

BOGNA BORKOWSKA-OPACKA, JADWIGA PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA

Badanie toksynotwórczych właściwości szczepów *Aspergillus ochraceus* wyosobnionych z pasz

Zakład Mikrobiologii oraz Zakład Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii,
Al. Partyzantów 55, 24-100 Puławy

Zainteresowanie obecnością grzybów w środkach spożywczych i paszach oraz niebezpieczeństwem związanym z toksynotwórczymi właściwościami tych mikroorganizmów datuje się od niedawna. W sprzyjających warunkach ekologicznych niektóre grzyby, zwane często pleśniami, wytwarzają toksyczne metabolity, które wykazują właściwości patogenne dla ludzi i zwierząt. Grzyby bytujące w żywności i paszach należą do różnych grup systematycznych. Bardzo rozpowszechnione w środowisku są gatunki rodzaju *Aspergillus* a wśród nich grzyby należące do grupy *Aspergillus ochraceus*. Wyosobniono je z gleby, warzyw, zbóż i pasz (12, 22, 23, 37). W wyniku przeprowadzonych badań nad ich właściwościami toksynotwórczymi stwierdzono, że wiele szczepów tej grupy wytwarza w trakcie przemian metabolicznych toksyczne substancje zwane ochratoksynami. Ochratoksyny są silnie nefro- i hepatotoksyczne dla zwierząt laboratoryjnych, hodowlanych i ludzi, a ponadto oddziałują na organogenezę płodową (11, 12, 13, 24). Zdolność do metabolizowania tych związków zależy w znacznym stopniu od właściwości genetycznych szczepu, odpowiedniej wilgotności, temperatury, napowietrzania i składu chemicznego substratu.

O występowaniu ochratoksyn w paszach donosili autorzy ze Stanów Zjednoczonych, Kanady, Danii, Szwecji i Jugosławii (10, 11, 12, 22). Obecność toksyn *Aspergillus ochraceus* stwierdzono również w krajowych zbożach oraz przemysłowych mieszankach paszowych (4, 8, 9, 18).

W badaniach własnych prowadzonych nad występowaniem grzybów w mieszankach paszowych dla drobiu i ich składnikach wyosobniono 2500 szczepów, które zaliczono do 114 różnych gatunków (2). W surowcach i mieszankach paszowych najczęściej stwierdzano *Absidia corymbifera*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *Fusarium moniliforme*. Celem obecnej pracy było określenie właściwości toksynotwórczych wyizolowanych szczepów należących do grupy *Aspergillus ochraceus*.

Materiał i metody

Szczepy grzybów. Przedmiotem badań było 15 szczepów grzybów z grupy *Aspergillus ochraceus*, z których 7 wyizolowano z pszenicy, 4 — z poekstrakcyjnej śruty sojowej, 2 — z przemysłowych mieszanek paszowych, 1 — z mączek rybnych oraz 1 — z siana. Do doświadczeń włączono jako kontrolne następujące szczepy ochratoksynotwórcze: M 298 (FDA) i D 29,

otrzymane w Station Pharmacologie et Toxicologie, I.N.R.A. Toulouse oraz PJ — 1 (I. Wet.) wyosobniony z sernika (6, 19). Przynależność gatunkową wymienionych grzybów określono zgodnie z uprzednio opisaną metodyką wg klucza Ropera i Fennell (1, 20). Izolaty przechowywano na skosach agaru glukozowo-ziemniaczanego w temperaturze 4°C. Ze wszystkich grzybów sporządzono hodowle jednozarodnikowe i odmładzano je przez 14-dniową hodowlę w temperaturze 26°C na skosach z agarem glukozowo-ziemniaczanym.

Podłoża i inkubacje. W badaniach stosowano podłoża płynne YES i pszenicę. Do 100 ml kolbek Erlenmayera rozlewano po 20 ml podłoża płynnego i posiewano konidiami pobranymi ze skosów agarowych. Kolbki z posiewami inkubowano w temperaturze 26°C przez 13 dni. Pszenicę (50 g) umieszczono w 500 ml kolbkach, dodawano 25 ml wody i sterylizowano przez 20 min. w autoklawie w temperaturze 121°C. Pszenicę posiewano zarodnikami uzyskanymi przez zmycie skosu agarowego 4 ml jałowej wody destylowanej z 0,05% dodatkiem Tweenu 80. Kolby z posiewami inkubowano w temperaturze 26°C przez 21 dni wstrząsając kilkakrotnie w każdym dniu hodowli.

Stosowana w badaniach metoda oznaczania zawartości ochratoksyny A składała się z etapów i była następująca.

Ekstrakcja. Izolację toksyn z podłoża płynnego prowadzono po zakwaszeniu do pH 2 z użyciem 1 n kwasu solnego. Zawartość każdej kolby zalewano 60 ml chloroformu, ogrzewano w łaźni wodnej do temperatury 40°C, następnie wytrząsano mechanicznie przez 10 min. Po zebraniu chloroformu pozostałość ponownie poddawano ekstrakcji 40 ml chloroformu. Połączone ekstrakty chloroformowe odwadniano bezwodnym siarczanem sadowym, odparowywano do sucha w temperaturze do 37°C i oczyszczano.

Ekstrakcję ochratoksyn ze spleśniałej pszenicy prowadzono wg metody Schindlera i Nesheima (21). Pszenicę w kolbach zalewano 250 ml chloroformu i ogrzewano w łaźni w temperaturze około 40°C, a następnie wytrząsano przez 30 min. Po zebraniu filtratu, pszenicę zalewano jeszcze trzykrotnie 250 ml zimnego chloroformu i każdorazowo wytrząsano przez 30 min. Połączone ekstrakty zagęszczano do sucha w odparowywaczu próżniowym.

Oczyszczanie. Oczyszczone ekstrakty z podłoża płynnego i stałego rozpuszczano w 20 ml chloroformu, mieszano z 40 ml heksanu i nanoszono na świeżo przygotowaną kolumnę o wymiarach 18×700 mm zawierającą 2 g celitu zmieszanego z 1 ml 1,25% roztworu kwaśnego węglanu sodowego. Kolumnę przemywano 100 ml chloroformu, zaadsorbowaną ochratoksynę wmywano 100 ml mieszaniny chloroform-kwas mrówkowy (99+1). Zagęszczony eluat przenoszono ilościowo do próbówki i odparowywano w strumieniu azotu.

Analiza chromatograficzna. Identyfikację i oznaczenie zawartości mikotoksyny prowadzono metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach szklanych pokrytych 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego H i aktywowanych przez 2 godz. w temp. 105°C. Płytki rozwijano w mieszaninie toluen — octan etylu — kwas mrówkowy (60+30+10) oraz benzen — metanol — kwas octowy (90+5+5). Rozwinięte chromatogramy oglądano pod analityczną lampą kwarcową przy długości fali światła 254 i 366 nm.

Oznaczenia ilościowe toksyn dokonywano fluorodensytometrycznie z użyciem densytometru firmy Vita-trom.

Testy potwierdzające. W celu potwierdzenia obecności ochratoksyn w badanych ekstraktach z hodowli grzybów, chromatogramy spryskiwano etanolowym roztworem kwaśnego węgla sodowego oraz stosowano test chemiczny z trójchlorkiem boru wg reakcji opisanej przez Nesheima i wsp. (17).

Wyniki i omówienie

W tab. 1 przedstawiono wyniki dotyczące wytwarzania ochratoksyn przez szczepy grupy *Aspergillus ochraceus* wyizolowane z pasz po hodowli kultur na podłożu płynnym YES oraz na pszenicy. Spośród 11 szczepów należących do gatunku *Aspergillus ochraceus* tylko jeden, wyizolowany z krajowej śruty pszennej, produkował ochratoksynę A zarówno na podłożu płynnym, jak i stałym. Nie wytwarzały ochratoksyn 2 izolaty *A. elegans* oraz 1 przedstawiciel gatunku *A. sclerotiorum*. Szczep *A. mellus* wyosobniony z importowanej mączki rybnej wytwarzał na pszenicy zarówno ochratoksynę A, jak i B. Nie potwierdzono właściwości toksynotwórczych tego szczepu po 13-dniowej inkubacji na pożywce YES.

Trzy szczepy kontrolne wytwarzały ochratoksyny na obu użytych w doświadczeniu substratach, przy czym M 298 i D 29 wykazały znaną z piśmiennictwa właściwość wytwarzania obu ochratoksyn (6, 16). We wszystkich przypadkach stwierdzono wyższą wydajność w produkcji ochratoksyn w przypadku hodowli grzybów na pszenicy w porównaniu z wynikami po ekstrakcji kultur z pożywki płynnej.

Określeniem toksynotwórczych właściwości grzybów grupy *A. ochraceus* zajmowali się również inni autorzy. W badaniach Laia i wsp. stwierdzono zdolności do wytwarzania ochratoksyny A w hodowlach na ziarnach soi, pszenicy i w podłożu płynnym u szczepów *A. ochraceus*, *A. melleus* i *A. sulphureus* (14). Z badań Hesseltine i wsp. wynikało, że na 44 izolaty reprezentujące 9 gatunków grzybów należących do grupy *A. ochraceus*, ochratoksyny A i B stwierdzono w ekstraktach uzyskanych z pszenicy zasiedlonej przez przedstawicieli gatunków *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum*, *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. ochraceus* i *A. petrakii* (7). Ochratoksyny nie były wytwarzane przez szczep *A. elegans*, ani też przez żaden z 6 szczepów *A. auricomus*. Najwyższą wydajność ochratoksyny uzyskano z hodowli *A. ochraceus* NRRL 3174 i NRRL 3519. Ciegler opisał produkcję ochratoksyn na podłożach płynnych Raulina-Thoma i YES przez szczepy pochodzące z tej samej kolekcji kultur (3). Badania tego autora potwierdziły ochratoksynotwórcze właściwości szczepów należących do 6 różnych gatunków grupy *A. ochraceus*, jednak wydajność syntezy toksyn na podłożu płynnym była znacznie niższa niż na ziarnie pszenicy.

Zakres wydajności wytwarzania ochratoksyny A na pożywkach naturalnych i syntetycznych określony przez różnych autorów jest bardzo rozległy i wynosi dla podłoża płynnego YES od

Tab. 1. Wytwarzanie ochratoksyn przez szczepy grupy *Aspergillus ochraceus* wyizolowane z pasz

Gatunek grzyba	Nr szczepu	Pochodzenie szczepu	Podłoże płynne*		Pszenica*	
			ochratoksyna A	ochratoksyna B	ochratoksyna A	ochratoksyna B
<i>A. ochraceus</i> Wilhelm	MD 7	DKA - star.	**	-	-	-
	S 54	śr. sojowa	-	-	-	-
	P 63	śr. pszenna	-	-	-	-
	S 72	śr. sojowa	-	-	-	-
	P 83	śr. pszenna	-	-	-	-
	MD 86	DKA - fin.	-	-	-	-
	S 90	śr. sojowa	-	-	-	-
	P 103	śr. pszenna	245,2	-	4295,1	-
	S 109	śr. sojowa	-	-	-	-
	P 130	śr. pszenna	-	-	-	-
P 158	śr. pszenna	-	-	-	-	
<i>A. melleus</i> Yukawa	MR 80	mączka rybna	-	-	17,1	12,5
<i>A. elegans</i> Gasparrin	P 53	śr. pszenna	-	-	-	-
	P 107	śr. pszenna	-	-	-	-
<i>A. sclerotiorum</i> Huber	Sl 2	siano	-	-	-	-
Szczepy kontrolne <i>A. ochraceus</i> Wilhelm	M 298	FDA	63,6	11,5	1625,9	461,0
	D 29	INRA Toulouse	266,6	46,4	2133,3	625,0
	PJ 1	I. Wet.	945,8	-	13500,0	-

Objaśnienia: * - Wyniki podano w µg/kg (podłoże stałe) lub µg/l (podłoże płynne), ** „-” - oznacza, że nie stwierdzono ochratoksyn w stężeniu powyżej granicy wykrywalności stosowanej metody. Wykrywalność wynosi 5 µg/l lub 5 µg/kg.

Tab. 2. Wyniki badań nad toksycznością szczepów grupy *Aspergillus ochraceus* przeprowadzonych w latach 1965-1978

Autorzy	Liczba badanych szczepów	Substrat	°C	Dni	% szczepów toksynotwórczych
Vander Merwe i wsp. (25)	5	mąka kukurydziana	26	14-21	20,0
Nesheim (16)	14	mąka kukurydziana	26	21	28,6
Lai i wsp. (14)	34	pszenica soja	28	8	11,8
Natori i wsp. (15)	33	podłoże płynne	25	7	5,0
Yamazaki i wsp. (26)	58	ryż	27	9	3,4
Hesseltine i wsp. (7)	44	pszenica kukurydza	28	5	45,5 43,2
Ciegler (3)	30	R-T YES**	28	5	43,3 60,0
Galtier Le Bars (6)	8	pszenica	27	12	25,0
Badania własne	15	YES	26	19	6,7
		pszenica	26	21	13,3

Objaśnienia: * R-T - podłoże Raulin-Thoma, ** YES - pożywka zawierająca 2% wyciągu drożdżowego oraz 15% sacharozy.

20 do 562 400 µg/l oraz dla pszenicy od 150 do 4 180 000 µg/kg (3, 5, 6, 7, 21).

W przeprowadzonych badaniach własnych stwierdzono dość niską wydajność tworzenia ochratoksyn przez toksynotwórcze szczepy kontrolne i szczepy badane w porównaniu do rezultatów otrzymanych przez innych autorów (6, 21). Być może decydujący wpływ na uzyskane przez nas wyniki posiadał skład substratu tym bardziej, że w prowadzonych uprzednio badaniach nad szczepem *A. ochraceus* PJ-1 wykazano prawie 20-krotnie większą wydajność wytwarzania ochratoksyny A na pszenicy przy zachowaniu tych samych warunków hodowli (19). Podobne wahania produkcyjności szczepów można znaleźć między innymi w pracach Cieglera i Hesseltine i wsp., którzy określając wydajność szczepu *A. ochraceus* NRRL 5175 uzyskali 17,8 i 358 µg ochratoksyny A na 1 g substratu (3, 7).

W tab. 2 zestawiono dane umożliwiające po-

równanie wyników własnych badań nad toksynotwórczością szczepów grupy *A. ochraceus* z rezultatami prac innych autorów (6, 15, 16, 25, 26). Zestawienie zawarte w tabeli wskazuje, iż różni autorzy wykazywali rozmaite procenty szczepów toksynotwórczych w zależności od genetycznie zakodowanych właściwości poszczególnych kultur grzybów oraz wymienionych powyżej czynników wpływających na produkcję toksyn. Najniższy procent szczepów wytwarzających ochratoksyny, bo 3,4% i 6%, stwierdzili autorzy japońscy, natomiast najwyższy — 43% i 60% — wykazali Hesseltine i wsp. oraz Ciegler (3, 7, 15, 26).

W przeprowadzonych badaniach własnych spośród 15 szczepów grupy *A. ochraceus*, wyosobnionych z pasz, właściwości ochratoksynotwórcze wykazano u 7% szczepów hodowanych na podłożu płynnym oraz u 13% szczepów zasiedlających pszenicę. Zarówno wspomniane prace innych autorów, jak i przedstawione wyniki badań własnych dowodzą, że nie wszystkie szczepy *A. ochraceus* posiadają właściwości toksynotwórcze. Nie może więc istnieć ścisła korelacja pomiędzy występowaniem poszczególnych gatunków grzybów w paszach a obecnością w nich mikotoksyn. Często zdarza się, że w paszy obecna jest toksyna, podczas gdy grzyby, które ją wyprodukowały uległy zniszczeniu w wyniku przeprowadzonych procesów technologicznych bądź zostały zastąpione przez inne gatunki.

Wyniki badań nad skażeniem mikotoksynami krajowych zbóż i pasz przemysłowych potwierdziły przypuszczenia, że także w naszym kraju istnieją dogodne warunki dla wytwarzania ochratoksyny A (4, 8, 9, 18). Uwzględniając ten fakt, jak i przedstawione powyżej wyniki badań nad właściwościami toksynotwórczymi szczepów wyizolowanych z krajowych pasz, wydaje się, że należałoby zwracać większą uwagę na obecność grzybów grupy *A. ochraceus* oraz ich toksycznych metabolitów w paszach dla zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Borkowska-Opacka B., Truszczyński M.: Pol. Arch. Wet. 21, 51, 1979.
2. Borkowska-Opacka B.: Badania nad wykrywaniem i występowaniem grzybów w przemysłowych mieszankach paszowych przeznaczonych dla drobiu, Praca hab., IWet. Puławy, 1980.
3. Ciegler A.: Canad. J. Microbiol. 18, 631, 1972.
4. Chetkowski J., Godlewska B., Radomyńska W.: Przem. Spoż. 32, 285, 1978.
5. Davis N. D., Searcy J. W., Dianer U. L.: Appl. Microbiol. 17, 742, 1969.
6. Galtier P., Le Bars J.: Ann. Rech. Vét. 4, 487, 1973.
7. Hesseltine C. W., Vandergraft E. E., Fenell D. I.: Mycologia 64, 539, 1972.
8. Juszkiewicz T., Piskorska-Pliszczynska J.: Medycyna Wet. 32, 617, 1976.
9. Juszkiewicz T., Piskorska-Pliszczynska J.: Medycyna Wet. 33, 193, 1977.
10. Krogh P., Hald B., Enolund P., Rutquist L., Swahn O.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. 82, 301, 1974.
11. Krogh P., Hald B., Pedersen E. J.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. 85, 238, 1977.
12. Krogh P., Hald B., Plestina R., Ceavic S.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. 85, 238, 1977.
13. Krogh P.: Nord. Vet. Med. 29, 402, 1977.

14. Lai M., Sementuk G., Hesseltine C. W.: Phytopathology 58, 1056, 1968.
15. Natori S., Sasaki F., Kurata H., Udagawa S., Ichino M., Saito M., Umeda M.: Chem. Pharm. Bull. Tokyo 18, 2259, 1970.
16. Nesheim S.: J. Ass. off. analyt. Chem. 50, 370, 1967.
17. Nesheim S., Hazdin N. F., Francis O. J., Langham W. S.: J. Ass. off. analyt. Chem. 56, 817, 1973.
18. Piskorska-Pliszczynska J.: Badania nad występowaniem mikotoksyn w paszach dla zwierząt w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem toksykologii ochratoksyn. Praca dokt. IWet. Puławy, 1981.
19. Piskorska-Pliszczynska J., Borkowska-Opacka B.: Bull. vet. Inst., Puławy (w druku).
20. Raper K. B., Fenell D. I.: The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Comp., Baltimore 1965.
21. Schindler A. F., Nesheim S.: J. Ass. off. analyt. Chem. 53, 89, 1970.
22. Scott P. M., van Walbeek W., Kennedy P., Anyety D.: J. Agric. Fd Chem. 20, 1103, 1972.
23. Shotwell O. L., Hesseltine M., Goulden M., Vandergraft E. E.: Cereal Chem. 47, 700, 1970.
24. Suzuki S., Kazuka Y., Satoki T., Yamazaki M.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 34, 479, 1975.
25. Van den Merwe K. I., Steyn P. S., Fourie L., Scott B., Theron J. J.: Nature 205, 1112, 1965.
26. Yamazaki M., Maebayashi V., Miyaki U.: Appl. Microbiol. 20, 452, 1970.

Adres autora: doc. dr hab. Bogna Borkowska-Opacka, ul. Leśna 21/65, 24-100 Puławy.

Борковская-Опацкая Б., Пискорская-Плищинская Я. — Исследование токсинообразовательных свойств штаммов группы *Aspergillus ochraceus*, изолированных из кормов

Цель работы состояла в определении токсинообразовательных свойств грибов группы *Aspergillus ochraceus*, изолированных из кормов. Штаммы разводили на жидкой среде YES, а также на пшенице. Охратоксины экстрагировали хлороформом и подвергали очистке на хроматографической колонке. Содержание охратоксинов А и В в субстратах, примененных для разведения, определили, применяя методы тонкослойной хроматографии с денситометрической детекцией. Среди 15 штаммов, подвергнутых исследованию, токсинообразовательные свойства обнаружили у 2 изолятов (13,3%), принадлежавших к видам *A. ochraceus* и *A. melleus*. Штамм *A. ochraceus*, изолированный из отечественной пшеницы, образовал охратоксин А на жидком и твердом субстратах. *A. melleus*, происходящий из импортированной рыбной муки, синтезировал как охратоксин А, так и В лишь на пшенице. Контрольные штаммы показали способность к производству охратоксинов на обоих субстратах. В случае культуры штаммов на пшенице получили высшую производительность чем на жидкой среде.

Borkowska-Opacka B., Piskorska-Pliszczynska J. — Toxinogenic properties of *Aspergillus ochraceus* fugi strains isolated from feed mixtures

The aim of the study was to determine ochratoxinogenic properties of fungal strains belonging to the *Aspergillus ochraceus* group isolated from mixed feeds. The strains were grown in liquid medium (YES) and on wheat. Ochratoxins were extracted with chloroform and purified on chromatographic column. Ochratoxin A and B contents were determined by TLC with densitometric detection. Two isolates (13.3%) out of 15 investigated strains showed toxinogenic properties. They belonged to species *A. ochraceus* and *A. melleus*. The strain of *A. ochraceus* isolated from home-grown wheat produced ochratoxin A on liquid and solid medium. *A. melleus* isolated from imported fish meal synthesised both ochratoxin A and B on wheat. Control strains showed the ability to produce ochratoxin on the both substrates. A higher yield of toxin was obtained on wheat than in liquid medium.