdopodobnie żołądku ludzi. Wiele przemawia za tym, że nitrozoaminy mogą również tworzyć się w innych miejscach organizmu, na przykład u niektórych gatunków zwierząt w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego, a u ludzi w pęcherzu moczowym i pochwie.

Tab. 1. Związki tworzące z azotynem nitrozoprolidynę po ogrzaniu

nitrozoprolina *	ornityna
pirolidyna	glicylo-L-prolina
spermidyna	L-proliloglicyna
prolina	kollagen

Objaśnienie: * bez dodatku azotynu.

Na podstawie istniejącego stanu wiedzy na ten temat można mówić obecnie o wielu możliwych drogach narażenia człowieka na nitrozoaminy. Na pierwszym miejscu należałoby wymienić przenikanie nitrozoamin do organizmu człowieka wraz z żywnością (wędzona żywność pochodzenia zwierzęcego, ryby, sery, jaja i mleko). Najlepiej poznany został dotychczas problem występowania i tworzenia się nitrozoprolidyny w wędzonych wędlinach, boczku i w szynce (ryc. 2, tab. 1). Bardzo istotne znaczenie może mieć tworzenie się nitrozoamin w przewodzie pokarmowym z azotynów i amin drugo- i trzeciorzędowych. Szczególne zainteresowanie toksykologów budzi tu możliwość powstawania rakotwórczych związków nitrozowych z niektórych leków, np. amidopiryny, piperazyny, disulfiramu, oksytetracykliny i innych. W ostatnich latach zwrócono również uwagę na możliwość przechodzenia nitrozoamin przez skórę w niektórych zakładach przemysłowych. W grę wchodzi tu również możliwość skażeń tą drogą na

Tab. 2. Tworzenie się N-nitrozoamin w żołądku królików: stężenia w żołądku i we krwi N-nitrozodwumetyloaminy (NDMA) i N-nitrozodwuetyloaminy (NDEA) w 1 godzinę po podaniu azotynu sodowego, dwumetyloaminy (DMA) i dwuetyloaminy (DEA) *

Nr doświad.	Liczba zwierząt	Dawki, mg/kg			Stężenia N-nitrozoamin			
		NaNO ₂	DMA	DEA	w żołądku, ug		we krwi, ug/cm ³	
					NDMA	NDEA	NDMA	NDEA
1	1	—	—	—	ns	ns	ns	ns
2	1	150	—	—	ns	ns	ns	ns
3	1	—	150	150	ns	ns	ns	ns
4	2	250	250	250	5980,6	2781,1	nb	nb
5	2	150	150	150	492,7	285,8	nb	nb
6	2	100	100	100	146,2	92,3	0,045	1,410
7	2	50	50	50	46,1	32,3	śl.	0,803
8	2	25	25	25	7,7	6,1	0,052	śl.
9	2	12,5	12,5	12,5	5,5	5,8	0,247	0,123

Objaśnienia: * wg: T. Juszkievicz, B. Kowalski, 1974; ns = nie stwierdzono, nb = nie badano, śl. = ślady.

Tab. 3. Stężenia N-nitrozodwumetyloaminy (NDMA), N-nitrozodwuetyloaminy (NDEA) i N-nitrozodwupropyloaminy (NDPA) w mleku i krwi * kóz. Wszystkie związki podano w jednorazowej dawce oralnej 30 mg/kg **

Czas h	NDMA mg/kg	NDEA mg/kg	NDPA mg/kg
1/2	9,696	4,941	5,833
1	12,279 (10,058)	11,429 (11,905)	4,900 (1,578)
2	12,260	14,683	2,100
4	8,947	8,061	0,027
6	7,051 (9,615)	4,841	0,011 (0,004)
8	6,851	0,988	0,005
12	3,462	0,218	0,004
24	0,046	0,008	śl.
36	śl.	śl.	ns

Objaśnienia: * podano w nawiasach; ** wg: T. Juszkiwicz, B. Kowalski, 1974.

skutek kontaktu z niektórymi pestycydami i kosmetykami, które mogą zawierać niekiedy nitrozoaminy. Na ostatnim Sympozjum zorganizowanym przez Międzynarodowy Ośrodek do Badań nad Rakiem (IARC, WHO) w sierpniu 1977 r. w Durham, USA przedstawione zostały prace wskazujące na możliwość skażenia nitrozoaminami organizmu z powietrza oraz dejonizowanej wody.

Istnieje wiele danych aby przypuszczać, że w określonych warunkach naturalnych w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy mogą także tworzyć się związki N-nitrozowe. Nie można wykluczyć również możliwości dostawiania się N-nitrozoamin do przewodu pokarmowego przeżuwaczy wraz z paszą lub wodą (3). We wcześniejszych doświadczeniach własnych przebadaliśmy tworzenie się N-nitrozoamin w przewodzie pokarmowym królików i stwierdziliśmy stosunkowo

wysokie stężenie N-nitrozodwumetyloaminy (NDMA) i N-nitrozodwuetyloaminy (NDEA) w żołądku i we krwi (tab. 2).

Ewentualna obecność N-nitrozoamin u zwierząt mlecznych wiąże się z prawdopodobieństwem ich pojawiania się we krwi i mleku. Znalazło to potwierdzenie w dalszych doświadczeniach wykonanych na mlecznych kozach, którym podawano sondą do żwacza N-nitrozodwumetyloaminę, N-nitrozodwuetyloaminę i N-nitrozodwupropyloaminę w dawkach pojedynczych od 1 do 40 mg/kg (2). Próbkę krwi i mleka pobierano do badań co 2 godziny aż do 36 godzin po podaniu preparatów. Stężenie nitrozoamin w badanym materiale oznaczano za pomocą chromatografii gazowej (5). Jak można było przypuszczać we krwi i mleku stwierdzono obecność rakotwórczych nitrozoamin, przy czym poziom jak też okres utrzymywania różniły się w zależności od wielkości dawek i właściwości związku (tab. 3).

Dalsze badania (4) wykonane zostały na 230 kurach nioskach podzielonych na 8 grup: 5 grup otrzymało sondą do żołądka jednorazowe dawki N-nitrozodwumetyloaminy (NDMA) w ilości 30, 10, 3, 1 i 0,1 mg/kg, dwie grupy otrzymywały ten związek przez 20 dni z wodą do picia (w dawkach 2 i 5 mg/na litr) i jedna grupa kur służyła jako kontrola doświadczenia.

Kury pobierano losowo w poszczególnych grupach w określonych odstępach czasu dla oznaczenia stężenia N-nitrozodwumetyloaminy we krwi, mięśniach, wątrobie, mózgu. Oprócz tego analizowano również jaja zniesione przez kury w poszczególnych dniach doświadczenia. Otrzymane wyniki były dość zaskakujące (tab. 4, 5, 6). Najwyższe stężenie NDMA stwierdzano we wszystkich badanych tkankach i jajach w 24—36 godzin po podaniu karcinogenu. Po pojedyn-

Tab. 4. Średnie stężenia N-nitrozodwumetyloaminy w jajach po podaniu kurom pojedynczych dawek *per os* *

Dawka mg/kg	Dni po podaniu								
	1	2	3	4	6	8	10	12	14
30	9,922	6,049	1,441	0,474	0,267	0,048	0,028	0,022	0,025
10	4,415	2,462	1,773	1,018	0,325	0,065	0,040	0,014	0,001
3	1,412	0,768	0,362	0,279	0,022	0,004	—	—	—
1	0,393	0,283	0,190	0,148	0,011	0,006	0,002	—	—
0,1	0,028	0,032	0,012	0,013	0,003	—	—	—	—

Objaśnienie: * wg: T. Juszkiwicz, B. Kowalski, 1977.

Tab. 5. Średnie stężenia N-nitrozodwumetyloaminy w mięśniach po podaniu kurom pojedynczych dawek *per os* *

Dawka mg/kg	Dni po podaniu								
	1	2	3	4	6	8	10	12	14
10	3,606	1,802	0,629	0,397	0,137	0,046	0,005	0,002	ns
1	0,421	—	0,060	—	0,015	—	ns	—	—
0,1	0,040	—	0,006	—	0,003	—	—	—	—

Objaśnienia: * wg: T. Juszkiwicz, B. Kowalski, 1977; ns — nie stwierdzono (przy wykrywalności 0,002 mg/kg).

Tab. 6. Średnie stężenia w tkankach i jajach N-nitrozodwumetyloaminy, podanej kurom w wodzie do picia *

Próbki	mg DMNA na kg wody	Czas podawania w dniach					
		1	2	3	6	12	20
Krew	2	—	—	0,032	0,031	0,054	0,047
	5	0,125	—	0,183	0,191	0,271	—
Wątroba	2	—	—	0,021	0,019	0,049	0,046
	5	0,039	—	0,074	0,103	0,117	—
Mięśnie	2	—	—	0,018	0,020	0,038	0,039
	5	0,044	—	0,086	0,100	0,123	—
Mózg	2	—	—	0,046	0,042	0,039	0,066
	5	ns	—	0,191	0,190	0,283	—
Jaja	2	0,033	0,044	0,029	0,038	0,066	0,081
	5	0,065	—	0,098	0,226	0,312	—

Objaśnienie: wg: T. Juskiewicz, B. Kowalski, 1977.

czej dawce 0,1 mg/kg jeszcze po 6 dniach można było wykryć NDMA we krwi, mięśniach, wątrobie i jajach. Po najwyższych dawkach (30 i 10 mg DMNA/kg), które wywoływały pojawienie się objawów zatrucia u kur, we wszystkich badanych tkankach i jajach stwierdzano obecność NDMA po 12 a nawet po 14 dniach. Stosowanie NDMA z wodą do picia powodowało najpierw wolny wzrost zawartości NDMA w organizmie a później, po tygodniu stężenia utrzymywały się na określonym, wahającym się poziomie (tab. 6).

Należy podkreślić, że po pojedynczych dawkach 3, 1 i 0,1 mg NDMA/kg, jak również przy podawaniu kurom NDMA z wodą do picia *ad libidum* w ilości 2 lub 5 mg/litr nie obserwowano występowania objawów zatrucia ani też spadku nieśności. Pozwala to sądzić, że hodowca może nie zdawać sobie sprawy ze stanu przechodzenia rakotwórczych nitrozoamin z paszy do kur i jaj, tzn. do żywności zwierzęcego pochodzenia.

Wydaje się oczywistym, że ewentualne konsekwencje praktyczne przedstawionych tu wniosków naszych badań, jak i cały problem przenie-

kania nitrozoamin do żywności, nie sprowadza się tylko do zakresu toksykologii weterynaryjnej. Podstawowym kryterium w ocenie znaczenia pozostałości N-nitrozoamin w żywności pochodzenia zwierzęcego musi być bezpieczeństwo człowieka — konsumenta. Stąd wynika potrzeba dalszych intensywnych badań z tego zakresu, zmierzających do lepszego poznania mechanizmu przenikania rakotwórczych związków nitrozowych do żywności i do stworzenia podstaw naukowych celem zapobiegania temu.

Piśmiennictwo

1. Druckrey H., Preussmann R., Iwankovic S., Schmähl D.: Zeitschr. Krebsforsch. 69, 103, 1967.
2. Juskiewicz T., Kowalski B.: Bromat. Chem. Toksykol. 7, 423, 1974.
3. Juskiewicz T., Kowalski B.: IARC Scientific Publications No. 14, 375, 1976.
4. Juskiewicz T., Kowalski B.: Materiały zjazdowe: Fifth Meeting on Analysis and Formation of N-Nitroso Compounds, IARC, Durham, USA, 1977 (w druku w IARC Scient. Publ. 1978).
5. Kowalski B.: Roczniki PZH 26, 375, 1975.
6. Magee P. N., Barnes J. M.: Advan. Cancer Res. 10, 163, 1967.
7. Scanlan R. A.: CRC Critical Reviews in Food Technology 5, 357, 1975.
8. Walker R.: J. Sci. Fd Agric. 26, 1735, 1975.

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

WHITE R. W.: Kontrola *Torulopsis glabrata* w przedżołądkach jagniąt karmionych glukozą na drodze doustnego stosowania nystatyny i amfoterycyny B. (Control of yeast *Torulopsis glabrata* in the stomachs of glucose fed lambs by oral dosing with nystatin and amphotericin B). Cornell vet. 67, 245—253, 1977 (2).

U nowo narodzonych jagniąt niedobór w paszy specyficznych lipidów przyczynia się do rozwoju *Torulopsis glabrata*, które fermentują glukozę z wytworzeniem dużych ilości alkoholu etylowego. W celu ograniczenia namnażania *T. glabrata* i fermentacji etanowej jagnięta w wieku 2—21 dnia życia karmiono proszkiem mlecznym wzbogaconym w witaminy, pierwiastki śladowe, 10% glukozy, nystatynę i amfoterycynę B. Nystatynę stosowano w dawce 2000 j.m./ml karmy, amfoterycynę B w dawce 1 mg/ml. Po stosowaniu tak sporządzonej karmy wystąpiło całkowite zahamowanie fermentacji przy równoczesnym obniżeniu populacji *T. glabrata*. Liczba komórek *T. glabrata* w treści przedżołądków nie przekraczała $10-10^2$ komórek/ml. Z 11 jagniąt u których stosowano antybiotyki w dużych dawkach przez długi okres czasu 7 padło.

G.

MURPHY J. M., LAVACH J. D., SEVERIN G. A.: Przegląd flory worka spojówkowego psów z klinicznymi objawami schorzeń poza gałką oczną. (Survey of conjunctival flora in dogs with clinical signs of external eye disease). J. Amer. vet. med. Ass. 172, 61—68, 1978 (1).

Badania bakteriologiczne wymazów z worka spojówkowego pochodzących od 120 psów z objawami zapalenia spojówek, zapalenia powiek, gruczołów powiekowych i owrzodzeń rogówki wykazały w 68% przypadków obecność flory bakteryjnej. W 68% przypadków przy zajęciu obydwu oczu izolowano koagulazo-dodatnie szczepy *Staphylococcus aureus*. Przy procesie chorobowym dotyczącym jednego oka *S. aureus* izolowano z 23% oczu chorych i 18% oczu zdrowych. Z 27% oczu wyosobniono koagulazo-ujemne szczepy *Staphylococcus epidermidis*, z 19% beta-hemolityczne i 17% alfa-hemolityczne paciorkowce, z 10% *Escherichia coli*, 11% *Proteus mirabilis*, 5% tlenowe laseczki zarodnikujące, 3% *Corynebacteria*, 2% *Pseudomonas aeruginosa* i 1% *Klebsiella*. Autorzy uważają, że *S. aureus* odgrywa najważniejszą rolę w zakażeniach poza gałkowych.

G.