

Jerzy Chelkowski

Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy

Wersja on-line

www.cropnet.pl/mycotoxin

Spis treści

Wstęp	3
1.0. Przegląd dotychczasowych badań nad mikotoksynami	6
1.1. Mikotoksyny które spowodowały choroby ludzi	7
1.2. Zootoksyczne działanie mikotoksyn	8
1.3. Właściwości fitotoksyczne mikotoksyn	13
1.4. Właściwości antybiotyczne mikotoksyn	15
1.5. Ogólne omówienie grzybów toksynotwórczych	16
1.6. Znaczenie mikotoksyn we współczesnym rolnictwie	19
2.0. Występowanie ważnych mikotoksyn i mikotoksykoz	26
2.1. Aflatoksyny	27
2.2. Nefrotoksyny: ochratoksyna A i cytrynina	35
2.3. Zearalenon	47
2.4. Trichoteceny	56
2.5. Fumonizyny	63
2.6. Patulina	66
3.0. Los mikotoksyn w procesach przetwarzania żywności	70
3.1. Nasiona roślin oleistych	70
3.2. Ziarno zbóż	72
3.3. Owoce i warzywa	74
4.0. Eliminacja i unieczynnianie mikotoksyn	74
4.1. Unieczynnianie	75
4.2. Wykorzystywanie skażonej paszy	75
5.0. Zapobieganie tworzeniu się mikotoksyn	76
6.0. Metody oznaczania zawartości mikotoksyn i oceny ich toksyczności	78
6.1. Oznaczenie zawartości mikotoksyn	78
6.2. Ocena toksyczności metabolitów grzybów	80
Załączniki	
Załącznik A. UZUPEŁNIAJĄCE OMÓWIENIE MIKOTOKSYN	83
Załącznik B. WYBRANE PIŚMIENNICTWO	91
Załącznik C. EUROPEAN MYCOTOXINS REGULATIONS	100

Streszczenie

Zawartość mikotoksyn jest ważnym wskaźnikiem jakości ziarna zbóż, produktów spożywczych i pasz. Najważniejsze pod względem ekonomicznym i toksykologicznym w skali europejskiej i światowej jest pięć mikotoksyn: **aflatoksyna B₁**, **ochratoksyna A**, **deoksyniwalenol**, **zearalenon** i **fumonizyna B₁**. Mikotoksyny te tworzone są przez grzyby toksynotwórcze, które często są obecne jako składnik mikroflory gleby, płodów rolniczych i ogrodniczych. Z uwagi na częste występowanie, wymienione mikotoksyny uznane zostały za metabolity grzybów, najczęściej zanieczyszczające płody rolne, pasze i żywność. Ochratoksyna A jest metabolitem wytwarzanym w ziarnie zbóż po żniwach przez grzyby saprofityczne rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* w warunkach nieprawidłowego przechowywania ziarna zbóż. Aflatoksyna B₁ i jej pochodne zanieczyszczają importowane arachidy, śruty arachidowe i śruty innych roślin oleistych. Występowanie tych metabolitów stwierdzono w ziarnie kukurydzy na kontynencie amerykańskim, a ostatnio w Europie południowej we Włoszech. Deoksyniwalenol i zearalenon i ich pochodne wytwarzają patogeniczne gatunki *Fusarium*, porażające kłosa i ziarniaki zbóż drobnoziarnistych i kolby kukurydzy we wszystkich strefach klimatycznych. Fumonizyna B₁ jest bardzo częstym zanieczyszczeniem ziarna kukurydzy w klimacie subtropikalnym.

Zawartość liczby zarodników grzybów w gramie surowca lub produktu, również jest wymiernym wskaźnikiem jakości – szczególnie ziarna zbóż i mieszanek paszowych sypkich i granulowanych.

Koszty ekonomiczne, które ponoszą producenci na skutek zanieczyszczenia mikotoksynami ziarna zbóż, nasion roślin oliwowych i pasz szacowane są na blisko miliard dolarów rocznie (Task Force Report 2003).

Kraje o zaawansowanej technologii produkcji rolniczej i produkcji żywności wykazują mniejsze ryzyko zanieczyszczenia płodów rolnych, żywności i pasz mikotoksynami niż kraje rozwijające się Azji, Ameryki Południowej i Afryki.

Wstęp

W opracowaniach przeglądowych na temat mikotoksyn wyróżnia się dwie daty jako najistotniejsze w historii badań nad tą grupą metabolitów

grzybowych: rok 1711, w którym pojawiły się pierwsze naukowe dane o toksyczności sklerot sporyszu i rok 1960, w którym rozpoczęto badania nad aflatoksynami po wystąpieniu masowego zatrucia indyków w Anglii, gdyż od tego momentu rozpoczął się bardzo dynamiczny rozwój badań nad metabolitami grzybów.

Pod nazwą mikotoksyny ujmuje się obecnie metabolity drugorzędowe (ang. secondary metabolites) grzybów mikroskopowych, które zasadniczo nie są niezbędne do życia wytwarzającego je grzyba i wykazują działanie toksyczne dla człowieka, zwierząt, roślin i drobnoustrojów. Dany metabolit grzyba może więc być określany zootoksyną, czyli związkiem toksycznym dla człowieka i zwierząt, fitotoksyną, gdy hamuje wzrost i metabolizm roślin, lub antybiotykiem gdy inhibuje wzrost drobnoustrojów: bakterii i grzybów.

W pracach o charakterze toksykologicznym pojęcie mikotoksyna jest na ogół zawężane tylko do zootoksyn. W pracach fitopatologicznych brana jest pod uwagę ich fitotoksyczność. Rozwój badań nad antybiotykami, zapoczątkowany odkryciem penicyliny przez Aleksandra Flemminga w 1929 r., ukształtował i utrwalił przekonanie, że grzyby wytwarzają przede wszystkim dobroczynne antybiotyki.

Śmierć 100 000 indyków w 1960 r. na farmach drobiowych w Anglii, wywołana, jak się wkrótce okazało, przez aflatoksynę – metabolit grzyba *Aspergillus flavus*, spowodowała zasadnicze zrewidowanie oceny działania metabolitów grzybów na inne organizmy.

W ciągu 15 lat – od roku 1960 do 1975 – pojawiło się ponad 2000 prac naukowych dotyczących mikotoksyn. Prace te wchodziły w zakres różnych dyscyplin naukowych.

Ostatnio pojawiło się wiele stron internetowych, zawierających informacje o mikotoksynach, a w wyszukiwarce Google odnaleźć można ponad milion rekordów, dotyczących mikotoksyn.

Dzięki tym pracom zbadano budowę i właściwości kilkuset metabolitów grzybów. Ustalono też, które z tych metabolitów mogą być ważne ze względu na zagrożenie zdrowia ludzkiego i powodowanie poważniejszych szkód w produkcji zwierzęcej. Wyjaśniono też przyczynę szeregu zatruc i chorób ludzi i zwierząt, notowanych wcześniej przez medycynę ludzką i weterynaryjną. Okazało się w dalszych badaniach, że szereg metabolitów grzybów wykazuje równocześnie silne działanie zootoksyczne, fitotoksyczne i antybiotyczne. Typowym przykładem może być mikotoksyna patulina – metabolit rozpowszechnionego grzyba *Penicillium expansum*, powodującego mokrą zgniliznę jabłek. Również takie metabolity jak T-2 toksyna i deoksyniwalenol (=womitoksyna) wytwarzane przez często występujące patogeny roślin z rodzaju *Fusarium* - wykazują silną aktywność fitotokyczną oprócz zootoksyczności. W tym świetle należy

mówić nie tyle o zootoksynach, fitotoksynach czy antybiotykach, lecz o działaniu toksycznym, fitotoksycznym lub antybiotycznym danej mikotoksyny. Antybiotyki stosowane w medycynie odznaczać się muszą stosunkowo niską toksycznością dla organizmu człowieka i zwierząt.

Z punktu widzenia praktyki rolniczej mikotoksyny można podzielić na grupę powstającą w wyniku chorób roślin przed żniwami lub metabolity tworzące się w trakcie niewłaściwego przechowywania ziarna zbóż i nasion roślin oleistych.

Powstawanie mikotoksyn może mieć ścisły związek z tzw. chorobami poźniwnymi ziarna zbóż, roślin oleistych, owoców i warzyw. Proces, nazywany potocznie pleśnieniem płodów na skutek rozwoju na nich grzybów, prowadzi często do powstania mikotoksyn. Wytwarzanie mikotoksyn w tych produktach zagraża zdrowiu ludzkiemu i efektem produkcji zwierzęcej, a związane jest głównie z nieodpowiednim przechowywaniem produktów roślinnych po zbiorach.

Tworzenie mikotoksyn związane być może także z chorobami roślin rozwijającymi się w polu i rozwojem patogenów głównie rodzaju *Fusarium* w tkankach roślinnych. Według dotychczasowych prac mikotoksyny najczęściej tworzone są w roślinach kukurydzy, przede wszystkim w kolbach, i stąd najwięcej kłopotów z mikotoksynami występuje w krajach uprawiających na znacznych arealach kukurydzę na ziarno lub tzw. CCM (corn cob mixture) – dla produkcji zakiszanych kolb. Znaczące zanieczyszczenia mikotoksynami, wytwarzanymi przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, stwierdzono też w ziarnie pszenicy, pszenżyta i żyta oraz jęczmienia i owsa przy występowaniu fuzariozy kłosów tych zbóż.

W związku z wykorzystywaniem do produkcji żywności i pasz glonów morskich rozwijają się też badania nad wytwarzanymi przez te organizmy toksycznymi metabolitami nazwanymi fykotoksynami (w języku angielskim fycotoxins)

Badaniami objęto też te grzyby, które są stosowane do wytwarzania niektórych produktów spożywczych, takich jak sery typu Camembert czy Roquefort, kiełbasy typu Salami i inne, w celu wyselekcjonowania szczepów, które będą mogły być bezpiecznie stosowane do produkcji żywności jako nie tworzące toksyn (Leistner 1984).

Okazuje się, że zdolność do tworzenia mikotoksyn jest naturalną i dosyć często występującą cechą w świecie drobnoustrojów należących do królestwa grzybów, z którą trzeba się liczyć. Wytwarzać je mogą zarówno grzyby będące typowymi saprofitami, biorącymi udział w mineralizacji szczątków organicznych, głównie roślinnych, jak i grzyby o właściwościach chorobotwórczych w stosunku do roślin czy zwierząt.

Możliwe ze względów technicznych było podanie tylko około 200 pozycji literatury z kilkunastu tysięcy wydanych. Jest szereg wydań książkowych o

mikotoksynach w języku angielskim. Bogatym źródłem bibliografii jest książka Moreau 1979. Tom ten podaje już ponad trzy tysiące pozycji piśmiennictwa w bardzo przejrzystym układzie oraz prace o charakterze monografii.

W roku 2003 wydano godną polecenia zwięzłą publikację światowych ekspertów z zakresu mikotoksyn „Task Force Report”.

Adresy internetowe wybranych stron poświęconych mikotoksynom:

Strona	Uwagi
www.mycotoxicology.org	Mycotoxicology Newsletter
www.mycotoxins.org	EMAN European Mycotoxin Awareness Network
www.plant.wageningen	Mycotoxin in Cereal Chain – opracowanie projektu europejskiego
www.ochra-wine.com/ur.nl/projects/fusarium	Strona projektu europejskiego dotycząca mikotoksyn zanieczyszczających winogrona i wino
www.scabusa.org	Baza prac badawczych i hodowlanych nad fuzariozą pszenicy i jęczmienia (United States Wheat and Barley Scab Initiative)

Uwaga!!! Strony internetowe tracą swoją aktualność lub są likwidowane. Stają się nieosiągalne, gdy nie jest opłacane podtrzymywanie domeny.

1.0. Przegląd dotychczasowych badań nad mikotoksynami

W następnych rozdziałach zostanie omówione oddziaływanie mikotoksyn na organizm człowieka, zwierząt gospodarskich i zwierząt doświadczalnych, na rośliny, o ile wiąże się to z procesami patogenezy, oraz na drobnoustroje. Mikotoksyny o znaczącym udziale w patogenezie, są istotne dla zdrowotności człowieka i zwierząt wówczas, gdy mikotoksyna wydzielana przez grzyb jest zootoksyną i w procesach chorób roślin w polu nagromadza

się w tkankach roślinnych, przeznaczonych na paszę lub do produkcji żywności.

Z uwagi na ogromną liczbę prac dotyczących mikotoksyn, jaka dotychczas się ukazała, dokonano takiego wyboru materiału, aby przedstawić przede wszystkim zagadnienia uznane za istotnie ważne w praktyce rolniczej i przemysłowej w obecnym momencie.

1.1. Mikotoksyny które spowodowały choroby ludzi

Poza ostrymi zatruciami, wywołanymi przez spożycie produktów zbożowych zanieczyszczonych sporyszem, znanymi od wielu wieków, a aktualnymi do dziś, wymienić można cztery inne mikotoksykozy ludzkie. Nazwą mikotoksykoza obejmuje się zatrucie ostre, chroniczne lub przewlekłe, wywołane spożyciem toksyn grzybowych, w odróżnieniu od mikozy - choroby wywołanej rozwojem grzybów w organizmie ludzkim lub zwierzęcym, jaką jest np. często występująca grzybica skóry lub rzadsza, lecz bardzo groźna grzybica płuc.

Grzyby rodzaju *Claviceps* wytwarzające skleroty zawierające szereg toksyn w kłosach pszenicy, żyta, pszenżyta, jęczmienia i wielu gatunków traw (głównie życicy i kostrzewy) są przyczyną wielu zatruc zwierząt na kontynencie australijskim i w Nowej Zelandii. Brak jest informacji o występowaniu zatruc na innych kontynentach. Zwierzęta - owce i bydło - przebywają cały rok na pastwiskach i po spożyciu razem z trawą sklerot sporyszu ulegają zatruciu z takimi objawami jak paraliż („stagger symptoms”), kończący się często śmiercią. Grzyby *Claviceps* mogą być endofitami i zasiedlać rośliny bezobjawowo. Skutki zatruc toksynami sporyszu znane były w Europie od Średniowiecza.

Od 1894 r. w armii japońskiej występowała choroba przejawiająca się porażeniem układu nerwowego i paraliżem, określana nazwą "kakke", Nazwano ją też **chorobą żółtego ryżu**. Objawy jej są podobne do objawów beri-beri – awitaminozy wywołanej brakiem w diecie witaminy B₁. Badania z ostatnich lat wykazały, że powodują ją metabolity grzybów z rodzaju *Penicillium*: citreowirydyna, luteoskiryna, islanditoksyna, cytrynina i inne (patrz załącznik A). Rozwój tych grzybów, któremu sprzyja wilgotny klimat Japonii, powoduje żółte zabarwienie ziarna ryżu. Powstawanie toksyn tych grzybów w większym nasileniu obserwowane jest na Dalekim Wschodzie, choć wytwarzające je grzyby występują także na ziarnie zbóż w Europie (Betina 1989, Chełkowski 1991, Logrieco 2001, Logrieco &Visconti 2004).

W latach 1890, 1913, 1941–1945 w rejonie Ussuryjskim w okolicy Orienburga na Syberii wystąpiły zatrucia produktami zbożowymi, nazwane

żywnościową białaczką toksyczną (ang. alimentary toxic aleukia - ATA). Objawy zatrucia: wymioty, porażenie układu nerwowego i krwiotwórczego wystąpiły u ok. 10% ludności, ze skutkami śmiertelnymi u 60% chorujących. Przyczyną okazał się rozwój na przechowywanym ziarnie zbóż grzybów z rodzaju *Fusarium* (głównie *F. sporotrichioides* i *F. poae*), wytwarzających metabolity zidentyfikowane jako trichoteceny, z których najsilniej toksyczna była T-2 toksyna. Schorzenie miało charakter endemiczny. Wymieniony rejon cechował się występowaniem toksynotwórczych grzybów i korzystnymi warunkami dla ich rozwoju i wytwarzania toksyn: dużą wilgotnością i niską temperaturą panującą w pryzmach zboża przechowywanego zimą pod śniegiem (Miller & Trenholm 1994). Te same toksyny są do dzisiaj przyczyną licznych zatruc zwierząt w różnych krajach, co zostanie omówione w następnych rozdziałach.

Po drugiej wojnie światowej stwierdzono w krajach bałkańskich schorzenie nazwane **endemiczną nefropatią bałkańską**. W rejonach endemicznych, np. w byłej Jugosławii, ok. 4% ludności choruje na nieuleczalną chorobę nerek. Przyczynę schorzenia upatruje się w obecności w żywności mikotoksyny – ochratoksyny A, silnie uszkadzającej nerki. Toksyna powstaje w czasie magazynowania ziarna zbóż i z paszą przedostaje się do mięsa trzody i wyrobów mięsnych, szczególnie produkowanych z podrobów, a także kiełbas i szynki (Krogh 1976, 1977; Krogh i in. 1974, 1976, 1977).

W ostatnich latach stwierdzono w wielu wioskach w Indiach i w Kenii endemiczne występowanie u ludzi i zwierząt domowych pierwotnych **nowotworów wątroby** na skutek spożywania orzechów arachidowych zawierających aflatoksynę. Aflatoksyna jest najsilniejszym ze znanych dotąd związków rakotwórczych i dłuższe jej spożywanie w ilościach znacznie mniejszych od dawki śmiertelnej indukuje nowotwory wątroby (Goldblatt 1969, Bennett i Klich 2003).

1.2. Zootoksyczne działanie mikotoksyn

Obecnie poznano już kilkaset metabolitów wytwarzanych przez grzyby i mających właściwości toksyczne, ale jak wskazują dostępne informacje, tylko metabolity z pięciu grup powodują znaczne straty w produkcji zwierzęcej ze względu na ich powszechne występowanie. Wykazano, że mikotoksyny te, a mianowicie: aflatoksyny, ochratoksyna A, zearalenon, trichoteceny i fumonizyny, są przyczynami mikotoksykoz, gdyż zależność między obecnością w paszy mikotoksyny i charakterystycznymi objawami zatrucia, opisanymi przez lekarzy weterynarii, została w tych przypadkach jednoznacznie udokumentowana.

Szkodliwością mikotoksyn dla zwierząt domowych i laboratoryjnych zajmują się naukowe placówki medyczne i weterynaryjne. Wyznaczane są takie progi szkodliwości mikotoksyn w żywności i paszach, które powodują zatrucia ostre, podostre i chroniczne organizmu ludzkiego, zwierząt domowych i laboratoryjnych. Opisywane są coraz dokładniej objawy kliniczne i fizjologiczne, powodowane przez mikotoksyny zarówno zatrucia na poziomie całego organizmu jak i na poziomie tkanek i komórek. Aktualnie w ostatnich latach zainteresowania tych placówek koncentrują się na niższych zawartościach mikotoksyn w żywności i paszach, powodujące efekty zatruc chronicznych, które w poprzednich badaniach nie były często dostrzegane (Bennett i Klich 2003).

Zależnie od organu, który jest uszkodzany, mikotoksyny dzielimy na:

- Hepatotoksyny – uszkodzają wątrobę (aflatoksyna B₁ i inne)
- Nefrotoksyny – uszkodzają nerki (ochratoksyna A)
- Kardiotoksyny – powodują choroby serca i układu krwionośnego (moniliformina)
- Dermatotoksyny – prowadzą do uszkodzeń skóry i błon śluzowych (T-2 toksyna i inne trichoteceny)
- Neurotoksyny – wywołują uszkodzenia centralnego układu nerwowego (fumonizyna B₁, alkaloidy sporyszu)
- Pulmotoksyny powodują obrzęki płuc (fumonizyna B₁)

Jako oddzielną grupy wydzielono:

- Mikohormony – działające na regulację hormonalną (zearalenon i pochodne)
- Immunotoksyny – wpływają negatywnie na odporność organizmu (trichoteceny i szereg innych mikotoksyn)
- Związki rakotwórcze – przyczyniają się do powstawania nowotworów (aflatoksyny, fumonizyny, ochratoksyny)

Metabolity grzybów *Fusarium* zaliczają się do tych mikotoksyn, które lokują się we wszystkich powyższych grupach (Fink-Gremmels 1999).

O ile profil metabolitów tworzonych przez gatunki *F. graminearum*, *F. culmorum* i *F. cerealis* jest stosunkowo dobrze poznany, to mało poznane są jeszcze metabolity grzybów *F. avenaceum* i *F. poae*, które w szeregu krajach europejskich występują często na kłosach zbóż. Gatunek *F. avenaceum* rozpoznano w ostatnich latach jako tworzący enniatyny oprócz moniliforminy. Stale jeszcze mało jest danych o toksyczności tych metabolitów. *F. poae* zaliczyć można do gatunków o niskiej agresywności względem kłosów jednak w korzystnych dla niego warunkach może zasiedlać kłosa zbóż i kolby kukurydzy. Izolaty tego gatunku wstępnie

rozpoznano jako tworzące ponad 10 mikotoksyn: toksyny T-2 i HT-2, DAS, niwalenol, fuzarenon, oraz enniatyny A, A₁, B, B₁ (Chełkowski i in.2006).

Z uwagi na możliwość występowania w ziarnie zbóż kilku mikotoksyn równocześnie – zachodzi pytanie o ich oddziaływanie synergistyczne na organizm człowieka i organizmy zwierzęce.

Występowanie mikotoksyn wywołujących mikotoksykozy, zasadnicze objawy chorobowe, aktualną ocenę zagrożenia żywności i pasz w Polsce i na świecie i inne zagadnienia, szczegółowo zostaną omówione w dalszej części tego opracowania przy opisach poszczególnych toksyn. Zatrucia ostre, podostre i przewlekłe, omówione dalej na przykładzie ochratoksyn, są wspólne dla wszystkich mikotoksyn i charakteryzują się różnymi objawami narządowymi specyficznymi dla określonej toksyny. Dla aflatoksyn najbardziej typowe jest wywoływanie pierwotnych nowotworów wątroby, jej uszkodzeń i przerostu kanalików żółciowych, dla cytryniny i ochratoksyny – nefropatia, dla zearalenonu – zaburzenia w funkcjonowaniu narządów rozrodczych, dla mikotoksyn z grupy trichotecen – podrażnienia skóry, wymioty, wewnętrzne krwawienia, uszkodzenie układu krwiotwórczego.

W związku z właściwościami zarówno fitotoksycznymi, jak i zootoksycznymi mikotoksyn wytwarzanych przez różne grzyby patogeniczne dla roślin, wyłania się problem ewentualnej szkodliwości dla zwierząt pasz, w skład których wchodzi rośliny porażone w polu przez grzyby patogeniczne należące do rodzajów, u których przedstawiciele w kulturach laboratoryjnych stwierdzono tworzenie toksyn. Silne porażenie roślin takimi grzybami może się wiązać z gromadzeniem w ich tkankach metabolitów grzybów toksycznych dla karmionych tymi roślinami zwierząt. Szkodliwość ta może wzrastać, przy niewłaściwym przechowywaniu tych roślin po zbiorach, umożliwiającym dalszy rozwój toksynotwórczym grzybom np. *Fusarium culmorum*, czy *F. graminearum* (Tuite 1979). Dotyczy to przede wszystkim ziarna kukurydzy, która w czasie zbiorów wykazuje dość znaczną aktywność wodną (zawartość wody przekracza ziarna 20%).

Szereg mikotoksyn cechuje się różnorodną aktywnością biologiczną, gdyż wykazuje działanie: rakotwórcze, cytotoksyczne, embriotoksyczne, teratogeniczne i mutageniczne. Oprócz działania rakotwórczego groźne dla zwierząt, jak i dla ludzi, jest działanie embriotoksyczne i teratogeniczne mikotoksyn. Prowadzi ono do uszkodzeń płodu w wyniku spożycia mikotoksyn, z występowaniem potworkowości i zatrucia płodu łącznie. Działanie mutageniczne bada się na bakteriach, głównie *Salmonella typhimurium*. Jego wynikiem może być np. uzjadliwienie się szczepów chorobotwórczych bakterii na skutek ich zmutowania.

Przy zatruciu ostrym następuje śmierć całego stada lub znacznego

procentu zwierząt. Miało to wiele razy miejsce w różnych krajach. Innego rodzaju niebezpieczeństwo stwarzają zatrucia podostre i przewlekłe. Nie dochodzi wtedy do upadków zwierząt, lecz obecność mikotoksyn w paszy nie pozostaje bez wpływu na zwierzęta. Z jednej strony przy dłużej trwającym karmieniu zwierząt paszą, zawierającą mniejsze od śmiertelnych ilości mikotoksyn, zachodzi zmniejszenie przyrostów masy, gorsze wykorzystanie paszy, zmniejszenie odporności na choroby, uszkodzenie wątroby, nerek i innych narządów. W efekcie prowadzi to do strat ekonomicznych dla producentów zwierząt (Kryński, Rokicki 1983, Task Force Report 2003). Może to nie być zauważone, o ile nie dojdzie do upadków zwierząt.

Z drugiej strony, przy przeznaczeniu na paszę porażonych płodów mikotoksyny dostają się do krwioobiegu skarmianych zwierząt. O ile zawartość mikotoksyn w paszach nie przekracza ilości, które organizm zwierzęcia może metabolizować, unieczynniać i wydalać z moczem, toksyny nie kumulują się w tkankach. Kiedy próg ten zostanie przekroczony, następuje akumulacja toksyn w wątrobie, nerkach, mięśniach i przechodzą one do mleka, a u drobiu do jaj, co stwarza zagrożenie dla zdrowia ludzkiego.

Jak na razie dokładniejsze dane opracowano dla aflatoksyn i ochratoksyny A. Naturalne występowanie aflatoksyn w tkankach zwierząt stwierdza się w mleku krowim i przetworach mlecznych. W latach 1972–1977 zawartość aflatoksyny M_1 w mleku w krajach europejskich wynosiła do $6,5 \mu\text{g/l}$, w Indiach do $13 \mu\text{g/l}$ (World Health Organization. 1979). Aflatoksyny mogą też przechodzić do wątroby, mięśni i innych tkanek, jednak na razie wykazano to jedynie w laboratoryjnych badaniach modelowych. Trzoda karmiona paszą zawierającą aflatoksynę B_1 w ilości ok. 4 mg/kg , po 19 dniach akumulowała aflatoksyny B_1 i M_1 odpowiednio: w wątrobie $6,1$ i $1 \mu\text{g/kg}$, w nerkach $0,26$ i $1,32 \mu\text{g/kg}$, a w mięśniach $0,1$ i $0,05 \mu\text{g/kg}$.

Z danych tych wynika, że organizmy zwierzęce w poważnym stopniu rozkładają aflatoksyny, a ilości akumulowane w mięśniach i wątrobie oraz zawarte w jajach, stanowią niewielki procent toksyn spożywanych przez zwierzęta z paszą. Oznacza to, że organizmy zwierzęce pełnią rolę filtru, zmniejszając zagrożenie człowieka. Ilustruje to określony eksperymentalnie stosunek stężenia aflatoksyny B_1 w paszy do jej stężenia w różnych tkankach zwierząt wynoszący w przypadku:

wątroby wołowej	14 000:1
wątroby brojlerów	1 200:1
wątroby świńskiej	800:1
kur niosek (pasza : jajo)	2 000:1
krów mlecznych (pasza : mleko)	300:1

Dokładne badania nad akumulacją w tkankach ochratoksyny A wykonano w krajach skandynawskich z uwagi na jej częste występowanie w tkankach trzody i silną toksyczność tego metabolitu.

Jak wynika z danych zawartych w Tabeli 1, stężenie ochratoksyny A we krwi jest 1,5 razy większe niż w paszy, a w nerkach i wątrobie tylko około trzykrotnie niższe niż w paszy. Ochratoksyna A nie jest więc tak znacznie rozkładana w organizmach trzody jak aflatoksyna B₁ i znaczny jej procent jest akumulowany w tkankach. Toteż przykładowo w Danii w 1978 r. wprowadzono ustawowo nakaz kasacji takich sztuk trzody, które zawierały w nerkach ochratoksynę A w ilości przekraczającej 10 µg/kg. W mięśniach poziom ochratoksyny A będzie wynosił wtedy średnio 3,8 µg/kg, a w wątrobie 6,3 µg/kg.

Częstość występowania nefropatii mikotoksynowej, określona na podstawie oceny nerek w rzeźni po uboju trzody, wynosi 10–80 przypadków (w niektórych rejonach do 650) na 100 000 ubijanych świń. Ochratoksynę A stwierdzono w 35% nefropatycznych nerek na poziomie 2–68 µg/kg (Krogh i in. 1974; Krogh 1976, 1977). Należy zaznaczyć, że ochratoksynę A mogą zawierać nie tylko nerki ze zmianami nefropatycznymi, ale także nerki takich zmian nie wykazujące. W mięśniach kurcząt pobranych z rzeźni stwierdzono poziom ochratoksyny A dochodzący do 29 µg/kg (Krogh 1977; Elling i in. 1975). Przechodzenie ochratoksyny A z paszy do mięśni brojlerów wykazano doświadczalnie (patrz rysunek 6). Wykrywalne poziomy toksyny akumulują się w wątrobie i mięśniach przy zawartości ochratoksyny A w paszy w ilości 1 mg/kg, jednak zanikają całkowicie po 4 dniach karmienia zwierząt paszą wolną od ochratoksyn. W wątrobie brojlerów zawartość ochratoksyny A była 30–60-krotnie niższa niż w paszy, a w mięśniach 300–600 razy niższa (Goliński i in. 1983b).

TABELA 1.

Względne zawartości ochratoksyny A w tkankach trzody w zależności od jej zawartości w paszy i krwi (Hult, Hökby 1979; Krogh 1977).

Tkanka	Względne stężenie ochratoksyny A przy przyjęciu jej stężenia we krwi za 100%
Krew	100
Plazma krwi	270
Nerki	21
Wątroba	17
Mięśnie	9,5
Tłuszcz	4,8
Pasza	66,7

Zasadniczą trudnością przy ocenie akumulacji mikotoksyn w tkankach zwierzęcych jest możliwość ich kowalencyjnego wiązania się z makrocząsteczkami: białkami, kwasami nukleinowymi lub cukrowcami. Tak związane toksyny nie są ekstrahowane w trakcie procesu analitycznego i stąd nie jest możliwe wykazanie ich obecności standartowo stosowanymi metodami ich analizy. Ewidentnym przykładem istnienia tak związanych aflatoksyn było wywołanie typowego dla tych toksyn nowotworu wątroby u pszczoł kalifornijskich w wyniku podawania mleka w proszku, w którym nie stwierdzono aflatoksyn metodą chemiczną. Aflatoksyna B₁ jest w wątrobie aktywowana do formy epoksydu, który z kolei wiąże się silnie z kwasami nukleinowymi. Dopiero forma epoksydowa jest aktywna w organizmie zwierząt. W ziarnie pszenicy i kukurydzy wykazano w ostatnich latach występowanie glikozylowanych pochodnych zearalenonu i deoksyniwalenolu.

1.3. Właściwości fitotoksyczne mikotoksyn

Literatura dotycząca fitotoksycznego działania metabolitów grzybów jest bardzo obszerna i doczekała się już opracowań monograficznych i podręcznikowych (Packa 2005, Chełkowski 1995). W nawiązaniu do mikotoksyn, omawianych w poprzednich rozdziałach, należałoby wprowadzić rozróżnienie na metabolity grzybów saprofitycznych, np. z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium*, i związki wytwarzane przez grzyby patogeniczne mające zdolność wnikania do komórek roślinnych.

Mikotoksyny wytwarzane przez pierwszą grupę grzybów, takie jak: aflatoksyny, ochratoksyna A, cytrynina i patulina, będące silnymi zootoksynami, wykazują także inhibicyjny wpływ na przemianę materii roślin, np. hamują biosyntezę białka, kiełkowanie nasion oraz wzrost siewek zarówno korzonków, jak i koleoptyli, co może być wykorzystane jako prosty i szybki test do oceny fitotoksyczności tych metabolitów.

Należy podkreślić znacznie mniejszą wrażliwość roślin na te toksyny w porównaniu z wrażliwością zwierząt. Mikotoksyny te, aby hamować metabolizm roślin, muszą występować w znacznie większych stężeniach. Na przykład, aflatoksyna B₁ jest toksyczna dla roślin dopiero w stężeniu około 100 µg/cm³, a więc w stokrotnie wyższym niż stężenie hamujące rozwój larw krewetek (rys. 7).

Nie poświęca się jednak większej uwagi fitotoksycznym właściwościom tych mikotoksyn, gdyż wytwarzające je grzyby nie powodują chorób roślin

mających znaczenie gospodarcze. Mikotoksyny te mogą odgrywać pewną rolę w przypadku znaczniejszego rozwoju tworzących je grzybów na nasionach po zbiorze, np. na ziarnach zbóż, nasionach roślin oleistych i innych. Przy nadmiarze wilgotności w czasie przechowywania, grzyby z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* atakują zarodki ziarniaków zbóż i innych nasion powodując obniżenie zdolności kiełkowania. Obfitszy ich rozwój w masie ziarna powoduje powstawanie tzw. niebieskich oczek (ang. blue eyes) będących drobnymi koloniami tych grzybów (Chelkowski 1991).

Grzyby, wyosobniane z uszkodzonych ziarniaków czy zarodków, należały często do takich gatunków, jak: *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus candidus*, *A. flavus* i inne, oraz wykazywały zdolność, do tworzenia mikotoksyn. Mikotoksyny te były toksyczne np. dla zarodków kukurydzy, co wskazuje na ich udział w porażeniu nasion przez wymienione tu grzyby.

Warto też przytoczyć grzyb *Penicillium expansum*, tworzący w znacznych stężeniach dwie mikotoksyny: cytryninę i patulinę. Wytwarzane są one w czasie wnikania grzyba do komórek przechowywanych jabłek. Toksyny te wraz z innymi metabolitami mogą oddziaływać na komórki, ułatwiając penetrację strzępek grzybni w głąb owoców.

Metabolity poznane jako fitotoksyny tworzone są przez patogeny roślin, takie jak: *Bipolaris* (teleomorfa *Cochliobolus*), *Alternaria*, *Stemphylium*, *Ascochyta* i inne. Jak dotąd były one omawiane w literaturze raczej ze względu na ich fitotoksyczność, mniej jest prac o ich zootoksyczności.

Pewną, szczególną grupę metabolitów stanowią omawiane poniżej trichoteceny. Ich toksyczność można określić jako wielostronną, są silnie zootoksyczne, jak też fitotoksyczne i antybiotyczne. Silna fitotoksyczność trichotecenów oraz fakt, że wytwarzane są przez grzyby o znacznej agresywności, takie jak *Fusarium culmorum* i *F. graminearum*, wskazują na ich udział w procesie patogenezy.

Grzyby z rodzaju *Fusarium* wytwarzają ponad 170 metabolitów wtórnych o rozpoznanej toksyczności w tym około 30 związków z grupy trichotecen oraz wiele innych o znanej aktywności fitotoksycznej, takich jak: kilkanaście barwników naftazarynowych (marticyna, jawanicyna, fuzarubina, bikaweryna i inne), likomazmina, kwas fuzariowy. Wszystkich tych związków nie można oznaczyć w jednym ekstrakcie z kultury grzyba, a działają one na roślinę w całym kompleksie. Szczególnie silnie działanie fitotoksyczne wykazują trichoteceny grupy A: T-2 toksyna i diacetoksyscirpenol. Również deoksyniwalenol i niwalenol cechuje silna fitotoksyczność, a szczegółowe badania wykazały ich genotoksyczność, przejawiająca się aberracjami chromosomowymi i opóźnieniem podziałów komórkowych (Packa 2005).

Opracowano testy oceny fitotoksyczności kultury grzybów, którymi bada się ogólny efekt toksyczny przesączów z kultur grzybów na takich roślinach

testowych, jak: siewki pomidorów, pszenicy, kukurydzy, jęczmienia, fasoli, grochu oraz zarodniki kukurydzy i wycinki koleoptyli pszenicy. Testy te umożliwiają badanie zarówno toksyn oczyszczonych, jak i ekstraktów z kultur. Testy, przeprowadzane na całych siewkach, mają tę zaletę, że umożliwiają obserwację wpływu obecności toksyn na rozwój liścieni i korzonków. Przykładowo deoksyniwalenol okazał się silnym inhibitorem wzrostu korzonków, co wyjaśniałoby w pewnym stopniu zgorzel korzonków powodowaną przez tworzące tę toksynę grzyby.

Pewien fenomen stanowi krzew rosnący w południowej Brazylii *Bacharis megapotamica*. Rośnie on jako jedyna roślina w niszach ekologicznych w mikoryzie z grzybem *Myrothecium verrucaria*. Grzyb ten wytwarza liczne pochodne makrocyklicznej trichotecenowej – werukaryny A.

Roślina ta może absorbować, przenosić do łodyg i liści oraz przekształcać te silne fitotoksyny, powodujące zamieranie wielu innych roślin. Z roślin gatunku *B. megapotamica* wyizolowano około 20 związków z grupy trichotecen. Rośliny te są silnie toksyczne dla zwierząt i powodują zatrucia królików po spożyciu przez nie około 2 gramów świeżej masy roślin na 1 kilogram masy ciała. Jeden ze związków, powstający w roślinie *B. megapotamica* z przekształconych metabolitów grzyba *M. verrucaria*, wykazuje działanie przeciwleukomiczne u myszy.

Omówiony przykład wskazuje na możliwość występowania odporności niektórych roślin na niespecyficzne fitotoksyny (Jarvis i in. 1981). Patotoksyną nazywana jest fitotoksyna specyficzna, wywołująca w poddanej jej działaniu roślinie takie same objawy jak infekcja grzyba patogenicznego, który tę toksynę wytwarza.

Wydaje się też, że szereg nowo poznanych mikotoksyn może znaleźć zastosowanie w medycynie, jak to już ma miejsce w przypadku alkaloidów sporyszu.

1.4. Właściwości antybiotyczne mikotoksyn

Najpierw okazało się, że szereg metabolitów grzybowych ma charakter antybiotyków, a znacznie później stwierdzono, że są one silnie toksyczne. Jako przykłady wymienić można kwas penicylinowy – metabolit *Penicillium puberulum*, werukaryny tworzone przez *Myrothecium verrucaria*, patulinę – stosowaną jako antybiotyk odkryty w kulturach *Penicillium urticae*, cytryninę – wyizolowaną z *Penicillium citrinum*, gryzeofulwinę – produkowaną przez *Penicillium griseofulvum*. Silna toksyczność tych związków uniemożliwiała ich zastosowanie w lecznictwie. Jedynie gryzeofulwina była stosowana jako antybiotyk przeciw grzybicom. Związek ten jednak przy dłuższej kuracji uszkadza wątrobę (Moreau 1979).

Mikotoksyny cechują się silniejszym działaniem toksycznym niż antybiotycznym – odwrotnie niż antybiotyki, stąd nie mogą być stosowane w medycynie, weterynarii czy przemyśle spożywczym.

Charakterystyczne cechy mikotoksyn zostały wykorzystane w testach potwierdzających ich biologiczną aktywność. Opracowano także testy dla oznaczania takich mikotoksyn jak: aflatoksyny (rys. 2), ochratoksyny, kwas penicylinowy, patulina. Testy te opierają się na pomiarze średnicy strefy zahamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. megaterium* i *B. thuringiensis*. Toksyny nanosi się na krążki bibuły o średnicy 7 mm i aktywność antybiotyczną określa się na pożywkach zestalonych agarem jako zahamowanie wzrostu bakterii. Do mikotoksyn o silnych właściwościach antybiotycznych, hamujących wzrost bakterii w ilości 1–10 µg w krążku lub mniejszej należą: aflatoksyny B₁, B₂ i M₁, patulina, ochratoksyna A, zearalenon i kwas penicylinowy – zawierające pierścień piranowy lub kumarynowy. Znacznie mniej aktywne okazały się toksyny trichotecenowe (Chełkowski 1985). Oprócz hamowania wzrostu bakterii czy grzybów, mikotoksyny takie jak aflatoksyny, wywołują mutacje drobnoustrojów. Do badań zdolności mutagenicznych mikotoksyn jako organizm modelowy wykorzystuje się bakterie *Salmonella typhimurium*.

W ostatnich dwu dekadach proponowane są nowe nazwy dla wielu grzybów toksynotwórczych, co powoduje na razie pewną dezorientację. Aktualne nazwy znaleźć można na stronie internetowej <http://www.indexfungorum.org>.

Antybiotyczne właściwości mikotoksyn odgrywają niewątpliwie istotną rolę we wzajemnym oddziaływaniu drobnoustrojów w naturalnych środowiskach, w których rozwijają się grzyby dokonujące mineralizacji tkanek roślinnych i zwierzęcych. Są więc przypuszczalnie pewnymi regulatorami obiegu materii organicznej w przyrodzie.

1.5. Ogólne omówienie grzybów toksynotwórczych

Zdecydowanie najliczniej reprezentowane są wśród dotychczas poznanych grzybów toksynotwórczych gatunki z dwóch rodzajów grzybów: *Penicillium* i *Aspergillus*. Grzyby te jako saprofity i tzw. grzyby przechowalnicze rozwijają się na płodach rolnych (ziarno zbóż) i ogrodniczych (owoce, warzywa) po zbiorze i przyczyniają się do ich psucia i do tworzenia mikotoksyn. Na trzecim miejscu pod względem liczebności gatunków wymienić można rodzaj *Fusarium*. Grzyby rodzaju *Fusarium* z uwagi na ich polifagiczny i fakultatywny charakter mogą rozwijać się na roślinach zarówno w polu powodując fuzariozy kłosów zbóż drobnoziarnistych i kolb kukurydzy, jak i po zbiorach, a wytwarzane przez

nie mikotoksyny są jednymi z częściej występujących w płodach rolnych, głównie ziarnie zbóż.

Dla szeregu grzybów dostępne są informacje o toksyczności ich kultur, stwierdzanej na podstawie karmienia nimi zwierząt doświadczalnych. Nie ustalono jednak budowy tworzonych przez nie toksycznych metabolitów. Ograniczono się w tym opracowaniu tylko do podania nazw gatunkowych grzybów, w kulturach których zidentyfikowano w znacznych stężeniach poznane już mikotoksyny.

Wykonano liczne prace nad zdolnością grzybów tych trzech rodzajów do tworzenia mikotoksyn. Przykładowo w Niemczech przebadano 307 szczepów grzybów: 122 rodzaju *Aspergillus* i 185 *Penicillium* ze 107 prób kukurydzy, pszenicy, jęczmienia i owsa.

Toksyny wytwarzało 115 szczepów:

aflatoksyny B ₁ i B ₂	15	luteoskiryne	3
ochratoksynę A	1	kwas cyklopiazonowy	25
sterygmatozystynę	2	kwas kojowy	41
cytreowirydynę	3	kwas penicylinowy	63
cytryninę	2		

Ciekawa jest prawidłowość częstszego występowania grzybów toksynotwórczych w partiach zbóż importowanych z USA w porównaniu z grzybami izolowanymi ze zbóż zbieranych w Europie. Dotyczy to szczególnie grzybów tworzących aflatoksyny. Fakt, że częstość występowania grzybów toksynotwórczych jest różna w różnych obszarach geograficznych, udokumentowano już w wielu pracach. W innych badaniach wykazano, że na 1481 szczepów rodzaju *Penicillium* wyizolowanych z żywności i pasz, aż 828 tj. 56%, tworzyło dwadzieścia różnych mikotoksyn.

Biorąc pod uwagę również toksyczność, oznaczaną metodą biologiczną przy użyciu krewetek *Artemia salina*, za toksynotwórcze uznano 1166 szczepów, tj. 79%. Do najczęściej wytwarzanych toksyn zaliczyć można kwas cyklopiazonowy, kwas penicylinowy, patulinę, cytryninę, ochratoksynę A i rugulozynę (Leistner 1984).

W obydwu badaniach najczęściej występującym grzybem rodzaju *Penicillium* był gatunek *P. verrucosum* var. *cyclopium* – dawna nazwa *P. cyclopium* (Samson i in. 1995). Aktualne nazwy można znaleźć w Index Fungorum. Zmiany nazw gatunkowych gatunków *Aspergillus* i *Penicillium* są przyczyną dezorientacji co do poprawnych nazw gatunków toksynotwórczych.

Z dotychczasowych prac wynika, że tylko pewien procent izolatów danego gatunku grzyba wykazuje zdolność do tworzenia mikotoksyn. Przykładowo ochratoksynę A wytwarzał średnio co piąty izolat *Aspergillus*

według badań przeprowadzonych w byłej Jugosławii i USA. Procent izolatów *Aspergillus flavus*, tworzących aflatoksyny, w Polsce jest bardzo niski – grzyby tworzące aflatoksyny występują na naszych zbożach sporadycznie, w USA natomiast przekracza 20% izolatów tego gatunku. Zdolność do syntezy zearalenonu jest wysoka w przypadku *Fusarium graminearum* i *F. culmorum* tworzy go około 90% izolatów (Bottalico 1998, Bottalico i Perrone 2002). Z drugiej strony jeden szczep może wytwarzać kilka związków toksycznych i to niekoniecznie z tej samej grupy mikotoksyn. Przykładem może być grzyb *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, który syntetyzować może kwas penicylinowy, ochratoksynę A, patulinę, cytryninę, kwas cyklopiazonowy i penitrem A.

Grzyby toksynotwórcze wzrastają na ogół w towarzystwie różnych innych grzybów, które toksynotwórcze nie są. Równoczesny rozwój tych grzybów np. na ziarnie zbóż, w paszy itp. wpływa zarówno na wzrost grzybni jak i na ilość mikotoksyny tworzonej przez grzyb toksynotwórczy. Grzyb *Aspergillus flavus*, o ile rośnie w towarzystwie grzybów takich gatunków, jak: *A. niger*, *A. chevalieri*, *A. candidus* i *Trichoderma viride*, to tworzona ilość aflatoksyn maleje znacznie, albo nawet całkowicie jest hamowana (Hesseltine 1976; Wicklow i in. 1980). Tworzący ochratoksynę A grzyb *Aspergillus ochraceus*, o ile rośnie w towarzystwie takich grzybów jak: *A. flavus* (izolat nietoksynotwórczy), *A. nidulans* i *A. oryzae*, to zupełnie nie tworzy ochratoksyny A. Natomiast przy równoczesnym wzroście z grzybami: *A. amstelodami*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. fumigatus* i *A. versicolor* ilość wytwarzanej ochratoksyny A zmniejsza się do 10% w porównaniu z ilością produkowaną bez obecności innych grzybów.

Szczególnie antagonistycznie na ilość tworzonych mikotoksyn wpływają grzyby rodzaju *Trichoderma*. Powodują obniżenie ilości tworzonych mikotoksyn w ponad 95% przy równoczesnym wzroście na ziarnie ryżu (Buśko i in. 2008, Gromadzka i in. 2008, 2009).

Na wydajność tworzonej przez grzyb toksyny wpływ mają takie czynniki, jak szczep i podłoże, a mianowicie jego rodzaj: skład chemiczny, obecność w nim takich mikroelementów jak: cynk, magnez, kobalt oraz wilgotność i temperatura (Hesseltine 1976). Znajomość warunków optymalnych dla tworzenia toksyn przez dany grzyb jest ważna, kiedy bada się zdolności do syntezy mikotoksyn różnych szczepów czy izolatów grzybów lub też, gdy uruchamia się produkcję jakiejś mikotoksyny. Przykładowo między szczepami gatunku *Aspergillus ochraceus* spotyka się jedne o wysokiej wydajności, do 4g ochratoksyny A w 1 kg podłoża, albo też o niskiej wydajności, produkujące zaledwie 1 mg toksyny w 1 kg. Wysokie wydajności ochratoksyny A uzyskuje się na podłożu z ziarna pszenicy lub kukurydzy, w zakresie temperatury 25–28°C, przy wilgotności 34–35% i dobrym napowietrzeniu hodowli.

1.6. Znaczenie mikotoksyn we współczesnym rolnictwie.

Zanieczyszczenie mikotoksynami ziarna zbóż, nasion oleistych oraz produktów z nich przetworzonych jest jednym z ważnych problemów rolnictwa, szerzej badanym po roku 1960. Na skutek upadku 100.000 indyków na farmach w Anglii wykryto najsilniej toksyczną mikotoksynę – aflatoksynę B₁. Jest to mikotoksyna powszechnie występująca w arachidach, śrutach arachidowych i bawełnianych oraz ziarnie kukurydzy ze strefy subtropikalnej. Każda partia tych produktów, znajdująca się w obrocie, podlega obowiązkowemu badaniu na zawartość aflatoksyny B₁. Krowy karmione paszą zawierającą aflatoksynę B₁ wydają z mlekiem jej pochodną aflatoksynę M₁.

Mikotoksyny to metabolity grzybów mikroskopowych, określane też potocznie jako pleśnie (grzyby mikroskopijne, nitkowate), wykazujące silne działanie toksyczne wobec organizmu człowieka i organizmów zwierząt kręgowców. Ich szkodliwe działanie przejawia się w niewielkich stężeniach – na poziomie około jednego miligrama w kilogramie, czyli milionowej części masy (ziarna zbóż, przetworów zbożowych, pasz i innych) lub jeszcze niższym. Ich spożycie powoduje **mikotoksykozy** – choroby cechujące się z jednej strony specyficznym efektem u zwierząt gospodarskich, takim jak uszkodzenia i nowotwory wątroby w przypadku aflatoksyn, uszkodzenia nerek w przypadku ochratoksyny A, zaburzenia płodności trzody przez zearalenon, utrata łaknienia i wymioty u trzody przez spożycie z paszą deoksyniwalenolu (=womitoksyny). Z drugiej strony wszystkie mikotoksyny cechuje działanie niespecyficzne, objawiające się zmniejszeniem wykorzystania paszy i ogólnym pogorszeniem zdrowotności zwierząt (Tabela 2).

Koszty ekonomiczne, które ponoszą producenci na skutek zanieczyszczenia mikotoksynami ziarna zbóż, nasion roślin oliwowych i pasz szacowane są w samych tylko Stanach Zjednoczonych na blisko miliard dolarów rocznie (Task Force Report 2003).

Pięć mikotoksyn na ponad pięćset poznanych uznaje się za znaczące z punktu widzenia toksykologicznego i ekonomicznego w skali światowej: **aflatoksyny, ochratoksynę A, deoksyniwalenol** (wraz z pochodnymi), **zearalenon i fumonizyny**.

Aflatoksyny, tworzone głównie przez gatunek *Aspergillus flavus* stanowią poważny problem w krajach produkujących orzeszki arachidowe, makuchy bawełniane oraz w niektórych krajach występują także w ziarnie kukurydzy. W naszym klimacie aflatoksyny nie są zanieczyszczeniem zbóż, natomiast występują w importowanych makuchach arachidowych i bawełnianych oraz w ziarnie kukurydzy ze strefy subtropikalnej.

Ochratoksyna A to typowy przedstawiciel mikotoksyn, tworzonych w trakcie niewłaściwego przechowywania ziarna zbóż we wszystkich strefach klimatycznych przez gatunki rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* (Chełkowski 1985). Jest to mikotoksyna szczególnie istotna w Wielkiej Brytanii i krajach skandynawskich – Danii, Szwecji, Norwegii i Finlandii, co jest spowodowane zbyt wysoką wilgotnością ziarna zbóż w czasie żniw wynikającą z wilgotnego klimatu. Jednostopniowy zbiór dużych mas ziarna za pomocą kombajnów może prowadzić do rozwoju tworzących ochratoksynę grzybów pleśniowych w ziarnie, o ile wilgotność ziarna nie zostanie utrzymana na poziomie uniemożliwiającym ich rozwój – tj. poniżej 14% zawartości wody (Ryniecki i Szymański 1999). W trakcie przechowywania ziarna zbóż i nasion roślin oleistych przy nadmiernej wilgotności zawartość zarodników grzybów szybko wzrasta. W ziarnie zdrowym zawartość zarodników grzybów nie przekracza 10000 w 1 gramie. W trakcie naszych prac trafiały się partie ziarna, w których zawartość zarodników grzybów przekraczała 1 milion w gramie ziarna.

Pozostałe trzy mikotoksyny: deoksyniwalenol, zearalenon i fumonizyny wytwarzane są przez patogeniczne wobec zbóż gatunki *Fusarium*, porażające kłosa zbóż i kolby kukurydzy. Patogeny te powodują akumulację powyższych metabolitów w ziarnie porażonych kłosów zbóż drobnoziarnistych (pszenica, jęczmień, żyto, pszenżyto, owies) i kolb kukurydzy.

Wzrost zanieczyszczenie ziarna zbóż mikotoksynami tworzonymi przez gatunki *Fusarium* powodowany jest z jednej strony przez coraz szerzej stosowane uprawy zbóż w monokulturach, z pominięciem tradycyjnego płodozmianu, a z drugiej strony przez oszczędnościowe systemy uprawy (w angielskim nazywane „minimum tillage system”).

Powoduje to nagromadzenie znacznego inokulum patogenów *Fusarium* w środowisku pól uprawnych, które mogą dobrze rozwijać się na resztkach pożniwnych. Szczególną grupę mikotoksyn tworzą metabolity grzybów *Fusarium* – fakultatywnych patogenów roślin zbożowych (Tabela 3). Patogeny rodzaju *Fusarium* porażają kłosa zbóż, a skutkiem tego porażenia jest akumulacja mikotoksyn w ziarnie jeszcze przed żniwami. Dodatkowo ma miejsce obniżenie plonowania, wynikające z mniejszego ciężaru 1000 ziaren, obniżenia liczby ziaren z kłosa i masy ziaren z kłosa.

Fuzarioza kłosa pszenicy (nazwa angielska *Fusarium* to head blight, ear blight, scab) postrzegana jest jako najważniejsza choroba upraw pszenicy w XXI wieku w wielu regionach świata. W drugiej połowie XX wieku epidemie choroby występowały w Ameryce Północnej i Południowej, Japonii, Chinach, na Bliskim Wschodzie i w wielu krajach europejskich. Zidentyfikowano około 200 metabolitów wtórnych grzybów – mikotoksyn tworzonych przez gatunki *Fusarium*, określono ich budowę i opracowano

dla najczęściej zanieczyszczających ziarno zbóż rutynowe metody ich analizy w próbach ziarna. W wielu krajach wprowadzono zalecenia co do górnej granicy zawartości mikotoksyn w ziarnie zbóż i paszach, z przykładami podanymi poniżej.

Tabela 2.

Mikotoksyny o znaczeniu toksykologicznym i ekonomicznym w skali światowej

Nazwy mikotoksyn i tworzące je grzyby	Objawy mikotoksykozy	Przykładowe dawki toksyczne LD 50	Pierwotne zanieczyszczenie ziarna zbóż i innych płodów	Występowanie
Aflatoksyna B₁ i mniej toksyczne pochodne: B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂ <i>Aspergillus flavus</i> i <i>A. parasiticus</i>	Uszkodzenia i nowotwory wątroby	Zarodki jaj kurzych 0,025 mg/zarodek, indyki, kurczęta, kacząta 0,25mg/kg paszy powodują śmiertelność.	Aflatoksyna występuje w arachidach, śrucie arachidowej, ziarnie kukurydzy w strefie klimatu subtropikalnego.	Orzeszki arachidowe, mączki arachidowe, ziarno kukurydzy, mleko krowie.
Ochratoksyna A (OTA) <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> <i>A.carbonarius</i>	Nefropatia, uszkodzenia funkcji nerek u trzody, drobiu i innych zwierząt monogastrycznych	Uszkodzenia nerek trzody po kilku dniach przy zawartości w paszy 4mg/kg.	Ziarno wszystkich gatunków zbóż może zawierać ochratoksynę A przy niewłaściwym przechowywaniu. Winogrona i produkty z winogron.	Ziarno zbóż, przetwory zbożowe (mąka, kasze, pasze, trzody, podroby (nerki, wątroba), winogrona, wino, wytloki winogron
Deoksyniwalenol (DON) i niwalenol (NIV) <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Utrata łaknienia, wymioty	>2mg/kg paszy zmniejszenie łaknienia, 20mg/kg paszy wymioty u trzody	Ziarno wszystkich gatunków zbóż	Przetwory zbożowe (mąka, pieczywo), ziarno kukurydzy i przetwory.
Zearalenon (ZON) <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Hyperestrogenizm trzody (syndrom estrogeniczny) – działanie hormonalne, zaburzenia płodności.	>1mg/kg Uszkodzenia organów rozrodczych u osobników żeńskich i męskich przy zawartości w paszy	Głównie ziarno kukurydzy porażone przez patogeny kolb, w mniejszym stopniu ziarniaki pszenicy	Ziarno kukurydzy, kiszonki zawierające całe kolby kukurydzy, pasze na bazie kukurydzy.
Fumonizyna B₁ i mniej toksyczne pochodne: B ₂ i B ₃ <i>F. verticillioides</i> (=moniliforme), <i>F. proliferatum</i>	Obrzęki płuc trzody, hepatotoksyczność, nowotwory wątroby trzody. Neurotoksyczność, uszkodzenia mózgu u koni, prowadzące do upadków.	Fumonizyna uszkadza szlak biosyntezy sfingozyny – składnika mózgu.	Ziarno kukurydzy z kolb porażonych przez patogeny, powodujące fuzariozę ziarniaków (ang. kernel rot).	Ziarno kukurydzy, przetwory z ziarna kukurydzy

Metabolitami grzybów *Fusarium*, zanieczyszczającymi ziarno zbóż, są przede wszystkim metabolity z grupy trichotecenów: deoksyniwalenol i niwalenol – toksyczne pochodne seskwiterpenów. Jest to wynikiem toksynotwórczych zdolności gatunków *Fusarium culmorum* i *F. graminearum*, które są najbardziej agresywnymi gatunkami wobec kłosów zbóż.

Zawartość deoksyniwalenolu (DON) w porażonych ziarniakach pszenicy i pszenżyta wynosi średnio 30 mg/kg. Porażone ziarniaki pszenicy łatwo jest odróżnić od zdrowych – są one przebarwione na kolor od białego do różowego, a niekiedy nawet karminowego, często pomarszczone i słabiej wykształcone niż ziarniaki zdrowe. Trudniej jest odróżnić porażone ziarniaki od zdrowych u pszenżyta, żyta i jęczmienia czy owsa. Porażeniu ulega również kukurydza uprawiana na ziarno – porażone ziarniaki kukurydzy zawierają średnio dziesięciokrotnie wyższe ilości mikotoksyn aniżeli ziarniaki pszenicy. W ziarniakach kukurydzy obecnych jest także szereg mikotoksyn, które nie występują w ziarniakach zbóż drobnoziarnistych – do najczęściej występujących w kukurydzy należą fumonizyny, a także deoksyniwalenol i zearalenon (Bottalico i Perrone 2002, Task Force Report 2003).

Poszczególne kraje i regiony dzieli się na kraje o wysokim ryzyku występowania mikotoksyn i regiony (kraje) o niskim ryzyku występowania mikotoksyn.

Informacje o fuzariozie kłosów wraz z barwnymi fotografiami objawów na kłosie i ziarnie znaleźć można na kilku stronach internetowych: www.mycotochain.org i innych.

Tabela 3.

Gatunki grzybów *Fusarium* i tworzone przez nie mikotoksyny w kulturach laboratoryjnych.

Gatunek <i>Fusarium</i>	Metabolity tworzone na podłożach stałych
<i>F. graminearum</i>	<u>DON</u> , 3AcDON, 15AcDON, NIV, 4.7DeDON <u>ZON</u> , ZON-siarczan,
<i>F. culmorum</i>	<u>DON</u> , 3AcDON, NIV, <u>ZON</u>
<i>F. avenaceum</i>	MON, enniatyny A, A ₁ , B, B ₁ , antybiotyk Y
<i>F. cerealis</i> (<i>F. crookwellense</i>)	NIV, FUS, ZON
<i>F. poae</i>	NIV, FUS, DAS, MAS, BEA, enniatyny A, B, B ₁
<i>F. sporotrichioides</i>	T-2, HT-2, NEO, DAS, SCIOL, Ac T-2, 8Ac T-2, 3-hydroxy T-2, T-2 triol, 4Ac tetraol, 15Ac tetraol T-2, HT-2
<i>F. langsethiae</i>	T-2, HT-2
<i>F. tricinctum</i>	MON
<i>F. chlamydosporum</i>	MON
<i>F. semitectum</i>	BEA
<i>F. equiseti</i>	FUS, SCIOL, Fuzarochromanon, ZON, DAS, NIV, T-2 4-OL
<i>F. acuminatum</i>	T-2, MON, enniatyna B
<i>F. verticillioides</i> (= <i>moniliforme</i>)	<u>FB</u> ₁ , FB ₂ , FB ₃ , FU-C, BIK
<i>F. subglutinans</i>	MON, BEA, FUP, BIK
<i>F. proliferatum</i>	<u>FB</u> ₁ , <u>FB</u> ₂ , MON, BEA, FUP, BIK
<i>F. anthropilum</i>	MON, FB ₁ , FB ₂ , BIK
<i>F. solani</i>	MON, BIK
<i>F. oxysporum</i>	MON, BIK
<i>F. dlamini</i>	MON, BIK
<i>F. nygamai</i>	MON, BIK
<i>F. napiforme</i>	MON, BIK
<i>Microdochium nivale</i> (poprzednio <i>F. nivale</i>)	nieznane

Skróty nazw mikotoksyn:

DON – deoksyniwalenol i jego pochodne 3AcDON, 15AcDON

NIV – niwalenol

FUS – fuzarenon

ZON – zearalenon

MON – moniliformina

FU-C – fuzaryna C

FB₁ – fumonizyna B₁ i jej pochodne FB₂ i FB₃

BEA – bowerycyna

BIK – bikaweryna, barwnik o cechach antybiotycznych

T-2 – toksyna T-2, jej pochodne: HT-2 toksyna, NEO – neosolaniol

DAS – diacetoksycispenol

MAS – monoacetoksycispenol

SCIOL – scirpentriol

T-2 4-OL – T-2 tetraol

Na hasło „mycotoxin” w przeglądarce Google w roku 2008 znaleziono ponad 600 000 wyników wyszukiwania a w roku 2009 już ponad 1,3 miliona rekordów. Wiele z nich jest kilkakrotnie powtórzona – faktyczna liczba rekordów nie powtarzających się jest więc niższa.

Zawartość mikotoksyn jest ważnym wskaźnikiem jakości ziarna. W ziarnie zdrowym ilości mikotoksyn takich jak deoksyniwalenol czy moniliformina są niewielkie, poniżej 0,05 mg/kg. Kraje Unii Europejskiej zalecają, ażeby zawartość DON w ziarnie pszenicy nie przekraczała wartości 1,75 mg/kg, a w mące 0,75 mg/kg.

Ogółem w ziarnie zbóż w Polsce zidentyfikowano 19 mikotoksyn fuzaryjnych, z których w ziarnie pszenicy najczęściej występującymi w wieloleciu były deoksyniwalenol, niwalenol i moniliformina. Mało jest danych o zanieczyszczeniu ziarna zbóż zearalenonem. Pozostałe metabolity, wymienione w Tabeli 3, mają niewielkie znaczenie.

Koszt analizy próby ziarniaków na zawartość mikotoksyny DON wynosi około 20 euro. Ponadto analizy fizykochemiczne cechuje znaczne zużycie odczynników, które trzeba utylizować lub poddawać regeneracji, co dodatkowo ma ujemne skutki ekologiczne i ekonomiczne. Stąd opracowywane są nowe nanotechnologie dla identyfikacji mikotoksyn, które byłyby tańsze i mniej zanieczyszczały środowisko. Zostanie to omówione w następnym paragrafie.

Danych odnośnie występowania mikotoksyn fuzaryjnych w próbach ziarna pochodzących z partii ziarna będącego w obrocie jest niewiele. Ziarno takie zawiera średnio 0,05 mg DON/kg, a co najwyżej 0,1 mg DON/kg oraz 0,030 mg NIV/kg. Moniliformina występowała obok powyższych metabolitów w ilości średnio 0,18 mg/kg. O ile nie występuje duże nasilenie fuzariozy kłosa, to zawartość mikotoksyn fuzaryjnych w ziarniakach jest niewielka (Goliński i in. 1996, 1996a).

Znaczące nasilenie fuzariozy obserwowano na Żuławach w roku 1998, a także w Wielkopolsce w roku 1999, kiedy to szacunkowo na polach uprawnych obserwowano około 20% porażonych kłosów. Ziarniaki pochodzące z porażonych w 1998 roku kłosów zawierały średnio 3,7mg DON/kg i 1,08 NIV/kg oraz 0,08 moniliforminy/kg, a ponad 30% zawierało wszystkie trzy metabolity (Tomczak i in. 2002).

Ziarniaki z kłosów pszenicy inokulowanych zarodnikami *Fusarium culmorum* zależnie od odmiany zawierały od kilku do ponad 30 mg DON/kg (Perkowski 1999).

Tabela 4.

Dopuszczalna zawartość deoksyniwalenolu (DON) w µg/kg w pszenicy i wyrobach pszennych obowiązująca w UE, USA i Kanadzie.

Kraj	Dopuszczalna zawartość DON µg/kg	
	Ziarno nieprzetworzone	Mąka i przetwory pszenne
UE	1750	750
Austria	650	500
Niemcy	500	350
Holandia	750	
USA	2000	1000
Kanada	2000	1000

Maksymalna zawartość innych mikotoksyn jest następująca:

dla **zearalenonu** wynosi:

- w ziarnie zbożowym nieprzetworzonym 100 µg/kg
- w ziarnie kukurydzy nieprzetworzonym 200 µg/kg
- w mące zbożowej 75 µg/kg
- w chlebie, wypiekach cukierniczych i płatkach śniadaniowych 50 µg/kg
- w produktach zbożowych dla niemowląt 20 µg/kg

Proponowane przez UE zalecenia dopuszczalnej zawartości **ochratoksyny A (OTA)** wynoszą:

- w rodzynkach i innych suszonych produktach winogron 10 µg/kg,
- w winie (białym lub czerwonym) 2 µg/kg
- w kawie palonej 5 µg/kg
- w kawie typu instant 10 µg/kg
- w ziarnie zbóż nieprzetworzonym 5 µg/kg
- w żywności dla niemowląt 0,5 µg/kg.

To ostatnie zalecenia dla OTA uważane jest za wartość bardzo rygorystyczną.

Maksymalna zawartość **patuliny** w sokach i nektarach owocowych – 50 µg/kg.

Mało jest danych o występowaniu zearalenonu, który jest nie tyle toksyczny co wykazuje działanie hormonalne, zbliżone do hormonów grupy estradiolu, zaburzających funkcje rozrodcze. Stąd szkodliwe dla organizmu są znacznie niższe zawartości tej mikotoksyny, aniżeli innych mikotoksyn. Z prac dotychczasowych wynika, że zearalenon występował w około 50% prób krajowego ziarna pszenicy średnio w ilości 33-63 µg/kg, przy maksymalnej zawartości 178-130 µg/kg. Dotychczasowe dane o

występowaniu zearalenonu są bardzo fragmentaryczne i nie dają podstaw do właściwej oceny zanieczyszczenia żywności i pasz tą mikotoksyną, a raczej mikohormonem (Chełkowski 1998, Bennett i Klich 2003).

W USA z funduszy różnych firm utworzono stronę internetową www.scabusa.org, w której zamieszczane są aktualne informacje o pracach nad fuzariozą pszenicy i jęczmienia, wraz z artykułami pochodzącymi z corocznych konferencji, organizowanych od roku 2002. W USA, Kanadzie i CIMMYT w Meksyku przeznaczono bardzo znaczące fundusze na programy genetyczno-hodowlane w celu wytworzenia nowych odmian o mniejszej podatności na fuzariozę kłosa. Prowadzone są intensywne poszukiwania form odpornych w dostępnych bankach genów i wśród form uprawianych w rejonach od wielu lat zagrożonych epidemiami fuzariozy. Trudność stanowi wprowadzenie cechy odporności do genetycznego tła odmian o wysokim plonowaniu i wartości technologicznej.

2.0. Występowanie najważniejszych mikotoksyn i mikotoksykoz

Jak już wspomniano, liczba toksycznych metabolitów grzybów, znanych w chwili obecnej, sięga kilkuset. Mijałoby się z celem wymienianie większości z tych mikotoksyn. Dlatego ograniczono się do wymienienia i omówienia tylko pięciu grup, które uznać można w chwili obecnej za najbardziej znaczące w praktyce rolniczej: w przechowywaniu, obrocie i przetwórstwie produktów żywnościowych.

W rozdziale tym w pięciu punktach zostaną więc omówione wyniki dotychczasowych prac nad występowaniem tych mikotoksyn i tworzących je grzybów. Podane zostanie występowanie tych mikotoksyn w kraju ze względu na prawdopodobieństwo zagrożenia nimi rodzimych produktów rolnych.

Do mających znaczenie nie zaliczono toksyn, w przypadku których stwierdzono jedynie pojedyncze zatrucia, nawet jeżeli były one śmiertelne, ale wystąpiły jednorazowo u jednego czy kilku zwierząt. Prace przeglądowe zawierają długie listy mikotoksyn nie mających jak na razie większego znaczenia praktycznego. Wiele z tych toksyn zostało zbadanych tylko na zwierzętach laboratoryjnych i nie są one wytwarzane ani obecne w znaczącym stopniu w płodach rolnych czy w żywności. Z tego względu ograniczono się do omówienia kolejno następujących grup toksyn o większym znaczeniu: aflatoksyn, ochratoksyny A i cytryniny, zearalenonu, trichotecen (deoksyniwalenolu i pochodnych), fumonizyn i patuliny. W załączniku podano informacje także o innych mikotoksynach.

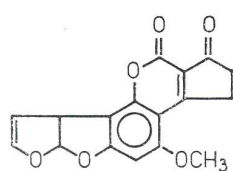
2.1. Aflatoksyny

Budowa i właściwości

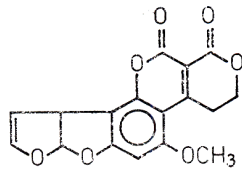
Budowę aflatoksyn ustalono w roku 1963, w trzy lata po masowym zatruciu tymi toksynami indyków na farmach w Anglii. Objawy aflatoksykozy opracował zespół Instytutu Weterynarii w Weybridge pod Londynem pod kierunkiem pani Allcroft, początkowo jako żywieniowej choroby drobiu. W badaniach tych brały udział liczne inne placówki (Goldblatt 1969).

W płodach rolnych najczęściej występuje aflatoksyna B₁. O jej toksyczności decyduje obecność pierścienia laktonowego, tworzącego z sąsiadującym pierścieniem benzenowym taki sam układ jak w kumarynie, oraz dwóch pierścieni furanowych, w tym skrajnego z wiązaniem podwójnym. Redukcja wiązania podwójnego w skrajnym pierścieniu furanowym znacznie zmniejsza toksyczność związku. Podobnie na toksyczność wpływa otwarcie pierścienia laktonowego z następną dekarboksylacją utworzonej grupy – COOH.

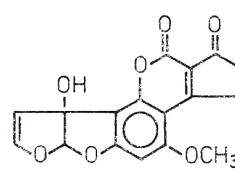
Kultury grzybów aflatoksynotwórczych zawierają oprócz aflatoksyny B₁ pięć pochodnych oznaczonych literami: B₂, G₁, G₂, M₁ i M₂. Aflatoksyna G₁ różni się od B₁ tym, że skrajny pierścień z ugrupowaniem ketonowym jest większy o atom tlenu, a po redukcji skrajnego pierścienia furanowego tworzy się z niej aflatoksyna G₂. Aflatoksyny M₁ i M₂ są hydroksylowymi pochodnymi aflatoksyn B₁ i B₂, wydzielane są z mlekiem krów przy karmieniu ich paszą zawierającą aflatoksyny B₁ i B₂ (Goldblatt 1969). Detoksykacja aflatoksyny B₁ w organizmie zwierząt stałocieplnych zachodzi przez jej demetylację do aflatoksyny P₁. Ta ostatnia wydalana jest z moczem w formie uronidu – połączenia z kwasem glukuronowym. Formą aktywną w organizmie jest epoksyd aflatoksyny B₁, do którego utleniana jest w wątrobie aflatoksyna B₁ przez cytochrom P450.



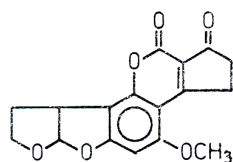
aflatoksyna B₁



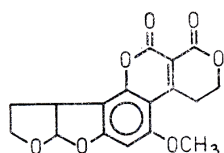
aflatokasyna G₁



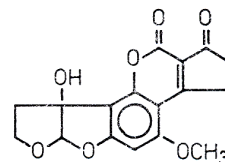
aflatoksyna M₁



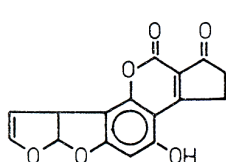
aflatoksyna B₂



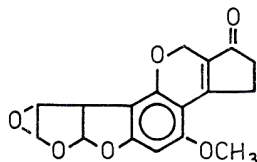
aflatoksyna G₂



aflatoksyna M₂



aflatoksyna P₁



epoksyd aflatoksyny B₁

Grzyby tworzące aflatoksyny

Grzyby, wytwarzające aflatoksyny należą zasadniczo do dwóch gatunków: *Aspergillus flavus* Link i *Aspergillus parasiticus* Speare. Są one bardzo rozpowszechnione, szczególnie *A. flavus*, w glebie, magazynach i w przechowywanych płodach i wykazują zdolność do syntezy 6 metabolitów oznaczonych literami: B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ i M₂. Aflatoksyny B₂ i G₂ oraz M₁ i M₂ stanowią na ogół niewielki procent sumy aflatoksyn wytwarzanych przez dany szczep grzyba.

Aspergillus flavus jest grzybem zasadniczo saprofitycznym i bardzo rozpowszechnionym w środowisku glebowym. Jego zarodniki są roznoszone przez owady – szkodniki upraw i w latach o większym nasileniu populacji takich owadów jak: omacnica prosowianka (*Ostrinia nubilalis*) czy słonecznica orężówka (*Heliothis zea*), w uprawach obserwuje się w momencie zbioru znaczny procent nasion zawierających aflatoksyny, szczególnie np. w południowych stanach USA (Zuber i in. 1976; Shotwell i in. 1980; Lillehoj i in. 1976, 1980). Grzyb ten może też łatwo zasiedlać ziarno kukurydzy przy liczniejszym występowaniu grzybów silnie patogenicznych, takich jak *Fusarium* i *Cochliobolus* lub głównie (Hesseltine 1976).

W roku 2005 we Włoszech obserwowano rozwój *Aspergillus flavus* i tworzenie aflatoksyn w ziarniakach kukurydzy. W roku 2004 w Kenii zmarły 123 osoby, a około 200 wymagało leczenia na skutek spożycia zanieczyszczonego aflatoksyną A ziarna kukurydzy. Zanieczyszczenie kukurydzy spowodowane było zbyt długim przechowywaniem wilgotnego ziarna. Na skutek braków żywności farmerzy zebrali kolby kukurydzy wcześniej niż zwykle, żeby uchronić się przed kradzieżą przez złodziei. Na wilgotnym ziarnie rozwinął się grzyb toksynotwórczy, co doprowadziło do akumulacji mikotoksyny.

Występowanie aflatoksyn

Obecność aflatoksyn – głównie aflatoksyny B₁ stwierdzono w bardzo wielu produktach: orzeszkach ziemnych, migdałach, ziarnie zbóż, sorgo, soi, kukurydzy, przyprawach, różnych orzechach, śrutach roślin oleistych (Goldblatt 1969). Najbardziej jednak znaczące jest zanieczyszczenie aflatoksyną B₁ orzeszków arachidowych, nazywanych arachidami (ang. peanuts), nasion bawełny, śrut otrzymywanych po ekstrakcji oleju z tych surowców oraz ziarna kukurydzy. W latach 1965-1970, kiedy zaczęto na dużą skalę oznaczać rutynowo zawartość aflatoksyn w tych produktach, prawie każda partia arachidów i śrut arachidowych zawierała aflatoksyny, a wysoki procent śrut zawierał 1 mg i więcej aflatoksyny B₁ w 1 kg (Tabela 5). Ustalono 1 mg/kg jako górny dopuszczalny poziom aflatoksyny B₁ w śrutach wysokobiałkowych, przeznaczonych na paszę i wprowadzono na początku lat siedemdziesiątych obowiązek kontroli zawartości mikotoksyn w każdej partii arachidów, śrut arachidowych i bawełnianych będących przedmiotem eksportu lub importu w handlu międzynarodowym. Również ziarno kukurydzy bywa często zanieczyszczone aflatoksynami. W Stanach Zjednoczonych aflatoksyny zawiera ziarno kukurydzy przede wszystkim zbierane w stanie Georgia i sąsiadujących stanach południowo-wschodnich. Szacuje się, że ok. 5% masy zbieranego tam ziarna kukurydzy zawiera aflatoksyny (Tabela 5).

Najpoważniejszy problem stanowią aflatoksyny w krajach klimatu subtropikalnego i tropikalnego, produkujących na dużą skalę wymienione trzy rośliny – orzeszki arachidowe, bawełnę i kukurydzę.

Skażenie aflatoksynami nasion roślin oleistych, głównie arachidów i bawełny oraz kukurydzy jest palącym problemem krajów rozwijających się, odczuwających brak żywności, takich jak Indie, szereg krajów afrykańskich czy Ameryki Południowej. Prymitywne warunki zbioru i przechowywania oraz wysokiej wilgotności, w połączeniu z wysoką temperaturą, niski poziom edukacji rolniczej są przyczyną, że skażenie to występuje często. Rozwojowi grzybów na nasionach roślin oleistych sprzyja wysoka zawartość tłuszczu, która wiąże się z tworzeniem mikroskopijnych kropeł wody na ich powierzchni.

Importowane do Polski nasiona oleiste również zawierają aflatoksyny, jednak, jak wynika z tabeli 6, w latach 80-tych XX wieku częstość i wysokość zanieczyszczenia pasz i składników paszowych aflatoksyną B₁ zmalała dzięki wprowadzeniu stałej kontroli jej zawartości w obrocie międzynarodowym.

Tabela 5.

Występowanie aflatoksyny B₁ w paszach i składnikach paszowych w różnych krajach uprzemysłowionych (Goldblatt 1969; Scott 1978; WHO 1979).

Surowiec	Zawartość aflatoksyny B ₁ w µg/kg	Liczba prób skażonych w stosunku do badanych	Kraj i rok
Śruta arachidowa	400-2000	8/8	W. Brytania 1971-1973
	=<3465	45/62	Dania
	=<4500	19/25	Francja
Śruta bawełniana	150-1500	604/3218	USA 1964-1966
Mieszanki paszowe	=<200	42/825	USA, Floryda
	40-270	4/123	W. Brytania 1971-1973
	7-300	45/100	RFN
	=<2000	43/126	Francja
	60-15000	94/278	USA, Pn Karolina 1972
		263/575	Czechosłowacja 1969-1973
Ziarno zbóż	=<225	47/157	Francja
Ziarno kukurydzy	10	2/75	Francja 1974
	=<100	51/115	USA 1972
	=<348	21/60	USA 1970
	21-137	280/743	USA, Wirginia 1976-1980

Górna granica zawartości aflatoksyny B₁ w paszach, zalecana przez Światową Organizację Zdrowia, wynosi 20 µg/kg paszy. W żywności przeznaczonej bezpośrednio dla człowieka aflatoksyny nie powinny być obecne w wykrywalnych ilościach (praktycznie zawartość ich powinna być niższa od 0,1 µg/kg). Nie zawsze daje się to osiągnąć w praktyce, na przykład nie można uzyskać tzw. masła arachidowego (ang. peanut butter) zawierającego poniżej 8 µg/kg aflatoksyny B₁ w 1 kg.

W krajach, stosujących w żywieniu krów mlecznych śrutę arachidową, problem stanowi obecność aflatoksyny M₁ w mleku, gdyż aflatoksyna B₁ jest przekształcana w aflatoksynę M₁ w organizmie krowy. Stąd górny dopuszczalny poziom zawartości aflatoksyny B₁ w paszy ustalono w latach 70-tych XX wieku w szeregu krajów na 20 µg/kg (World Health Org. 1979). Ponieważ stosunek aflatoksyny B₁ w paszy do M₁ w mleku ma się jak 300:1, daje to gwarancję obecności w mleku niewykrywalnych stężeń aflatoksyn (<0,1 µg/l).

Tabela 6.

Występowanie aflatoksyny B₁ w mieszankach paszowych i paszach w Polsce (Juszkiewicz i Piskorska-Pliszczyńska 1976, 1977; Sokołowski 1983)

Surowiec	Zawartość aflatoksyny B ₁ w µg/kg	Procent prób skażonych	Liczba prób skażonych w stosunku do badanych	Rok
Ziarno zbóż	3-15	4	3/ 75	1970-1972
	0	0	0/900	1975-1982
Śruty zbożowe	100-500	13,2	13/ 91	1980-1981
Śruty arachidowe	1000	100	14/ 14	1975
	800-3200	100	6/ 6	1977
	10-450	55	6/ 11	1977
	10-2800	83	503/609	1980-1981
Śruta bawełniana	20-230	43	6/ 14	1977
Koncentraty białkowe	=<1000	2,5		1970-1972
	10-1140	51	19/ 31	1975
	40-280	19	19/101	1980-1981
Mieszanki paszowe – ogólnie	100-1000	12,7	39/306	1970-1972
	50-662	13	27/203	1975
	0	0	0/ 29	1976
	50-320	3	25/811	1980-1981
dla drobiu	10-50	3,5	3/ 86	1977
	10-87	0,5	3/605	1980-1981
dla trzody	250-1000	11,4		1970-1972
	20-100	21	3/ 14	1977
dla bydła	100-300	2,7		1970-1972
	60-120	6,6	4/6	1977

Szkodliwość dla zwierząt i ludzi

Aflatoksynom poświęcono dotąd najwięcej uwagi i prac w porównaniu z innymi mikotoksynami. Wyniknęło to zarówno z częstości ich występowania, jak i silnego oddziaływania na organizmy zwierząt i człowieka. Aflatoksyny są silnie trujące, już w niskich stężeniach wywołują śmierć szeregu zwierząt (Tabele 7 i 8). Są one też toksyczne dla zarodków jaj ptasich i zwierząt. Wykazują działanie teratogeniczne (powodują powstawanie potworkowości płodów zwierzęcych) i działanie mutageniczne. Są cytotoksyczne i w niewielkich stężeniach w paszy przyczyniają się do obniżenia odporności na choroby infekcyjne. Jest więc

rzeczą zrozumiałą, że związki o tak szerokim oddziaływaniu na organizmy zwierzęce i człowieka wzbudziły duże zainteresowanie. Dodać należy, że aflatoksyna B₁ jest najsilniejszym z dotąd poznanych kancerogenów chemicznych (World Health Organization 1979).

Piśmiennictwo weterynaryjne przekazuje obserwowane przypadki zatruć na dużą skalę indyków, kurcząt – brojlerów, kur niosek, trzody i bydła na skutek zawartości aflatoksyn w paszy (Goldblatt 1969; Kryński, Rokicki 1983). Przyczyną było na ogół żywienie zwierząt skażonymi śrutami arachidowymi lub kukurydzą. Wpływ aflatoksyn na zwierzęta ilustrują Tabele 7, 8 i 9.

Tabela 7.

Dawki śmiertelne aflatoksyny B₁ – DL₅₀ (wg Word Health Org. 1979)

Zwierzę	DL₅₀^{a)} w mg/kg masy ciała
Zarodek kurzy ^{b)}	0,025
Królik	0,3
Kaczę	0,335
Kot	0,55
Świnia	0,62
Pies	0,5-10,0
Owca	1,0
Świnka morska	1,4
Szczur (samiec)	7,2
Mysz	9,0
Chomik	10,2
Szczur (samiczka)	17,9

a) DL₅₀ – skrót nazwy łacińskiej *dosis letalis*, oznacza dawkę powodującą śmierć 50% badanych zwierząt. W języku angielskim używany jest skrót LD₅₀ – lethal dosis.

b) Dla zarodków kurzych podaje się dawkę w mikrogramach (μg) na zarodek; toksyna wprowadzana jest do komory powietrznej jaj zaraz po ich zniesieniu, po czym obserwuje się rozwój zarodków w komorach lęgowych.

Z uwagi na wrażliwość na aflatoksyny wyróżnia się zwierzęta:

bardzo wrażliwe (DL₅₀<1 mg/kg): kurczęta, indyczęta, króliki,
średnio wrażliwe (DL₅₀ 1-10 mg/kg): świnię, cielęta, krowy,
mało wrażliwe (DL₅₀ 10 mg/kg lub więcej): myszy i szczury.

Poza zatruciem śmiertelnym, które często ma miejsce w produkcji zwierzęcej i określane jest jako „field outbreaks”, bardzo ważne jest działanie niższych od DL_{50} ilości aflatoksyn (Tabele 8 i 9). Aflatoksyne obecne w paszy przyczyniają się do zmniejszenia przyrostów wagowych drobiu, trzody i bydła, zwiększenia zużycia paszy na przyrost 1 kg masy ciała, wzrostu zachorowalności na choroby i liczby upadków. Rakotwórcze działanie aflatoksyn powoduje szczególnie duże straty przy chowie pstrągów tęczowych (ang. rainbow trouts).

Tabela 8.

Skutki powodowane przez podawanie indykom, kurczętom i pstrągom tęczowym aflatoksyny B_1 w paszy (Rodricks i in. 1977; Hamilton i in. 1971, 1972)

Zawartość aflatoksyny B_1 w paszy w mg/kg	Skutki obserwowane po karmieniu zwierząt
2,5	zmniejszenie przyrostów wagowych kurcząt o 5-10%
1,0	śmiertelność indycząt w 100% po 12 tygodniach skarmiania
0,5	zmniejszenie przyrostów indyków o 50%
0,3	uszkodzenie wątroby i padnięcia indyków po 6 tygodniach skarmiania
0,125	zmniejszenie przyrostów wagowych indyków
0,0625	zmiany w wątrobie, trzustce, śledzionie i bursach Fabrycjusza indyków
0,005	indukcja nowotworu wątroby u pstrągów tęczowych po 10 dniach

Dopuszczalne dzienne spożycie aflatoksyny B_1 nie zostało dotąd ustalone z uwagi na różne znaczenie ekonomiczne takiej regulacji dla poszczególnych krajów. W wielu krajach rozwijających się spowodowałoby to praktycznie skazanie ich mieszkańców na głód.

Tabela 9.

Wpływ paszy zawierającej śrutę arachidową lub kukurydzę skażoną aflatoksyną B₁ na efekty chowu drobiu, trzody i bydła (Keyl i Norred 1976; Hamilton i in. 1972, 1975)

Zwierzęta	Zawartość aflatoksyny B ₁ w paszy w µg/kg	Czas tuczu w dniach	Skutki obserwowane po karmieniu zwierząt
Trzoda	450	120	zmiany mikroskopowe w wątrobie i zmiany aktywności enzymów w osoczu krwi
	615	120	powiększenie nerek i wątroby, spadek przyrostów dziennych z 0,75 do 0,60 kg
	810	120	spadek przyrostów dziennych z 0,75 do 0,47 kg i wzrost zużycia paszy
Bukaty	do 300	133	bez zmian
	700	133	spadek przyrostów dziennych z 1,13 do 0,86 kg i wykorzystania paszy z 0,175 do 0,155 kg/kg przyrostu
	800	30	spadek przyrostów z 1,64 do 1,24 kg dziennie
	1000	133	spadek przyrostów dziennych z 1,13 do 0,80 kg i wykorzystania paszy z 0,175 do 0,152 kg/kg przyrostu
			padnięcia: 2 sztuki na 10
Nioski	650	270	nie stwierdzono zmian w wadze kur, nieśności i wylęgowości jaj
Brojlery kurczęta	1600	60	spadek średniej wagi z 1604 do 1485 g (mało istotny), przerost kanalików żółciowych w wątrobach
	2500	30	spadek przyrostów wagi o 81 g na ptaka
	5000	30	spadek wagi o 164 g na ptaka
Indyki	125	84	spadek przyrostów wagi o 400 g na ptaka
	250	84	spadek przyrostów wagi o 700 g na ptaka
	500	84	spadek przyrostów wagi o 1200 g na 1 ptaka przy wysokiej (ok. 50%) śmiertelności

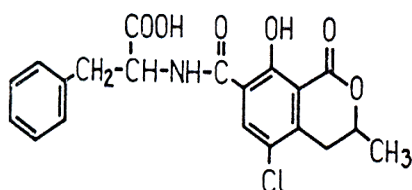
Aflatoksyna B₁ po utlenieniu przez cytochrom P450 do formy epoksydowej jest wiązana z azotem N7 guaniny. Związana z DNA toksyna może powodować transwersję zasad GC na TA. Specyficzna mutacja w kodonie 249 genu p53 supresora nowotworowego jest znacząca dla rozwoju pierwotnego raka u ludzi i u zwierząt. Mutacja ta jest przykładem „specyficznie nowotworowego” biomarkera, który znajduje się zachowawczo w tkankach nowotworowych i może być wykryty za pomocą markera typu SNP (Bennett i Klich 2003).

2.2. Nefrotoksyny: ochratoksyna A i cytrynina

Budowa i właściwości

Duński weterynarz Larsen opisał w 1928 r. objawy uszkodzenia nerek w półtuszach trzody badanej na linii ubojowej w rzeźni, którego przyczyną było żywienie jej zapleśniałym ziarnem żyta. W 1965 r. ustalono budowę bardzo toksycznych metabolitów produkowanych przez grzyb *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, nazwanych **ochratoksyną A**. Jednak dopiero w 1973 r. grupa naukowców duńskich ustaliła, że to właśnie obecność ochratoksyny A w paszy wywołuje nefropatię u trzody (Krogh 1976, 1977, Krogh i in. 1973, 1974, 1976, 1977).

Ochratoksyna A jest peptydem aminokwasu L-feniloalaniny, połączonym wiązaniem peptydowym poprzez grupę aminową z pochodną kumaryny, nazywaną kwasem izokumarynowym.



ochratoksyna A

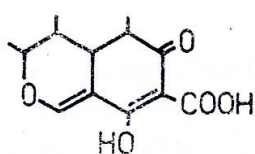
Wolna grupa karboksylowa nadaje ochratoksynom A i B kwasowy charakter, łatwo też może ulec estryfikacji, co prowadzi do powstania estrów metylowych lub etylowych. Charakterystyczne dla ochratoksyny A jest występowanie w jej cząsteczce atomu chloru, podstawionego w pierścieniu benzenowym. O toksyczności tego związku decyduje też grupa fenolowa. Zastąpienie fenyloalaniny innym aminokwasem lub jej usunięcie z cząsteczki znacznie zmniejsza toksyczność związku. Układ dwóch pierścieni aromatycznych, nazywany kumarynowym, jest podobny jak w cząsteczce aflatoksyn.

Związek nie zawierający chloru, jest nazywany **ochratoksyną B** i jest wytwarzany przez te same grzyby co ochratoksyna A, lecz jego toksyczność jest znacznie mniejsza (Steyn 1971).

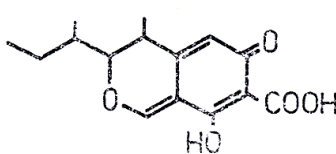
Toksyna ta rozpada się na fenyloalaninę i ochratoksynę α pod wpływem enzymu karboksypeptydazy. Stwierdzono, że hydroliza zachodzi zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak też w jelicie cienkim zwierząt

monogastrycznych, np. szczurów, a także w żywcu bydła. Ochratoksyna α jest tylko nieznacznie toksyczna, w porównaniu z ochratoksyną A: DL_{50} dla zarodków jaj kurzych wynosi 200 μg na zarodek, a dla ochratoksyny A 0,4-2,0 μg na zarodek.

Okazało się, że w wielu paszach, które były przyczyną nefropatii trzody, oprócz ochratoksyny A, obecna była inna nefrotoksyna – **cytrynina**. Cytrynina została odkryta w 1931 r. jako związek o właściwościach antybiotycznych wytwarzany przez grzyb *Penicillium citrinum* (Moreau 1979). Cytrynina jest pochodną benzopirany i zawiera w cząsteczce, podobnie jak ochratoksyna A, wolną grupę karboksylową.



cytrynina



askoszytyna

Nefrotoksyczne właściwości cytryniny zostały udokumentowane równoległe z toksycznością ochratoksyny A. W Kanadzie i Danii cytryninę stwierdzano z reguły tylko w tych porażonych próbach zbóż, które zawierały ochratoksynę A (Scott 1978). Grzybem powodującym tworzenie się równocześnie obydwu tych toksyn, jest *Penicillium verrucosum* (Harwig, Chen 1974). Cytrynina występowała rzadziej, lecz w większych ilościach – do 80 mg/kg. Cytrynina stwierdzana była również w Japonii i innych krajach Dalekiego Wschodu, w zapleśniałym ryżu, który wywołał liczne zatrucia. Zdolność do tworzenia cytryniny wykazują liczne gatunki grzybów z rodzaju *Penicillium*.

Pochodną cytryniny, o nazwie **askoszytyna** zawierającą dodatkowy łańcuch boczny, wytwarza patogen grochu *Asochyta pisi*. Askoszytyna wykazuje właściwości fitotoksyczne, wywołuje nekrozę liści grochu i efekt membranowy. Jej właściwości zootoksyczne nie są jeszcze poznane.

Grzyby wytwarzające ochratoksynę A

Ochratoksynę A wytwarzają grzyby z 4 grup (Krogh 1977; Ciegler 1972; Ciegler i in. 1973; Harwig i Chen 1974; Bauer i Gedek 1973, Marquardt i Frohlich 1992):

- 1) grupy *Aspergillus ochraceus*, do której należą gatunki: *A. ochraceus* Wilhelm, *A. sulphureus* (Fries) Thom and Church, *A. alliaceus* Thom

and Church, *A. melleus* Yukawa, *A. sclerotiorum* Huber, *A. ostianus* Wehmer, *A. petraki* Vörös;

2) grupy *Penicillium verrucosum*

Grzyby te powszechnie występują na przechowywanym ziarnie zbóż i w rejonach o wyższej wilgotności mogą w czasie magazynowania powodować tworzenie mikotoksyn. Nie obserwuje się powstawania ochratoksyny A przed zbiorem zbóż na polu w krajach klimatu umiarkowanego. W Kanadzie USA, Danii i Szwecji najczęściej spotykanym grzybem, wytwarzającym ochratoksynę A, był gatunek *Penicillium verrucosum* Westling, natomiast w Polsce *P. verrucosum* i *Aspergillus ochraceus* Wilhelm (syn. *A. alutaceus* Berkeley et Curtis).

Wykonano dalsze prace nad innymi związkami, wykazującymi właściwości nefrotoksyn, a wytwarzanymi przez te same grzyby (Zimmermann i in. 1979).

Należy też podkreślić, że w pewnym procencie prób razem z ochratoksyną A występują cytrynina lub kwas penicylinowy. Obecność cytryniny przypisywana jest znanemu faktowi, że niektóre izolaty równocześnie wytwarzają ochratoksynę A i cytryninę. Natomiast gatunek *Aspergillus ochraceus* wytwarza kwas penicylinowy obok ochratoksyny A.

W okresie ostatnich 20 lat zaszły znaczne zmiany w taksonomii i nazewnictwie gatunków *Penicillium* i *Aspergillus*, co powoduje dezorientację dla osób, które nie mają do czynienia z taksonomią tych grzybów.

Występowanie

Obecność ochratoksyny A stwierdzono w ziarnie zbóż i w mieszankach paszowych w wielu krajach świata (Tabele 10 i 11). Dużo uwagi poświęca się tej mikotoksynie w krajach skandynawskich – Danii i Szwecji, krajach bałkańskich – Bułgarii, byłej Jugosławii, a od dwudziestu lat także w Polsce, Francji, Kanadzie, Stanach Zjednoczonych, Niemczech i na Węgrzech. Szczególnie częste występowanie ochratoksyny A w ziarnie zbóż stwierdzano w byłej Jugosławii, bo aż w 26% prób. A więc średnio w co czwartej próbie obecna jest ochratoksyna A. Obecność tej mikotoksyny stwierdzono także w posiłkach ludności wiejskiej, w podrobach, szynkach i kielbasach (Goliński i in. 1983a i b, 1984a i b).

W Szwecji w celu oceny zanieczyszczenia tą toksyną zbóż paszowych i pasz przeprowadzono analizę krwi trzody na terenie całego kraju korzystając z zależności, że zawartość ochratoksyny A we krwi trzody jest 1,5 razy większa niż w paszy (patrz Tabela 1). Stwierdzono, że we krwi trzody następuje uśrednienie stężenia mikotoksyny obecnej w paszy, tak że wystarczy wykonać analizę krwi jednego zwierzęcia, aby uzyskać wartość

średnią dla całego stada, o ile jest karmione tą samą paszą. W wyniku przebadania od marca do sierpnia 1978 r. zwierząt z 279 chlewni ochratoksynę A w stężeniu $>2 \text{ ng/cm}^3$ stwierdzono we krwi zwierząt z 47 chlewni co stanowi 16,8% (Hökby i in. 1979, Hult i in. 1979, 1980). Wskazuje to na dużą częstość występowania w Szwecji ochratoksyny A w paszy, którą trzoda jest żywiona. Z toksykologicznego punktu widzenia jest istotne, że tylko 0,7% badanych świń zawierało we krwi poziom ochratoksyny A przekraczający 50 ng/cm^3 , co odpowiada jej zawartości w nerkach równej 10 ng/g . Zgodnie z przepisami, wprowadzonymi w 1978 r. w Danii, tusze tych świń powinny ulec kasacji. Należy zaznaczyć, że w tych ostatnich badaniach nie brano pod uwagę zmian makroskopowych w nerkach, gdyż analizy wykonywano przyżyciowo. Okazuje się jednak, że ocena występowania tych zmian makroskopowych jest metodą znacznie mniej czułą i bardziej mylącą niż analiza krwi. W RFN w 1983 r. ochratoksynę A wykryto w 18,1% nerek, nie wykazujących żadnych zmian nefropatycznych, w ilości ok. $3 \text{ } \mu\text{g/kg}$, czasami do $10 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (Leistner 1984).

Szacunkową ocenę zanieczyszczenia pasz ochratoksyną w Danii wykazano na podstawie częstości występowania nerek nefropatycznych oraz ochratoksyny A w nerkach, co omówione zostanie w następnym rozdziale. Wyniki otrzymane w ten sposób są jednak znacznie mniej dokładne niż wyniki uzyskane na podstawie analizy zawartości ochratoksyny A w krwi.

Jak znaczące jest skażenie płodów rolniczych ochratoksyną A? W pełnoporcjowych mieszankach paszowych ochratoksyna A obecna jest w stężeniach, które można określić jako nieznaczące toksykologicznie, wynoszących $100 \text{ } \mu\text{g/kg}$ lub niższych. Natomiast jest mikotoksyną najczęściej obecną w ziarnie zbóż, bo występuje w 8% badanych prób, a więc średnio w co dwunastej. Częściej i w wyższych stężeniach obserwuje się ją w okresie wiosennym, po kilkumiesięcznym przechowywaniu ziarna (Chełkowski 1985, 1991). Aby wytworzyły się znaczące toksykologicznie stężenia ochratoksyny A, trzeba na ogół 2-3 miesiące przechowywania ziarna w podwyższonej wilgotności (rys. 3).

Tabela 10.

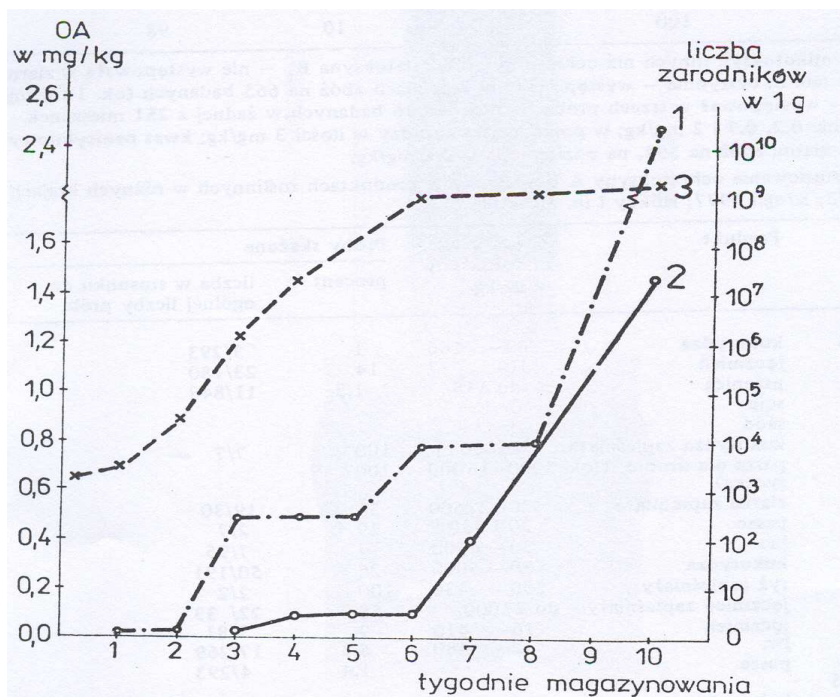
Skażenie mikotoksynami^{a)} ziarna pszenicy, jęczmienia, żyta, owsa, kukurydzy i przemysłowych mieszanek paszowych w Polsce w latach 1975-1981 (Chełkowski 1985, Goliński i in. 1983a i b, Sokołowski 1983).

Rodzaj produktu	Zawartość ochratoksyny A wartości średnie i skrajne w µg/kg	Procent prób skażonych	Liczba prób skażonych	Liczba prób badanych
Pszenica	130 (20-2400)	9,5	12	126
Jęczmień	175 (20-1200)	6,3	34	539
Żyto	250 (20- 800)	20,7	24	116
Owies	440 (80- 800)	9,1	2	22
Kukurydza	33 (25 – 40)	2,2	2	91
Ogółem ziarno zbóż	200 (20- 2400)	8,3	74	894
Mieszanki paszowe dla drobiu	150 (100-200)	0,8	2	251
Mieszanki paszowe różne	16-160	1,0	8	811
Śruty zbożowe	100	10,0	10	98

a) Występowanie mikotoksyn innych niż ochratoksyna A:

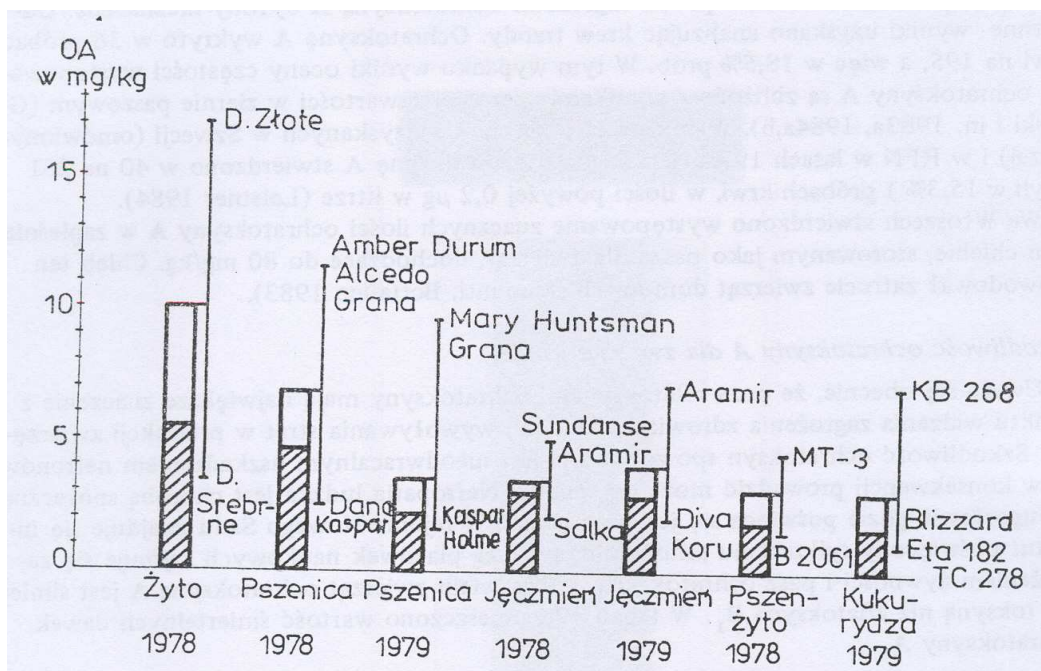
aflatoksyna B₁ nie występowała w ziarnie zbóż (pasze patrz Tabela 5),
cytrynina występowała w 2 próbach zbóż na 665 badanych (ok. 1 i 6 mg/kg);
zearalenon występował w trzech próbach zbóż na 636 badanych, w żadnej z 251 mieszanek paszowych, stężenie 0,2, 0,7 i 2 mg/kg; w porażonej kukurydzy w ilości 3 mg/kg;
kwas penicylinowy w pięciu próbach ziarna zbóż na 894, na poziomie 0,8-2,4 mg/kg.

Podatność poszczególnych gatunków zbóż jest zróżnicowana. Najbardziej podatne na atak grzybów, tworzących ochratoksynę A, jest ziarno żyta, jak również pszenicy, wyraźnie mniej podatne są pozostałe zboża: jęczmień, pszenżyto, kukurydza. Istotne też są różnice w podatności ziarna poszczególnych odmian. Szczególnie duże różnice obserwuje się w podatności różnych odmian pszenicy (rys. 4).



Rysunek 3.

Tworzenie się ochratoksyny A (OA) w czasie magazynowania przy nadmiernej wilgotności (25-30%) w temperaturze 15°C ziarna: 1-pszenicy, 2-jęczmienia, 3-wzrost zanieczyszczenia zarodników *Penicillium* i *Aspergillus*



Rysunek 4.

Różnice w podatności ziarniaków różnych odmian żyta, pszenicy, jęczmienia, pszenżyta i kukurydzy na rozwój toksynotwórczego grzyba *Aspergillus ochraceus*, mierzony ilością powstającej ochratoksyny A; zaznaczono wartości średnie i skrajne z podaniem nazw odmian najbardziej i najmniej podatnych; pole zaciemnione oznacza tę część toksyny, która kumuluje się w głębi ziarniaków, pole białe – część tworzącą się na powierzchni.

Dużej zawartości toksyny w ziarnie sprzyja jego zanieczyszczenie glebą, nasionami chwastów oraz wysoki procent nasion uszkodzonych, np. przez niewłaściwą regulację urządzeń młócących. Ziarno czyste, zdrowe, zachowujące zdolność kiełkowania, wolne od uszkodzeń zachowuje większą odporność na porażenie przez grzyby toksynotwórcze. Nie stwierdzono dotychczas w Polsce stężeń mogących wywoływać padnięcia, czyli zatrucia ostre. Przeciętne stężenie ochratoksyny A wynosiło ok. 200 µg/kg (por. Tabela 10). Stężenie takie może wywoływać zatrucie chroniczne trzody z typowymi zmianami w nerkach po 4 miesiącach tuczu.

Tabela 11.

Występowanie ochratoksyny A i cytryniny w produktach roślinnych w różnych krajach świata (Scott 1978; Krogh 1977; Hökby i in. 1979)

Kraj i rok	Produkt	Zawartość mikotoksyny w µg/kg	Procent prób skażonych	Liczba prób skażonych w stosunku do ogólnej liczby prób
Ochratoksyna A				
USA 1968-1975	kukurydza	83-166	1	3/293
	jęczmień	10-37	14	23/180
	pszenica	=<118	1,3	11/848
	soja	0		
	słód	0		
	kukurydza	16000	100	7/7
	zapleśniała pasza dla drobiu (toksyczna)	2000-16000	100	
Kanada 1968	ziarna zapleśniałe	20-27500	56	19/30
	pasze	20 i 530	29	2/7
	jw.	30-6000	7	7/95
Jugosławia 1975	kukurydza	50-5000	26	50/191
Japonia	ryż zapleśniały	230-430	100	2/2
Dania 1971	jęczmień	=<27000	58	22/33
	zapleśniały			
Szwecja 1972 1976	jęczmień	16-410	9	7/81
	jw.	2-480	6,3	17/269
W. Brytania 1971-1975	pasze		1,4	4/293
Francja 1973 1974	kukurydza	15-200	2,5	12/463
	jw.	25-200	1,3	2/75
RFN 1975- 1980	pasze		27	8/30
Cytrynina				
Kanada	ziarno zapleśniałe	70-80000	72	13/18
Dania	jęczmień	160-2000	9	3/33

Sporadycznie jednak występowały stężenia 1-2 mg/kg, mogące powodować straty w produkcji drobiu i trzody. Należy zaznaczyć, że obserwowano wyższe stężenie ochratoksyny przede wszystkim w próbach pochodzących bezpośrednio z gospodarstw rolnych. Próby te stanowiły główny procent (ok. 86%) prób zawierających tę toksynę. Cytrynina i kwas penicylinowy jako toksyny towarzyszące ochratoksynie A występowały w 0,5% prób (por. Tabela 10).

Dotychczas badania nerek trzody wykonano w rejonie poznańskim. Na 74000 nerek, przebadanych w okresie od kwietnia do lipca 1982 r. na linii ubojowej w rzeźni występowało 40 par nerek z objawami nefropatii, z których 22 zawierały ochratoksynę A w ilości 2-23 µg/kg. W okresie od sierpnia 1982 r. do marca 1983 r. stwierdzono wśród 151.000 nerek 73 sztuki ze zmianami nefropatycznymi, z których tylko 5 zawierało ochratoksynę A. Tak więc ocenione w ten sposób zagrożenie ochratoksyną A byłoby nieznaczne. Odmienne wyniki uzyskano analizując krew trzody z tej samej ubojni. Ochratoksynę A wykryto w 36 próbach krwi na 195, a więc w 18,5% prób. W tym wypadku wyniki oceny częstości występowania ochratoksyny A są zbliżone z wynikami oceny jej zawartości w ziarnie paszowym (Goliński i in. 1983a, 1984a i b). Wyniki te są podobne do uzyskanych w Szwecji (omówionych wyżej) i w RFN w latach 1982-1983, gdzie ochratoksynę A stwierdzono w 40 na 261 (czyli w 15,3%) próbach krwi, w ilości powyżej 0,2 µg w litrze (Leistner 1984). We Włoszech stwierdzono występowanie znacznych ilości ochratoksyny A w zapleśniałym chlebie, stosowanym jako pasza dla zwierząt, dochodzące do 80 mg/kg. Chleb ten spowodował zatrucie zwierząt domowych (Visconti i Bottalico 1983).

Od kilku lat zwraca się uwagę na zanieczyszczenie ochratoksyną A win białych i czerwonych we Włoszech i innych regionach śródziemnomorskich. Produkujący mikotoksynę grzyb *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom zasiedla owoce winogron w okresie ich zbioru. Mikotoksyna dostaje się następnie do moszczu i w następnym etapie do wina. Żerowanie owadów w winnicach powoduje nasilenie kolonizacji winogron przez produkujący mikotoksynę grzyb.

Szkodliwość ochratoksyny A dla zwierząt i ludzi

Uważa się obecnie, że poza aflatoksynami, ochratoksyny mają największe znaczenie z punktu widzenia zagrożenia zdrowia ludzkiego i wywoływania strat w produkcji zwierzęcej. Szkodliwość ochratoksyn spowodowana jest nieodwracalnym uszkodzaniem nefronów, co w konsekwencji prowadzić może do śmierci. Nefropatia ludzka jest chorobą społeczną w byłej

Jugosławii, gdzie poświęca się jej dużo uwagi. W rejonie Nowego Sadu znajduje się instytut poświęcony tylko temu schorzeniu, a szereg placówek naukowych zajmuje się zagrożeniem żywności i pasz ochratoksyną A. Dla wielu zwierząt ochratoksyna A jest silniejszą toksyną niż aflatoksyna B₁. W Tabeli 12 zamieszczono wartość śmiertelnych dawek ochratoksyny A.

Przy karmieniu zwierząt paszą, zawierającą ochratoksynę A, zależnie od zawartości mikotoksyny obserwuje się: padnięcia, objawy zatrucia podostrego, zatrucia przewlekłe (Prior i Sisodia 1978, Prior i in. 1978, Szczech i in. 1973, Zimmermann i in. 1979, Bennett i Klich 2003, Marquardt i Frohlich 2003, Task Force Report 2003).

Padnięcia występowały, o ile poziom skażenia był bliski dawki śmiertelnej (Tabela 12). Najbardziej wrażliwe na ochratoksynę A okazały się psy i świny, znacznie wrażliwsze niż kurczęta. Organizmy młodsze wykazują kilkakrotnie większą wrażliwość na ochratoksynę od dorosłych. W przypadku szczurów dawka DL₅₀ jest ok. 6 razy większa dla organizmów młodych niż dla dorosłych, wynosi odpowiednio 3,9 i 22 mg/kg.

Tabela 12.

Wartości dawek śmiertelnych (DL₅₀) ochratoksyny A dla różnych zwierząt (Marquardt i Frohlich 1992).

Zwierzęta	Wartość DL₅₀ w mg/kg
Zarodki kurze	0,4- 2,0 µg/zarodek
Psy	0,2- 3,0
Owce	1,0
Świny	1,0 – 2,0
Kaczęta	3,0 (150 µg/kaczę)
Kurczęta	3,0- 4,0 (135-166 µg/kurczę)
Pstrągi tęczowe	4,65
Szczury: jednodniowe	3,90
Dorośle	20 – 22

Objawy zatrucia podostrego obejmują: zmniejszenie wagi, u organizmów rosnących zmniejszenie tempa wzrostu, wzrost pragnienia i ilości wypijanej wody, uszkodzenie struktury i funkcji nerek i wątroby. Poza tym wykazano, że ochratoksyna A jest teratogenem i może wywoływać niedorozwój płodu. U kur niosek mikotoksyna ta wywołuje bardzo szybko spadek nieśności jaj, a przy zawartości 2-4 mg/kg paszy całkowity zanik nieśności (Tabela 13). Objawy zatrucia przewlekłego, przede wszystkim uszkodzenie funkcji i struktury nerek, obserwowano przede wszystkim u trzody (Tabela 14). Nefropatię trzody obserwowana w Danii, Szwecji, na Węgrzech, dawnym

RFN, w byłej Jugosławii, USA i w Polsce. Ze zmianami w nerkach wiązała się obecność ochratoksyny w obu nerkach trzody. Jeżeli stężenie ochratoksyny A w paszy wynosi 200 µg/kg, zmiany makroskopowe w nerkach świń występują po 4 miesiącach, natomiast przy poziomie 2-4 mg/kg – już po kilku dniach.

Tabela 13.

Wpływ obecności ochratoksyny A w paszy na zwierzęta karmione porażoną paszą (Krogh i in. 1974; Szczech i in. 1973; Zimmermann i in. 1979; Prior i in. 1978; Huff i in. 1975; Hult i in. 1976, Goliński i in. 1983)

Zawartość ochratoksyny A w paszy w mg/kg	Wpływ na skarmiane zwierzęta
4	objawy uszkodzenia nerek (nefropatii) u trzody w ciągu kilku dni, zwiększone pragnienie, zmniejszenie przyrostów
2-4	opóźnienie terminu początku nieśności kur i zmniejszenie nieśności, wysoka śmiertelność drobiu z objawami uszkodzenia nerek i wątroby
2	zmniejszenie przyrostów wagowych kurcząt
1	powiększenie nerek u kurcząt przy skarmianiu naturalnie skażonym ziarnem, zmniejszenie przyrostów masy ciała
0,2	powiększenie nerek u trzody po 2-4 miesiącach spasanía

Tabela 14.

Pozostałości ochratoksyny A wykryte w nerkach nefropatycznych trzody i kurcząt (Krogh 1977; Rutquist 1977; Elling i in. 1975; Leistner 1984; Goliński 1984)

Kraj	Rodzaj tkanek	Zawartość ochratoksyny A w µg/kg	Procent nerek zawierający ochratoksynę A	Liczba świń z nerkami nefropatycznymi na 100000 szt.
Węgry	nerki wieprzowe	5-100	39	20
Szwecja	jw.	2-104	25	-
Dania	jw.	2- 68	38	10-80
Dania	nerki kurcząt	4- 29	29	-
RFN	nerki wieprzowe			
	– neuropatyczne	do 1,8	21	-
	– zdrowe	do 10	18,1	-
Polska	nerki wieprzowe			
	– wiosna	do 23	55	50
	– jesień	do 2	7	

Stwierdzono szczególnie częste występowanie nefropatii u trzody na wyspie Bornholm (do 65 przypadków na 10.000 sztuk trzody w 1971 r.), zaś najniższe na Półwyspie Jutlandzkim. Epidemiczne wystąpienie choroby notowano w latach 1963 i 1971 (Krogh 1976).

Przyczyną obecności w Skandynawii ochratoksyny A w paszy dla trzody jest wysoki udział w niej ziarna jęczmienia. Farmerzy skandynawscy karmią trzodę własnym jęczmieniem z dodatkiem koncentratów białkowych. Wysoka wilgotność powietrza panująca w Danii i Szwecji powoduje, że ziarno łatwo jest porażane przez grzyby i w czasie przechowywania wytwarza się w nim ochratoksyna A. Najwyższa wykryta jej zawartość w ziarnie jęczmienia dochodziła do 27 mg/kg (Krogh i in. 1973).

W 1978 r. w Danii wprowadzono obowiązujące w rzeźniach przepisy nakazujące kasację wszystkich sztuk trzody, w których nerkach wykryto ochratoksynę A w ilości ponad 10 µg/kg, przy obciążeniu kosztami producenta. Ze względu na konieczność kasacji licznych sztuk trzody w 1979 r. i w następnych latach, górny dopuszczalny poziom ochratoksyny podniesiono do 25 µg/kg, wychodząc z założenia, że nerki i tak ulegają kasacji, a w innych tkankach stężenia ochratoksyny A będą odpowiednio niższe (por. Tabela 1).

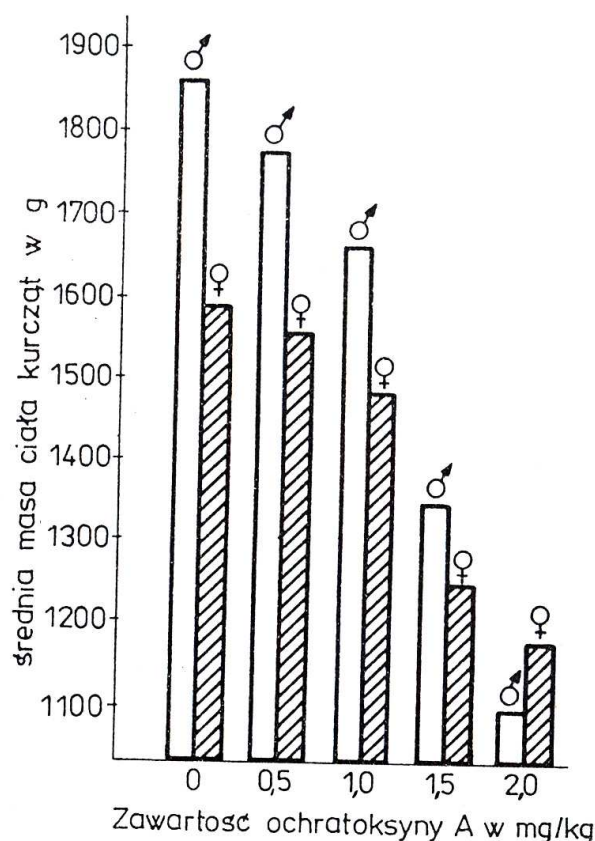
Ochratoksyna A jest też silną toksyną dla drobiu i jej obecność w paszach spowodowała liczne upadki brojlerów (indyków i kur) na fermach amerykańskich. Upadki na pięciu fermach, produkujących razem ok. 1 mln sztuk, dochodziły do 60%. Typowymi objawami były: powiększenie nerek i obniżony apetyt. Stężenie ochratoksyny w badanej paszy wynosiło 2-16 mg/kg (Hamilton i in. 1982, 1975, 1971).

Obecność ochratoksyny A w paszy wywołuje zmniejszenie przyrostów wagowych brojlerów, wzrost zużycia paszy na przyrost 1 kg masy ciała, opóźnienie początku nieśności i zmniejszenie nieśności kur w przypadku, gdy jej zawartość osiąga 1 mg/kg paszy (por. Tabela 12, rys. 5). Stężenia te nie są już metabolizowane i toksyna jest kumulowana w wątrobie i nerkach (rys. 6). Przy zawartości 2-4 mg/kg występuje wysoka śmiertelność drobiu oraz uszkodzenie nerek i wątroby (por. Tabela 12). Karmienie drobiu paszą wolną od mikotoksyny powoduje jej zanik w tkankach w ciągu 2-4 dni.

Podobnie jak w przypadku aflatoksyn obecność ochratoksyny A w paszy zagraża zdrowiu ludzkiemu, ponieważ toksyna jest kumulowana w tkankach zwierząt. Wyjątek stanowią przeżuwacze – bydło i owce, u których nie obserwuje się ochratoksykozy. W żwaczu tych zwierząt następuje szybki rozkład ochratoksyny A przez mikroflorę żwacza, nawet w przypadku pasz silnie skażonych, o stężeniu ochratoksyny A sięgającym 12 mg/kg.

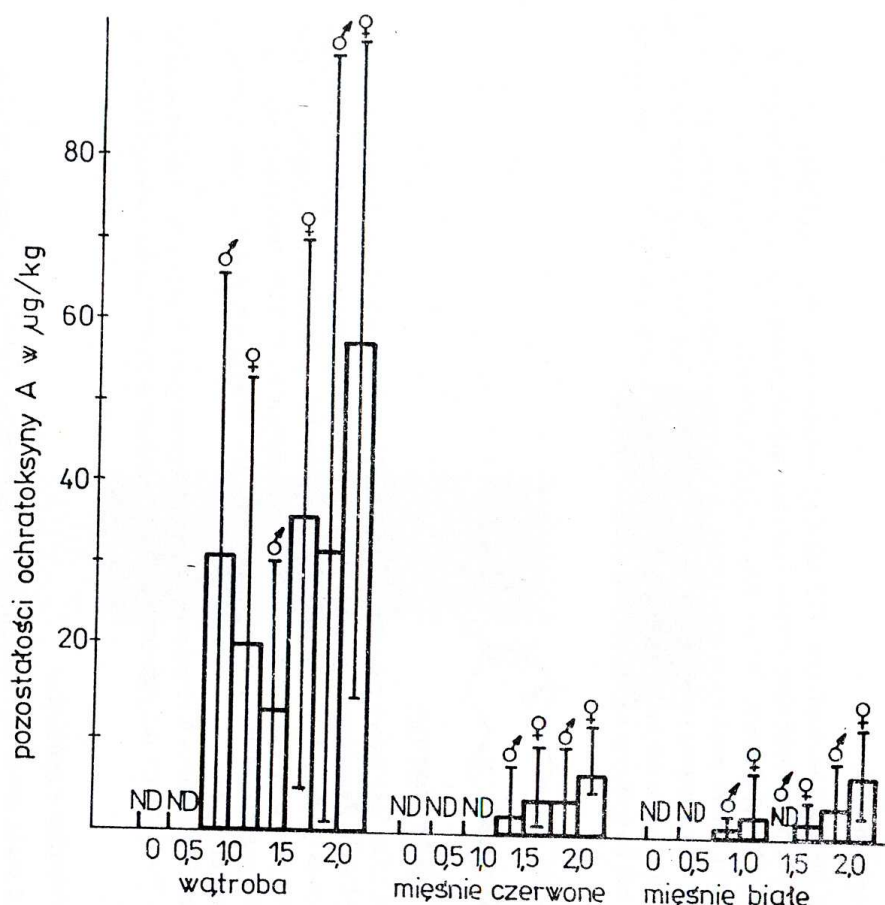
Sprzeczne są jak dotąd dane o rakotwórczości ochratoksyny A.

Początkowo tylko jedna praca japońska informowała, że ochratoksyna A wywoływała nowotwory nerek i wątroby u myszy (WHO 1979). Ochratoksyna A jest prawdopodobnie przekształcana w formę reaktywną przy udziale cytochromu P450 lub inne szlaki i dopiero forma zaktywowana jest przyczyną nowotworów nerek i wątroby (Fink-Gremmels 1999).



Rysunek 5.

Wpływ zróżnicowanych zawartości ochratoksyny A w paszy (odpowiednio 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg w kg) na przyrosty masy ciała kurcząt brojlerów w ciągu 8 tygodni tuczu (♀ kurki i ♂ kogutki). (Goliński i in. 1983b)



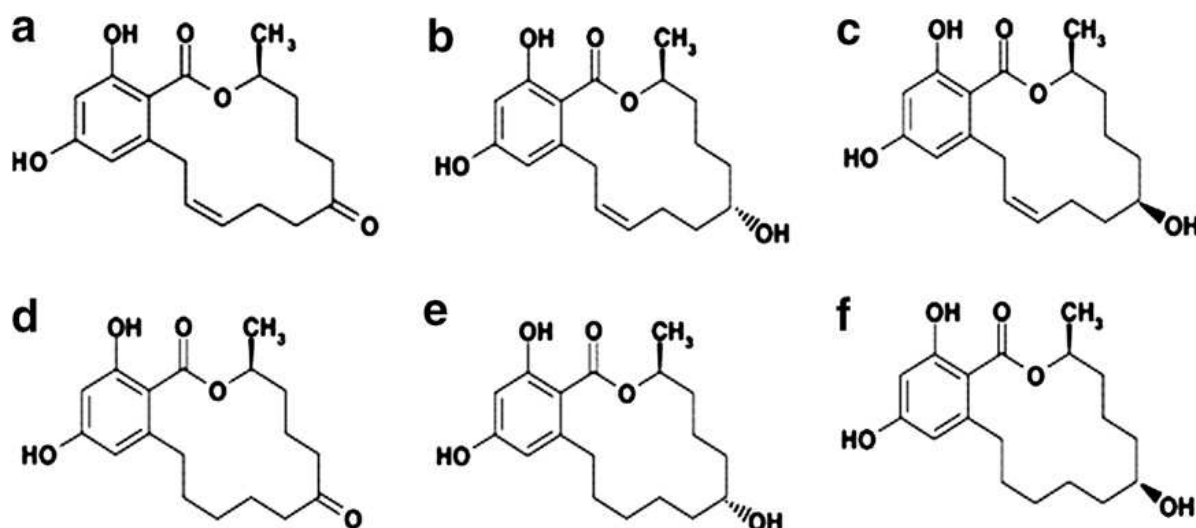
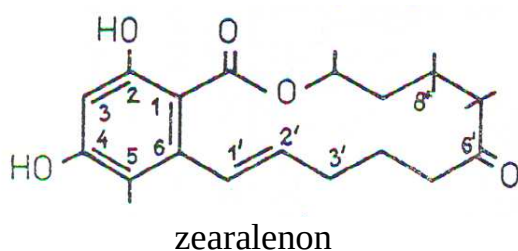
Rysunek 6.

Pozostałości ochratoksyny A w tkankach kurcząt po 8 tygodniach tuczu paszą o zróżnicowanych zawartościach toksyny (♀ kurki i ♂ kogutki). (Goliński i in. 1983b)

2.3. Zearalenon

Budowa i właściwości

Budowę zearalenonu (ZEA), początkowo nazywanego F-2 toksyną, ustalono w 1962 r. na Uniwersytecie Pardue w USA, jako metabolitu grzyba *Fusarium graminearum* o aktywności hormonalnej – estrogenicznej (Mirocha i Christensen 1974, Gromadzka i in. 2008). Pod względem chemicznym zearalenon jest β -rezorcyno-laktonem. Obok pierścienia rezorcynowego zawiera makrocykliczny pierścień laktonowy, którego układ przestrzenny jest podobny do układu hormonów sterydowych. Stąd zearalenon jest klasyfikowany jako niesteroidowy mykoestrogen.



Wzory przestrzenne zearalenonu i jego pochodnych: (a) zearalenon (ZEA), (b) α -zearalenol (α -ZEA), (c) β -zearalenol (β -ZEA), (d) zearalanon (ZAN), (e) α -zearalanol (α -ZAL) i (f) β -zearalanol (β -ZAL) (Zinedine i in. 2007)

Duży pierścień laktonowy zearalenonu jest bardzo trwały, nie ulega zarówno hydrolizie, jak i redukcji. ZEA po przedostaniu się do krwiobiegu powoduje zmiany funkcjonalne w układzie rozrodczym, podobnie jak naturalnie występujące estrogeny. Wykazano, że działanie estrogenne zearalenonu jest kilka razy silniejsze niż w przypadku naturalnie występujących estrogenów (Bennett i Klich 2003, Gromadzka i in. 2008).

W niewielkich stężeniach zearalenon wywiera stymulujące działanie na rosnące zarodki kukurydzy. Stwierdzono też jego działanie hormonalne w stosunku do zwierząt (Mirocha i Christensen 1976, Gromadzka i in. 2008). U zwierząt zearalenon ulega w wątrobie przekształceniu do α - i β -zearalenolu, przy czym β -zearalenol uznano za związek nietoksyczny, natomiast α -zearalenol wiąże się z receptorami estrogenowymi 10-20 razy silniej niż ZEA.

W ostatnich latach wykazano aktywność inhibowania przez zearalenon wzrostu grzybów takich jak *Alternaria*, *Cladosporium* i innych na pożywkach agarowych w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$.

Wykazano redukcję biosyntezy zearalenonu przez antagonistyczne grzyby rodzajów *Trichoderma* i *Clonostachys* (syn. *Gliocladium*). Stwierdzono, że antagonistyczny izolat *T. atroviride* skutecznie hamował zarówno wzrost grzybów *F. graminearum* i *F. culmorum* jak i produkcję zearalenonu w 97 do 99%. Podobną efektywność redukcji produkowanej toksyny uzyskano w bikulturze *F. culmorum* i czterech izolatów *Clonostachys* (*Gliocladium*) wynoszącą od 89 do ponad 99% (Gromadzka i in. 2009). Ten ostatni grzyb wytwarza enzym laktonazę zearalenonu. Enzym ten powoduje otwarcie pierścienia laktozowego, a następnie samorzutną dekarboksylację. W efekcie powstaje nieaktywna hormonalnie pochodna ZEA.

Grzyby wytwarzające zearalenon

Jak dotąd stwierdzono wytwarzanie zearalenonu przez następujące gatunki grzybów: *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* i *F. equiseti* (Marasas i in. 1984, Bottalico i Perrone 2002).

Z uwagi na posługiwanie się przez różne pracownie równocześnie kilkoma systemami klasyfikacyjnymi – często ten sam grzyb znajduje się w publikacjach pod różnymi nazwami. W wielu pracach, szczególnie amerykańskich, stosowana była nazwa *Fusarium roseum*, obejmująca kilka gatunków według klasyfikacji Booth'a, Nelsona czy Nirenberg, najczęściej jest ona synonimem gatunku *F. graminearum* (Mirocha i Christensen 1974, 1976, Marasas i in. 1984).

Zdecydowanie głównymi gatunkami tworzącymi zearalenon jako zanieczyszczenie ziarna zbóż są *F. graminearum*, *F. culmorum*, w mniejszym stopniu *F. cerealis* (*F. crookwellense*). Przeciętnie 90-100% izolatów tych grzybów wytwarza duże ilości zearalenonu. Tak więc porażenie zbóż tymi grzybami wiązać się będzie z obecnością w ziarnie mikotoksyny ZEA oraz mikotoksyn trichotecenowych (Hesseltine i in. 1978, Bottalico 1998, Bottalico i Perrone 2002). Grzyby te powodują corocznie znaczące straty w rolnictwie. Są silnymi patogenami roślin. zbożowych, a także motylkowych, zarówno siewek, jak i roślin dojrzewających, wykształcających nasiona. Wywołują zgorzel przedwchodową i powschodową siewek, zgorzel podstawy źdźbła i łodyg, fuzariozę kłosów (ang. scab) i fuzariozę kolb, nazywaną zgnilizną czerwoną i różową (Tuite 1979).

Te ostatnie choroby są przyczyną tworzenia się zearalenonu już w polu, a zawartość toksyny w ziarniakach kukurydzy w USA dochodziła w 1972 r. do 5 mg/kg, a w ziarniakach pszenicy w 1975 r. do 11 mg/kg (Hesseltine i in. 1978). Przy słabym nasileniu choroby w nasionach zasiedlonych grzybem toksyna może się tworzyć w większych ilościach w trakcie dłuższego składowania przy podwyższonej wilgotności (22% lub wyższej).

Temperatura 22-25°C sprzyja większej szybkości tworzenia się zearalenonu około dziesięciokrotnie w porównaniu z temperaturą niższą – rzędu 12-14°C (Bottalico 1998).

Grzyby toksynotwórcze przenoszone są z materiałem siewnym i mogą przetrwać w nasionach co najmniej dwa lata. Zearalenon odgrywa rolę w rozwoju procesu chorobowego roślin zbożowych dzięki temu, że wywołuje efekt membranowy.

Stwierdzono, że izolaty silnie patogeniczne tworzą wysokie stężenia zearalenonu w hodowlach *in vitro* (Chełkowski 1998). Silny efekt fitotoksyczny cechuje też tworzone przez wymienione gatunki inne metabolity, głównie deoksyniwalenol i niwalenol, opisane w następnym paragrafie.

Występowanie

Zearalenon jest mikotoksyną zanieczyszczającą przede wszystkim ziarno zbóż, najczęściej kukurydzę (Tabele 15 i 16). Jako patogeny roślin zbożowych grzyby tworzące zearalenon porażają rośliny w polu i bardzo wysoki procent ziarniaków zbóż zawiera inokulum tych grzybów. W Polsce obecność grzybów tworzących zearalenon w latach 1978-1980 stwierdzono w 31% prób ziarna, co świadczy o dużym rozpowszechnieniu producentów tej mikotoksyny na roślinach zbożowych (Chełkowski 1998). Jednak obecność tych grzybów nie szła w parze z zanieczyszczeniem zearalenonem.

Znaczące zawartości zearalenonu stwierdzono w ziarnie pszenicy i jęczmienia w USA, Kanadzie, Szwecji, Anglii i Finlandii. Jednak zdecydowanie najwyższe zawartości zearalenonu zawierała kukurydza: ziarno lub kiszonki z całych kolb. Ziarno kukurydzy w momencie zbioru zawiera zwykle 20-30% wody i o ile po zebraniu nie zostanie szybko wysuszone, to obecne w nim inokulum gatunków *F. graminearum*, *F. culmorum* i innych może doprowadzić do rozwoju tych grzybów i wytworzenia znaczących ilości mikotoksyny (Bottalico 1998). Przeprowadzona analiza pasz, które spowodowały na farmach w USA syndrom estrogeniczny u trzody, wykazała zawartości zearalenonu niższe niż stwierdzone w próbach ziarna zbóż (Tabela 15).

Badania przeprowadzone w Polsce nie wykazały dotąd znaczących zawartości zearalenonu w krajowym ziarnie (patrz notka do Tabeli 10). Stwierdzono jego obecność w ziarnie kukurydzy porażonej w polu w ilości 3 mg/kg (Bottalico i in. 1998). W pszenicy natomiast zawartość toksyny kształtowała się na poziomie od 10 do 200 µg/kg (Perkowski i in. 1999). W próbach ziarna pszenicy z kłosów porażonych przez *F. graminearum* zawartość zearalenonu w roku 2005 wynosiła 32 do 580 µg/kg a w we frakcji FDK dochodziła do 2,9 mg/kg (Gromadzka i in. 2008).

Goliński i in. (2003) analizowali zanieczyszczenie zearalenonem darni pastwiska, gdzie toksyna ta występowała w ilości nie przekraczającej 50 µg/kg. Ponadto przeprowadzono analizy zawartości ZEA w karmach dla zwierząt pokojowych. Poziom na jakim występowała toksyna był w niektórych próbach dość wysoki – mieścił się w zakresie od 1,3 do 376,4 µg/kg.

Zawartość toksyny została także określona w środowisku wodnym. Badaniom na obecność zearalenonu poddano wody powierzchniowe i gruntowe na obszarze Wielkopolski (Gromadzka i in. 2009). Zearalenon obecny był w większości przebadanych próbek w stężeniu od 0,5 do 43,7 ng/l.

Do chwili obecnej opublikowano niewiele prac dotyczących naturalnego występowania zearalenonu w tkankach zwierzęcych. Analizowano stężenie ZEA w surowicy krwi, nerkach, wątrobie i mięśniach świń. Wykryto go tylko w próbkach surowicy z największym stężeniem wynoszącym 0,96 ng/ml.

Badania dotyczące występowania ZEA w tkankach i krwi zwierząt pokojowych zostały przeprowadzone w Polsce w 2005 roku (Waśkiewicz 2006). ZEA wykryto w patologicznie zmienionych tkankach narządów rozrodczych i krwi psów i kotów na poziomie odpowiednio 0,5-2,9 ng/ml i 0,5-2,8 ng/g. Stwierdzono wysoką częstotliwość występowania tej toksyny; zidentyfikowano ZEA w 65% próbek tkanek i 90% próbek krwi. Ponadto zaobserwowano, że w 55% przypadków mikotoksyna ta była obecna zarówno we krwi jak i innych tkankach badanych zwierząt. Inne prace prowadzone w Polsce dotyczyły zmian w obrębie jajników u suk (Skorska-Wyszyńska i in. 2004). Zwierzętom podawano przez tydzień ZEA na poziomie 200 µg/kg masy ciała, a zmiany patologiczne wykryto podczas badań histopatologicznych w jajnikach z licznymi przekrwieniami w części rdzeniowej i uszkodzeniami pęcherzyków jajnikowych.

Szkodliwość dla ludzi i zwierząt

W 1927 r. Buxton, a w 1928 r. Legenhansen w USA niezależnie od siebie opisali chorobę, nazwaną syndromem estrogenicznym lub hyperestrogenizmem trzody. Mac Nutt w tymże 1928 r. jako przyczynę choroby sugeruje kukurydzę porażoną grzybami rodzaju *Fusarium*, którą karmiono trzodę. Jak wynika z Tabeli 16, zwiększone nasilenie syndromu estrogenicznego obserwowano w szeregu krajach, schorzenie to jest więc rozpowszechnione. Zwiększone upadki zwierząt (ang. field outbreaks) związane są z nasileniem chorób fuzaryjnych zbóż, szczególnie kukurydzy. Po ustaleniu budowy zearalenonu i wykazaniu, które gatunki grzybów związek ten produkują rozpoczęto badania nad jego szkodliwością dla zwierząt i uznano go za mikotoksynę, a raczej mikohormon, przyczyniającą

się do znacznych strat ekonomicznych w produkcji zwierzęcej.

ZEA charakteryzuje się stosunkowo niską toksycznością ostrą. W badaniach prowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych (myszy, szczury, świnki morskie) wartość DL_{50} kształtowała się w granicach od 2000 do 20000 mg/kg masy ciała (Flannigan 1991). Ruzsas i in. (1979) zaobserwowali wpływ długotrwałego przyjmowania kukurydzy skażonej ZEA na układ rozrodczy u dorosłych szczurów albinosów. Podczas przeprowadzonych badań wykazano, że wskaźniki płodności spadły o 25-30%, w połączeniu ze zmniejszoną wagą gonad, zaburzonym dojrzewaniem pęcherzyków i spermatogenezą, zaburzeniami w cyklu pochwowym i zaburzoną płodnością ich potomstwa. Podczas innych badań laboratoryjnych zaobserwowano także: zmienioną wagę gruczołów nadnerczy, tarczycy i przysadki, oraz zmiany w poziomie progesteronu i estradiolu w surowicy krwi, jednakże, nie stwierdzono wpływu teratogenicznego u myszy, szczurów, świnek morskich i królików (Zinedine i in. 2007).

Ze zwierząt domowych najbardziej wrażliwa na zearalenon jest trzoda, która reaguje na zawartość kilku miligramów tego związku w kilogramie paszy (Tabela 17). Zawartość zearalenonu rzędu 1-5 mg/kg wywołuje zmiany w narządach rodnych svin nazywane syndromem estrogenicznym. Zawartość 100 mg zearalenonu w kilogramie paszy powoduje natomiast natychmiastową całkowitą bezpłodność macior. W badaniach kontrolowanych, zmiany wywołane obecnością zearalenonu zaobserwowano już przy 40 μ g/kg masy ciała na dzień u svin natomiast u szczurów przy 100 μ g/kg masy ciała. Stwierdzono, że wysokie stężenia ZEA (50-100 μ g/kg) w diecie svin mają niekorzystny wpływ na zapłodnienie, owulację i zagnieżdżenie się jaja. Może być przerwany również rozwój błony łożyska i rozwój płodu, powodując zmniejszoną wielkość miotu i żywotność nowonarodzonych prosiąt. To działanie zearalenonu jest najgroźniejsze w chowie trzody, gdyż obniża reprodukcję, która jest kosztowna. Szczególnie wrażliwe na zearalenon są młode maciorki. U osobników męskich zachodzą zmiany feminizacyjne – powiększenie gruczołów mlecznych, a także atrofia jąder aż do bezpłodności. Gęsi okazały się niewrażliwe na obecność zearalenonu, kaczęta reagowały na zawartość ok. 10 mg/kg paszy zmniejszeniem przyrostów. Natomiast 40 mg ZEA/kg paszy obniżało nieśność kur niosek.

W Nowej Zelandii i Europie wykazano, że u owiec i bydła pasącego się na pastwiskach, których trawa zawierała ZEA, występowały problemy z rozrodem (Task Force Report 2003). Seeling i in. (2005) badali wpływ żywienia krów mlecznych pszenicą skażoną różnymi dawkami zearalenonu na ich metabolizm. Stosunkowo stałe wartości odzysku ZEA, α -zearalenolu i β -zearalenolu w kale (przy różnych poziomach spożycia zearalenonu) wskazują na możliwość redukcji zawartości tej toksyny zawartej w paszy

przez mikroorganizmy przewodu pokarmowego, głównie zważca. Przewód pokarmowy bydła ogrywa rolę detoksykatorem w stosunku do szeregu mikotoksyn dzięki rozwijającym się w nim drobnoustrojom – bakteriom i pierwotniakom.

Tabela 15.

Naturalne występowanie zearalenonu w różnych krajach świata (Scott 1978; Rodricks i in. 1977; Hesseltine i in. 1978; Betina 1989, Gromadzka i in. 2008).

Surowiec	Zawartość ZEA w µg/kg	Stosunek liczby prób skażonych do badanych	Kraj	Rok
Kukurydza	100-5000	38/223	USA	1972
	43-10000	5/191	Jugosławia	1975
	1300-20000	6/6	Jugosławia	1972
		200	Węgry	1970
	=<17000	104/328	Austria	1977-1982
	=<170000	62/75	Francja	1974
	średnio 1700	-	Chorwacja	2004
	40-1800	-	Anglia	1998
	4-140	-	Włochy	1998
Pszenica	65-5600	14/14	USA, Kanada	
	360-11000	19/102	USA	1975
	10-100	-	Polska	1990
	20-240	-	Austria	2004
	2-174	-	Holandia	1990
Jęczmień	500-750	2/12	Szkocja	
	100-40000	24/230	Finlandia	1976/1977
Karmy dla zwierząt	25-600	-	Belgia	2003
	1,3-376,4	-	Polska	2006
Płatki śniadaniowe	8-232	-	Anglia	2003
Siano ^{a)}	14000	–	Anglia	

Próby związane z hyperestrogenizmem trzody ^{a)}

Kukurydza	0,10-0,15
Pasza dla macior	0,25
Śruta sezamowa	1,5
Mieszanka paszowa	0,12
Ziarno kukurydzy	6,4
Pasza granulowana	6,8

a) Badano po 1 próbie pasz nadesłanej przez weterynarzy.

Pojawienie się na rynku gotowych karm suchych i wilgotnych przeznaczonych dla zwierząt pokojowych (ang.: pets), głównie psów i kotów, wywołało dużą ich podaż na rynku. Złe warunki magazynowania karm suchych mogą być przyczyną strat ich wartości odżywczej, jak również powodować rozwój flory grzybowej nawet w okresie przydatności do spożycia (Golinski i Nowak 2004). Zarówno typowe jak i lecznicze – gotowe i zbilansowane karmy dla psów i kotów, zawierają w swoim składzie nawet do 80% komponentów pochodzenia roślinnego (ziarno zbożowe, suszone warzywa, nasiona roślin strączkowych). W związku z tym mogą one stanowić potencjalne źródło substancji szkodliwych, w tym również zearalenonu (Skorska-Wyszyńska i in. 2004), a proces technologiczny wytwarzania tych karm nie może w pełni ustrzec przed rozwojem grzybów pleśniowych (Popiel i in. 2004).

Tabela 16.

Występowanie zwiększonego nasilenia syndromu estrogenicznego trzody w różnych krajach świata (Rodricks i in. 1977).

Kraj	Rok	Rodzaj paszy, który wywoływał hyperestrogenizm
USA	1928	Kukurydza
Australia	1937	jw.
Irlandia	1952	Jęczmień
Francja	1962	Kukurydza
Włochy	1962	jw.
Jugosławia	1963	kukurydza i jęczmień
Rumunia	1967	kukurydza
Węgry	1968	jw.
Dania	1968	Jęczmień
Kanada	1971	Kukurydza
Austria	1980	jw.

Tabela 17.

Wpływ obecności zearalenonu w paszy na trzodę i drób.

Zawartość zearalenonu w mg/kg	Objawy
100	całkowita bezpłodność macior, bez wpływu na rozwój i nieśność gęsi
40	po 10 dniach obniżona masa ciała i nieśność kur niosek
10	zmniejszenie przyrostów wagowych drobiu
1-5	zmiany narządów rodnych u świń (<i>vulvovaginitis</i>)

Szczególnie warte uwagi wydają się być zatrucia chroniczne działającymi długo – niskimi, progowymi dawkami, z jakimi mamy najczęściej do czynienia w żywieniu czy to zwierząt czy ludzi (Gajęcka i in. 2004, McEvoy i in. 2001).

U samic zwierząt pokojowych (suki, kotki), podczas rutynowych kontroli lekarskich zaobserwowano zmiany wynikające między innymi z estrogenizacji wywołanej zawartymi w karmie mikotoksynami (Fritsche i Steinhart 1999). Objawami hiperestrogenizmu zauważalnymi u tych zwierząt są: obrzęk i powiększenie sromu, wyłysienie i nadmierna pigmentacja skóry krocza, boków i brzucha oraz wtórnie pojawiający się łojotok oraz woskowinowe zapalenie ucha zewnętrznego. Natomiast zmiany wykrywane badaniami klinicznymi można podzielić na trzy kategorie:

- zaburzenia cyklu płciowego, łącznie z niepłodnością
- zaburzenia przebiegu ciąży i porodu, łącznie z ciążą urojeniową
- zmiany patologiczne w obrębie narządów rodnych i gruczołu mlekowego

Ponadto śródoperacyjnie i badaniem histopatologicznym stwierdzono torbielowate zmiany jajników i aktywne hormonalnie guzy gonad, które determinują pojawienie się zapalenia pochwy. Nie wyklucza się także wpływu czynników estrogenizujących na powstawanie nowotworów jajników, macicy, pochwy oraz gruczołu mlekowego. Różnice we wrażliwości na zearalenon i jego pochodne, wśród zwierząt domowych i towarzyszących, odnoszą się do różnych profili metabolicznych charakterystycznych dla poszczególnych gatunków.

Hyperestrogenizm zwierząt domowych jest schorzeniem występującym przede wszystkim w krajach produkujących dużo kukurydzy, w których ziarno kukurydzy stanowi główny ilościowo składnik paszy dla trzody: na Węgrzech, w Jugosławii, Francji, południowej Austrii, USA, Kanadzie i Południowej Afryce (WHO 1979, Task Force Report 2003).

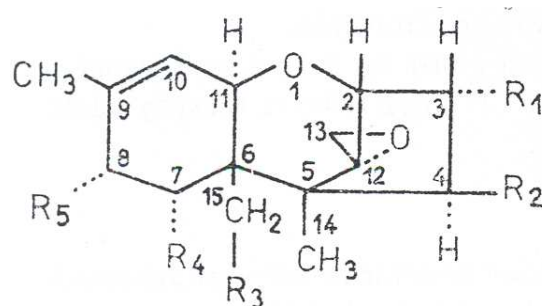
W Polsce zanieczyszczeniu zbóż i pasz zearalenonem dotychczas poświęcano mało uwagi i brak jest danych o występowaniu tego schorzenia u trzody. Małe dawki zearalenolu – pochodnej zearalenonu – przyspieszają wzrost i otluszczenie bukatów i znalazły zastosowanie w formie preparatu powoli uwalniającego się pod nazwą Ralgro, który wstawiano bukatom pod skórę. Aktualnie stosowanie tego preparatu w produkcji zwierzęcej jest zabronione w krajach Unii Europejskiej od roku 1989. Zalecany górny próg spożycia ZEA wynosi 0,05 µg/kg masy ciała dziennie.

2.4. Trichoteceny

Budowa i właściwości

Trichoteceny są metabolitami o charakterze epoksydów seskwiterpenowych. Związki z tej grupy były izolowane i identyfikowane początkowo jako antybiotyki, np. w 1946 r. werukaryna, a w 1961 r. diacetoksycirpenol (DAS). Intensywniejsze badania nad trichotecenami rozwinęły się po odkryciu na Uniwersytecie Wisconsin w 1968 r. T-2 toksyny. Obecnie znanych jest ok. pięćdziesięciu metabolitów z tej grupy mikotoksyn wytwarzanych w kulturach laboratoryjnych (Ueno 1983, Betina 1989, Chełkowski 1989, Task Force Report 2003, Desjardins 2006).

W Tabeli 18 zestawiono najlepiej poznane trichoteceny. Wszystkie te związki zawierają szkielet 12, 13-epoksy- Δ 9-trichotecenowy z podwójnym wiązaniem między 9 i 10 węglem, a różnią się podstawnikami (R_1 - R_5) przy tym szkielecie podstawowym.



Podstawowy pierścień trichotecenu, obecny w większości pochodnych.

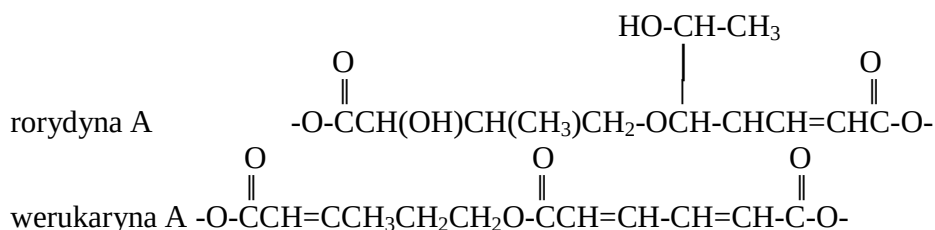
Trichoteceny podzielono na cztery grupy A, B, C i D. Metabolity grupy A należą do najbardziej toksycznych i cechują się tym, że zawierają łańcuch boczny przy węglu C₅. Należą tutaj T-2 toksyna, HT-2 toksyna, diacetoksycirpenol, neosolaniol i inne pochodne. Związki te cechują się zdolnością wywoływania zapaleń skóry (ang. skin irritating factor).

Trichoteceny grupy B w pozycji 8 mają podstawiony tlen, stąd są nazywane 8-ketotrichotecenami, należą tu: niwalenol, fuzarenon, deoksyniwalenol (DON=womitoksyna), diacetylniwalenol. Związki te są mniej toksyczne od związków grupy A, nie wywołują podrażnienia skóry, działają za to silnie wymiotnie. Są związkami bardzo polarnymi i do ich ekstrakcji trzeba stosować bardzo polarne rozpuszczalniki, np. metanol lub mieszaninę metanolu z wodą lub acetonitrylu z wodą.

Tabela 18.

Zestawienie mikotoksyn z grupy trichotecen wstępujących najczęściej jako zanieczyszczenia produktów rolnych.

Trichoteceny	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Trichoteceny grupy A					
T-2 toksyna	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2 toksyna	OH	OH	OAc	H	jw.
Diacetoksycirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
Trichotecen	H	H	H	H	H
Trichodermina	H	OAc	H	H	H
Trichoteceny grupy B tzw. 8-keto-trichoteceny					
Deoksyniwalenol (DON)	OH	H	OH	OH	=O
Niwalenol	OH	OH	OH	OH	=O
Fuzarenon	OH	OAc	OH	OH	=O
3-acetylo-DON	OAc	H	OH	OH	=O
15-acetylo DON	OH	H	OAc	OH	=O
Trichotecyna	H	OCO=CHCH ₃	H	H	=O
Trichoteceny grupy C			-R ₂ -R ₃		



Wreszcie trichoteceny grupy C są to związki tzw. makrocycliczne, zawierające oprócz szkieletu trichotecenowego dodatkowy pierścień aromatyczny. Zalicza się do tej grupy werukaryny, rorydyny i satratoksyny z odpowiednimi oznaczeniami literowymi. Najważniejszymi są rorydyna A, werukaryna J i satratoksyny G i H (Ueno 1983).

Do grupy D zaliczane są trichoteceny dwuepoksydowe np. krotecyna.

Za najistotniejsze z toksykologicznego punktu widzenia uważa się deoksyniwalenol (womitoksyne), choć metabolitem najsilniej toksycznym często występującym jest z grup A i B T-2 toksyna. Do występujących dość często zaliczyć można też diacetoksycirpenol (DAS). Satratoksyny G i H udało się zidentyfikować w porażonych pszach i ziarnie zbóż.

Grzyby toksynotwórcze

Poważną trudność w drugiej połowie XX wieku stanowiło prawidłowe zestawienie nazw gatunkowych grzybów, wytwarzających te toksyny (Ueno 1983; Marasas i in. 1984, Chelkowski 1989). Według wielu prac

trichoteceny grupy A, a mianowicie: T-2 toksyna, HT-2 toksyna i inne ich pochodne, wytwarzane są przez następujące gatunki *Fusarium*: *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. sambucinum* i *F. langsethiae*.

Ponieważ po wprowadzeniu przez Snydera i Hansena w 1945 r. uproszczonej klasyfikacji rodzaju *Fusarium* grzybów nazwy gatunków toksynotwórczych tworzących T-2 toksynę i jej pochodne nie zawsze są adekwatne. Należy się odnieść krytycznie do nazw podawanych w podręcznikach i pracach naukowych z okresu przed rokiem 1985. Jako tworzący T-2 toksynę wymieniany jest gatunek *F. tricinctum*, co jest całkowicie błędne. Dopiero praca zespołu ekspertów naprawiła błędne oznaczenia gatunków w tych pracowniach, które przyjęły system Snydera i Hansena (Marasas i in. 1984).

W ostatnich dwu dekadach prowadzone są intensywnie prace nad toksynotwórczością grzybów rodzaju *Fusarium* i uporządkowaniem identyfikacji gatunków toksynotwórczych. Zdecydowanie najczęściej spotyka się *F. sporotrichioides* Sherb jako nazwę gatunku wytwarzającego T-2 toksynę i jej pochodne. W jednym ze szczepów wyizolowanych z ziarna polskiej pszenicy zidentyfikowano jedenaście związków z grupy trichotecen (Visconti i in. 1984). Szczepy tworzące toksyny grupy A stosunkowo rzadko są obecne wśród grzybów z rodzaju *Fusarium* występujących na roślinach zbożowych czy ziarnie zbóż. Na ogół stanowią one 1-2% izolatów *Fusarium*. Nie są też opracowane pod względem patogeniczności, choć jak omówiono to w rozdziale 3, ich metabolity są silnymi fitotoksynami.

Diacetoksycirpenol (DAS) jest produkowany z kolei przez *Fusarium equiseti* oraz *F. sambucinum*. Bardzo rozpowszechniony grzyb *Trichoderma brevicompactum* wytwarza pochodną o nazwie harzianum A. Gatunek wywołujący tzw. gorzką zgniliznę jabłek – *Trichothecium roseum*, tworzy związek o podobnej budowie, nazwany trichotecenem (Tabela 18). Na razie mało jest danych, ażeby można mówić o znaczeniu tych toksyn w sensie epidemiologicznym, ale wydaje się, że występują one nie tak często jak związki trichotecenowe z grupy B.

Na ziarnie zbóż i chorych roślinach zarówno w Polsce, jak i w innych krajach, najczęściej występują grzyby wytwarzające deoksyniwalenol (DON=womitoksynę). Jest on wytwarzany przez gatunki *F. culmorum* i *F. graminearum* te same, które wykazują zdolność do syntezy zearalenonu. Stąd DON często występuje razem z zearalenonem (Bottalico 1998, Bottalico i Perrone 2002, Chełkowski 1998). Wysoki procent izolatów tych grzybów wykazuje zdolność do syntezy DON i jego pochodnej – 3-acetylodeoksyniwalenolu 3AcDON lub 15AcDON. Możliwość powstawania DON można określić jako równie prawdopodobną jak zearalenonu. Częste wytwarzanie DON przez patogeniczne grzyby z rodzaju *Fusarium* oraz

udokumentowana jego fitotoksyczność wskazuje na to, że związek ten może mieć znaczenie w procesie chorobowym wywołanym przez *F. culmorum* i *F. graminearum*. Wszystkie silnie patogeniczne szczepy cechuje zdolność syntezy DON i jego acetylopo pochodnych.

Wyodrębniono kilka chemotypów u gatunków tworzących trichoteceny grupy B; chemotyp niwalenolu, chemotyp 3-acetyloDON i chemotyp 15-AcDON. Przynależność izolatów do poszczególnych chemotypów ocenia się zarówno na podstawie analizy mikotoksyn tworzonych w kulturach laboratoryjnych, jak również wykorzystując markery DNA gatunkowo i chemotypowo specyficzne (Chełkowski i in. 2002, Buśko i in. 2008, Stępień i in. 2008).

Ponieważ często rośliny są porażane przez szereg gatunków z rodzaju *Fusarium* równocześnie, w porażonej silnie próbie może być obecnych kilka różnych mikotoksyn. Rozwojowi grzybów i tworzeniu toksyn sprzyjają: silne inokulum patogenów toksynotwórczych, obfite opady w okresie kwitnienia zbóż, a także liczne występowanie owadów uszkadzających rośliny i roznoszących zarodniki (Tuite 1979, Chełkowski 1998, Bottalico i Perrone 2002). Zasadnicze znaczenie dla akumulacji mikotoksyn w ziarnie zbóż drobnoziarnistych ma znaczące porażenie kłosów, a dzięki temu ziarniaków, prowadzące do fuzariozy kłosa. Porażone kłosa wyraźnie odróżnić można od kłosów zdrowych.

Omówienie gatunków toksynotwórczych znaleźć można w pracach; Kwaśna i in. 1991, Chełkowski 1989, Marasas i in. 1984, Chełkowski 1998, Leslie i Summerel 2006, Desjardins 2006.

Trichoteceny makrocycliczne wytwarzają inne grupy grzybów: *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*. Gatunki *Myrothecium verrucaria* i *M. roridum* są rozpowszechnione w glebie, mogą być patogeniczne m.in. dla roślin z rodziny *Cucurbitaceae*, np. dla melonów, a także koniczyń i lucerny lub żyć w symbiozie z korzeniami takich roślin jak: *Baccharis megapotamica* i *B. coridifolia*. Wytwarzają one liczne związki, nazywane rorydynami (Jarvis i in. 1981) i werukarynami, o właściwościach antybiotycznych, zootoksycznych i fitotoksycznych. Grzyby te występują także w Polsce, mało jest jednak o nich danych. Lepiej poznany gatunek *Stachybotrys atra* jest często obecny w glebie, dobrze rozwija się na takich surowcach jak słoma. Izolowano go też z nasion jako patogena warzyw. Gatunek ten wytwarza związki o nazwie satratoksyny G i H. Brak jest informacji o występowaniu w Polsce producentów tych silnych toksyn. Obficie występowały one na Węgrzech (Harrach i Bata 1983) i na Ukrainie (Ueno 1983).

Występowanie trichotecen i ich szkodliwość dla ludzi i zwierząt

Zatrucia metabolitami grzybów rodzaju *Fusarium*, głównie *F. sporotrichioides*, obserwowane były po raz pierwszy ok. 1890 r. przez Woronina na Syberii i występowały szereg razy w latach następnych także w Europie, Ameryce Północnej i Japonii. Nazwano je "chorobą pijanego zboża" (niem. Taumelgetreide), ponieważ jednym z objawów było zakłócenie równowagi. Szczególnie intensywne nasilenie zachorowań miało miejsce w czasie II Wojny Światowej w okolicach Orenburga. Ziarno zbóż, głównie jęczmienia i prosa, którego spożycie wywoływało u zwierząt, a także u ludzi powyższą chorobę, było porażone grzybami: *Fusarium sporotrichioides*, *F. poae*, i *Stachybotrys*. Do dnia dzisiejszego nie wyjaśniono, jakie związki chemiczne były przyczyną tych zatruc o bardzo złożonych objawach, na które składały się: wymioty, zapalenie skóry, brak apetytu, krwawe wybroczyny w skórze i mięśniach, krwotoki, uszkodzenie szpiku kostnego, anemia. Chorobę tę nazwano żywieniową białaczką toksyczną (ang. alimentary toxic aleukia).

Podobne objawy u trzody i drobiu zauważono po I Wojnie Światowej, głównie w Stanach Zjednoczonych i w Japonii (tzw. choroba czerwonej pleśni kukurydzy i ryżu), Szwecji, Finlandii, Korei. W USA natężenie zatruc fuzaryjnych trzody obserwowano w latach 1928, 1957, 1958, 1963, 1964 i 1965 (Tuite 1979).

Toksyczność ziarna zbóż porażonego przez *Fusarium* wykazano już w latach dwudziestych. Spowodowało to na przykład wprowadzenie w Niemczech embargo na jęczmień importowany z USA, gdyż wywoływał zatrucia karmionych nim zwierząt (Tuite 1979; Mirocha i Christensen 1976). Wykazanie, że powyższe objawy wywołane były przez związki z grupy trichotecen, stało się możliwe po ustaleniu budowy T-2 toksyny w 1963 r. przez Bamburga w Uniwersytecie Wisconsin w USA, womitoksyny w 1973 r. przez Vesondera w Laboratorium Fermentacyjnym w Peorii, Illinois. Nieco wcześniej ukazała się praca zespołu japońskiego, który dla tej mikotoksyny przyjął nazwę deoksyniwalenol (DON) i ta nazwa w związku z tym uznana została za obowiązującą. Po uzyskaniu czystych toksyn okazało się, że wywołują one podobne objawy jakie obserwowano po spożyciu przez zwierzęta pasz, zawierających zboże porażone *Fusarium*.

Trichoteceny makrocykliczne satratoksyna G, H i inne zostały zidentyfikowane w 1973 r. przez Eppleya w laboratorium chemicznym Ministerstwa Zdrowia USA w Waszyngtonie (Rodricks i in 1977).

Informacje o zanieczyszczeniu płodów rolnych trichotecenami na razie początku lat 80-tych XX wieku są bardzo skąpe. Spowodowane to było trudnościami ich oznaczania. Tylko kilka laboratoriów na świecie dysponowało wtedy odpowiednią aparaturą, konieczną do ich oznaczania, mianowicie chromatografem gazowym połączonym ze spektrometrem

masowym. Aparatura ta pozwalała na oznaczenie i identyfikację trichotecen w badanej próbce zbóż.

W Tabeli 19 zebrano dane dotyczące występowania i zawartości trichotecen w ziarnie zbóż w paszach, związanych na ogół z wystąpieniem chorób zwierząt.

Najwięcej uwagi poświęca się obecnie deoksyniwalenolowi, ponieważ może być on wytwarzany w polu, i to równocześnie z zearalenonem. Występuje on najczęściej, podobnie jak zearalenon, w kukurydzy w klimacie umiarkowanym lub subtropikalnym. Wykazano też możliwość gromadzenia się DON w ziarnie pszenicy i innych zbóż drobnoziarnistych oraz kukurydzy w uprawach na wszystkich kontynentach. Szczególnie silnie epidemiczny rozwój fuzarioz miał miejsce w Kanadzie i w USA – w rejonach Wielkich Jezior, w Chinach i Japonii. W latach 1979-1980 w Kanadzie w prowincji Ontario w ziarnie ozimej pszenicy białej stwierdzono obecność womitoksyny w stężeniu 10-4300 µg/kg w 100% badanych prób, w jarej pszenicy czerwonej w prowincji Quebec 60-7000 µg/kg, w 100% prób (Scott i in. 1981). Obecność DON stwierdzono też w kolbach kukurydzy w szeregu krajów Europy (Logrieco i in. 2002; Logrieco i Visconti 2004).

Znaczące nasilenie fuzariozy kłosów pszenicy i jęczmienia obserwowano w USA i Kanadzie w latach 90-tych XX wieku. Choroba spowodowała duże straty dla rolników w USA i Kanadzie (Jones i Gallenberg 1997, Jones i Mirocha 1999). W Polsce epidemiczne nasilenie fuzariozy kłosów pszenicy występowało w roku 1974 i w 1999, na Żułwach na ogół choroba obserwowana jest corocznie (Chełkowski 1998, 1999, 2001, Chełkowski i in. 2002, Tomczak i in. 2002).

Pozostałe dwie toksyny: T-2 toksyna i diacetoksyscirpenol (DAS) występują rzadziej i są typowe dla krajów o chłodnym klimacie. Oba te związki są jednak najsilniejszymi toksynami wśród trichotecen (Tabela 20). Wyższą toksycznością cechują się wyizolowane i zidentyfikowane w Japonii niwalenol i fuzarenon, również tworzone przez grzyby z gatunku *Fusarium graminearum*. Niwalenol zawdzięcza swą nazwę błędnej taksonomii wytwarzającego go grzyba – został on określony jako *F. nivale* zamiast jako *F. poae* i dopiero po kilku latach okazało się, że oznaczenie zostało wykonane błędnie, lecz przyjęta wtedy nazwa tego związku jest nadal używana.

TABELA 19.

Naturalne występowanie w latach 1970-1982 mikotoksyn z grupy trichotecen (Rodricks 1977; Scott 1978; Scott i in. 1981)

Mikotoksyna	Kraj	Surowiec	Zawartość w µg/kg	Liczba prób skażonych w stosunku do badanych
T-2 toksyna	USA	kukurydza (M)	2000	1/1
Trichoteceny	USA	kukurydza ^{b)}	1000	93/173
ogółem	Jugosławia	kukurydza ^{b)}	500-5000	16/191
T-2 toksyna	Kanada	jęczmień (M)	25000	1/1
DON –	USA	kukurydza (M)	3000	3/3
womitoksyna	USA	pasza (M)	40-1800	6/6
	Kanada-Quebec	pszenica ozima	60-7000	27/27
	Kanada-Ontario'	pszenica jara	10-4300	44/45
	Japonia	jęczmień	15-1540	25/50
	Austria	pasze (głównie kukurydza)	30-15000	46/124
Niwalenol	Japonia	jęczmień	60-11400	46/50
Diacetoksycirpenol	USA	pasza (M)	380 i 500	2/2

a) M oznaczono próby związane z objawami mikotoksykozy przy skarmianiu paszy.

b) wartości oznaczone testem biologicznym jako czynnik podrażniający skórę (ang. skin irritant).

Mikotoksykozę o nazwie stachybotrystoksykoza obserwowano u koni, trzody, cieląt i drobiu w latach trzydziestych w środkowej Europie i na Ukrainie. Zatrucia satratoksynami G i H notowano corocznie na Węgrzech. W 1982 r. przyczyną padnięcia ponad stu owiec oraz cieląt był rozwój grzyba *Stachybotrys atra* w słomie ściółki, którą zwierzęta stopniowo zjadały (Szathmary i in. 1976). Spożycie porażonej paszy wywołuje zmiany nekrotyczne skóry, zaburzenia nerwowe z objawami szoku, krwotoki. Zbliżone objawy powodowała też pasza, w której stwierdzono rozwój grzybów: *Myrothecium roridum* i *M. verrucaria* wytwarzających trichoteceny makrocykliczne – werukarynę i rorydynę (Ueno 1983). Niwalenol i fuzarenon uznane zostały w Japonii za toksyny powodujące chorobę "czerwonej pleśni ryżu".

TABELA 20.

Wpływ obecności T-2 toksyny w paszy na zwierzęta domowe (Rodricks i in. 1977)

Zawartość T-2 toksyny w paszy w mg/kg	Wpływ na zwierzęta
2	zawartość śmiertelna dla bydła
3	obniżenie nieśności, atrofia jajowodów u gęsi i niosek
1-16	schorzenie układu nerwowego kurcząt po 3 tygodniach karmienia, tworzenie się brodawkowatych narośli w dziobie
20	redukcja nieśności kur

Występowanie zarówno wymienionych grzybów, jak i ich toksyn nie jest jeszcze dobrze poznane. Wzbudziły one zainteresowanie początkowo z uwagi na silne właściwości antybiotyczne i antyleukemiczne. Pierwsze związki z tej grupy zostały wyizolowane w 1946 r. w wyniku poszukiwania antybiotyków, bardzo modnego w tym okresie, i nazwane werukarynami (od nazwy grzyba *Myrothecium verrucaria*). Natomiast niektóre rorydyny (od *M. roridum*) wykazywały działanie hamujące rozwój nowotworów, szczególnie powodujących białaczkę – leukemię i stąd są badane pod tym kątem przez instytuty zajmujące się chorobami nowotworowymi.

Wachlarz objawów, wywoływanych przez spożycie toksyn fuzaryjnych, jest bardzo szeroki, co bardzo utrudnia jednoznaczne ustalenie, czy choroba stanowiła zatrucie fuzaryjne, głównie wskutek braku metod analitycznych oznaczania trichotecen w pracach sprzed lat 80-tych XX wieku. Obecnie opracowywane są prostsze metody ich oznaczania, oparte o test ELISA, co pozwoli na szerszą ocenę zawartości tych mikotoksyn w zbożach i paszach.

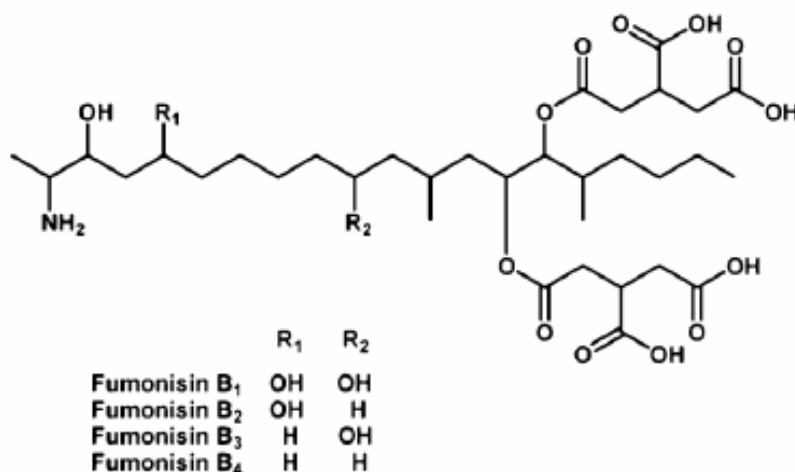
2.5. Fumonizyny

Budowa i właściwości

Fumonizyny stanowią grupę mikotoksyn o pokrewnej strukturze, występujących przede wszystkim w ziarnie kukurydzy i produktach jego przetwarzania, przeznaczonych na cele spożywcze i paszowe. Poznano ponad piętnaście analogów fumonizyn, jednak znaczenie ma przede wszystkim fumonizyna B₁, nieco mniejsze fumonizyna B₂ i fumonizyna B₃. Strukturę chemiczną fumonizyn wyjaśnił zespół W.F.O. Marasas'a z Afryki Południowej dopiero w roku 1988. Mikotoksyny te odznaczają się silną polarnością i było to jedną z trudności przy ich izolacji i oczyszczaniu z kultur toksynotwórczego grzyba.

Grzyby tworzące fumonizyny to przede wszystkim gatunki *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, starsza rozpowszechniona nazwa *F. moniliforme* Sheldon oraz *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg. Na takich podłożach stałych jak ziarniaki kukurydzy lub pszenicy grzyby te tworzą ilości fumonizyny B₁ przekraczające 2 g w 1 kg substratu. Większość izolatów wykazuje średnią (0,5-1 g FB₁/kg) lub wysoką toksynotwórczość (>1g FB₁/kg). Kultury grzybów *F. verticillioides* i *F. proliferatum* tworzą w największych ilościach fumonizynę B₁, w mniejszych fumonizynę B₂ i B₃.

Grzyby tworzące fumonizyny są endofitami kukurydzy i mogą występować w ziarniakach oraz rdzeniach kolb bez objawów typowych dla fuzariozy. Izolaty gatunku *F. proliferatum* tworzą oprócz fumonizyn inne silnie toksyczne metabolity: bowerycyne, moniliforminę i fuzaproliferynę (Logrieco 2001, Logrieco i in. 2002, Task Force Report 2003, Logrieco i Visconti 2004).



Wzory strukturalne fumonizyn B

Występowanie fumonizyn

Fumonizyna B₁ jest przede wszystkim zanieczyszczeniem ziarna kukurydzy we wszystkich regionach jej uprawy na wszystkich kontynentach i jest najczęściej występującą mikotoksyną w kolbach kukurydzy. W Polsce gatunek *F. proliferatum* występuje sporadycznie. Frekwencja gatunku *F. verticillioides* zależy od warunków sezonu wegetacyjnego i w niektórych sezonach występuje on z dużą frekwencją. W sezonach chłodniejszych jest większa frekwencja gatunku *F. subglutinans*, który tworzy znaczące ilości moniliforminy, bowerycyny i fuzaproliferyny natomiast nie tworzy

fumonizyn. Porażenie kolb kukurydzy przez *F. verticillioides*, *F. proliferatum* i *F. subglutinans* oraz nasilenie suchej zgnilizny ziarniaków zwiększa się znacząco pod wpływem żerowania szkodników, uszkadzających okrywę owocowo nasienną ziarniaków podobnie, jak to ma miejsce w przypadku grzyba *A. flavus* tworzącego aflatoksyny. Do najistotniejszych szkodników żerujących na kukurydzy należy omacnica prosowianka *Ostrinia nubilalis*. Zapobieganie rozprzestrzenianiu się tych szkodników, szczególnie redukcja rozmnożenia się drugiego pokolenia owadów poprzez opryski pestycydami przyczynia się do zmniejszenia akumulacji fumonizyn w ziarniakach kukurydzy.

W kolbach inokulowanych grzybem *F. verticillioides* w warunkach klimatycznych Polski akumulują się znaczące ilości fumonizyny B₁. Ziarniaki z objawami fuzariozy (FDK – *Fusarium* damaged kernels) zawierały od 5,1 mg/kg do 196 mg/kg fumonizyny B₁ i od 1,4 mg/kg do 62 mg/kg fumonizyny B₂. Średnia zawartość fumonizyny B₁+B₂ zależała od procentu FDK i wynosiła od 0,009+0,002 do 93,2+15,8 mg/kg. Odmiany mieszańcowe kukurydzy uprawiane w ostatniej dekadzie XX wieku znacząco różniły się podatnością na rozwój obydwu patogenów i w konsekwencji ilości akumulowanych fumonizyn B₁ i B₂ w ziarniakach. W ziarniakach odmian mniej podatnych zawartość akumulowanej fumonizyny B₁ była dziesięciokrotnie niższa niż w ziarniakach odmian bardziej podatnych (Pascale i in. 1999, 2002).

Odmiany transgeniczne kukurydzy zawierające gen Bt warunkujący odporność na żerowanie owadów zapewniają znacznie niższą akumulację fumonizyn w ziarniakach. Jednak w Europie brak do tej pory akceptacji dla roślin transgenicznych, więc nie mogą one być na razie uprawiane.

W próbach kukurydzy pochodzących z farm produkcyjnych ze stanów Iowa, New York i Pennsylvania w USA w latach 1988-1991 zawartość fumonizyny B₁ wynosiła od 0,1 do 50 mg/kg, a procent prób zawierających mikotoksynę wynosił od 10% do prawie 50%. W Europie znaczące zanieczyszczenie ziarna kukurydzy fumonizynami występuje w krajach położonych w południowej części kontynentu: Chorwacji, Francji, Hiszpanii, Portugalii i we Włoszech. Zawartość fumonizyny B₁ w próbach kukurydzy we Włoszech wynosiła od 8 do 300 mg/kg. W tej samej partii prób stwierdzano też wysokie zawartości bowerycyny do 520 mg/kg i fuzaproliferyny do 500 mg/kg.

Znacząco niższe zanieczyszczenie ziarna kukurydzy fumonizyną B₁ występowało w Austrii, Włoszech, Francji i Niemczech, Słowacji i Polsce. W tych ostatnich krajach częściej kolby kukurydzy były porażone przez gatunek *F. subglutinans*, cechujący się zdolnością do produkcji moniliforminy, bowerycyny i fuzaproliferyny (Logrieco i in. 1993). W ziarniakach porażonych przez *F. verticillioides* zebranych w Polsce z poletek

placówek hodowlanych zawartość fumonizyny B₁ wynosiła 0,9-273 mg/kg a fumonizyny B₂ 0,2-102,6 mg/kg.

Struktura i wielkość ziarniaków kukurydzy oraz długi okres dojrzewania ziarniaków powodują, że znacznie więcej mikotoksyn akumuluje się w ziarniakach tego zboża aniżeli w ziarniakach pszenicy i innych zbóż drobnoziarnistych. Poza mikotoksynami produkowanymi przez gatunki *F. graminearum* i *F. culmorum* ziarno kukurydzy może zawierać aflatoksyny, fumonizyny, bowerycyne i fuzaproliferyne (Chełkowski 1998).

Szkodliwość fumonizyn dla ludzi i zwierząt

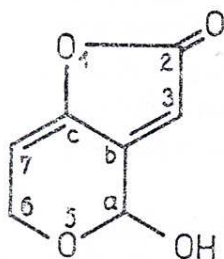
Znacznie wcześniej niż strukturę fumonizyn poznano toksyczność kultur *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg dla człowieka i zwierząt. Grzyb ten powodował „różową fuzariozę” kolb kukurydzy, nazywaną też suchą zgnilizną ziarniaków (ang. dry kernel rot). Konie karmione porażonymi przez ten grzyb kolbami chorowały na rozmiękczenie mózgu (LEM – leucoencephalomalacia), prowadzące do śmierci, co jednoznacznie udokumentowano w USA począwszy od roku 1850. Dodatkowo u koni spożywających porażoną kukurydzę występowało uszkodzenie wątroby. U trzody karmionej paszą z dodatkiem kultury grzyba *F. verticillioides* objawem był obrzęk płuc (pulmonary edema). Z występowaniem różowej fuzariozy kolb kukurydzy powodowanej przez *F. verticillioides* łączono występowanie raka krtani (esophageal cancer) w Południowej Afryce. Nowotwór ten obserwowano u ludności, odżywiającej się kukurydzą z własnych gospodarstw. Wykazano również w doświadczeniach na szczurach, że fumonizyna B₁ wykazuje cechy prokancerogenne, co nie daje jednoznacznej odpowiedzi co do genności fumonizyn dla organizmu ludzkiego (Bennett i Klich 2003, Task Force Report 2003). Fumonizyny uszkadzają szlak biosyntezy sfingozyny – ogólnie grupy sfingolipidów jako składnika tkanek mózgu i tkanki nerwowej, stąd zalicza się je też do neurotoksyn. Powodują też uszkodzenie funkcji nerek.

2.6. Patulina

Budowa i właściwości

Patulinę wyizolowano po raz pierwszy w 1941 r. z kultury grzyba *Penicillium patulum* jako antybiotyk. Ponieważ w następnych latach związek ten otrzymano w różnych pracowniach, nadano mu kilka innych nazw, takich jak: penicydyna, klawiformina, klawatyna, ekspansyna, kwas

gigantowy (Betina 1989, Task Force Report 2003). Pod względem chemicznym patulina jest dwupierścieniowym laktonem o nazwie 4-hydroksy-H-furo-3,2-c-piran-2/6H/-on.



patulina

Patulina jest związkiem bardzo reaktywnym i łatwo wchodzi w połączenia z białkami i kwasami nukleinowymi. Jest to przyczyną z jednej strony jej szkodliwości dla organizmów żywych, z drugiej strony szybkiego jej unieczynniania w żywności i paszach.

Grzyby toksynotwórcze

Patulina wytwarzana jest przez wiele gatunków grzybów *Penicillium* i *Aspergillus* jednak największe znaczenie ma *P. expansum*. Grzyby tworzące patulinę występują na wszystkich surowcach i produktach spożywczych: owocach, warzywach, ziarnie zbóż, mięsie, serach, pieczywie. Grzyby te są saprofitami rozwijającymi się przy wilgotności względnej 80-90%. *Penicillium expansum* jest gatunkiem szczególnie często spotykanym w psujących się owocach: jabłkach, gruszkach i warzywach, np. pomidorach. Bardzo wysoki procent szczepów tego grzyba wykazuje zdolność do tworzenia dużych ilości patuliny, a także cytryniny.

Gatunek *Penicillium cyclopium*, dla którego ostatnio stosuje się też nazwę *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, jest najczęściej występującym grzybem rodzaju *Penicillium* w żywności i paszach; na 1481 badanych szczepów aż 505 (34%) należało do tego gatunku. W teście biologicznym z zastosowaniem larw krewetek, 998 szczepów (67%) okazało się toksynotwórcze. Patulinę tworzyły 82 szczepy. Poza tym w hodowlach badanych szczepów wykryto 19 innych mikotoksyn (Leistner 1984).

Dane te wskazują na wysokie prawdopodobieństwo powstawania mikotoksyn w wyniku rozwoju tych grzybów w żywności. Grzyby te również obficie występują w glebie i rozwijać się mogą na pozostawionych po zniwach na powierzchni pól szczątkach roślinnych. Jest to niepożądane ze względu na możliwość tworzenia się mikotoksyn o właściwościach fitotoksycznych, co może przyczynić się do obniżenia plonów w następnym sezonie.

Występowanie

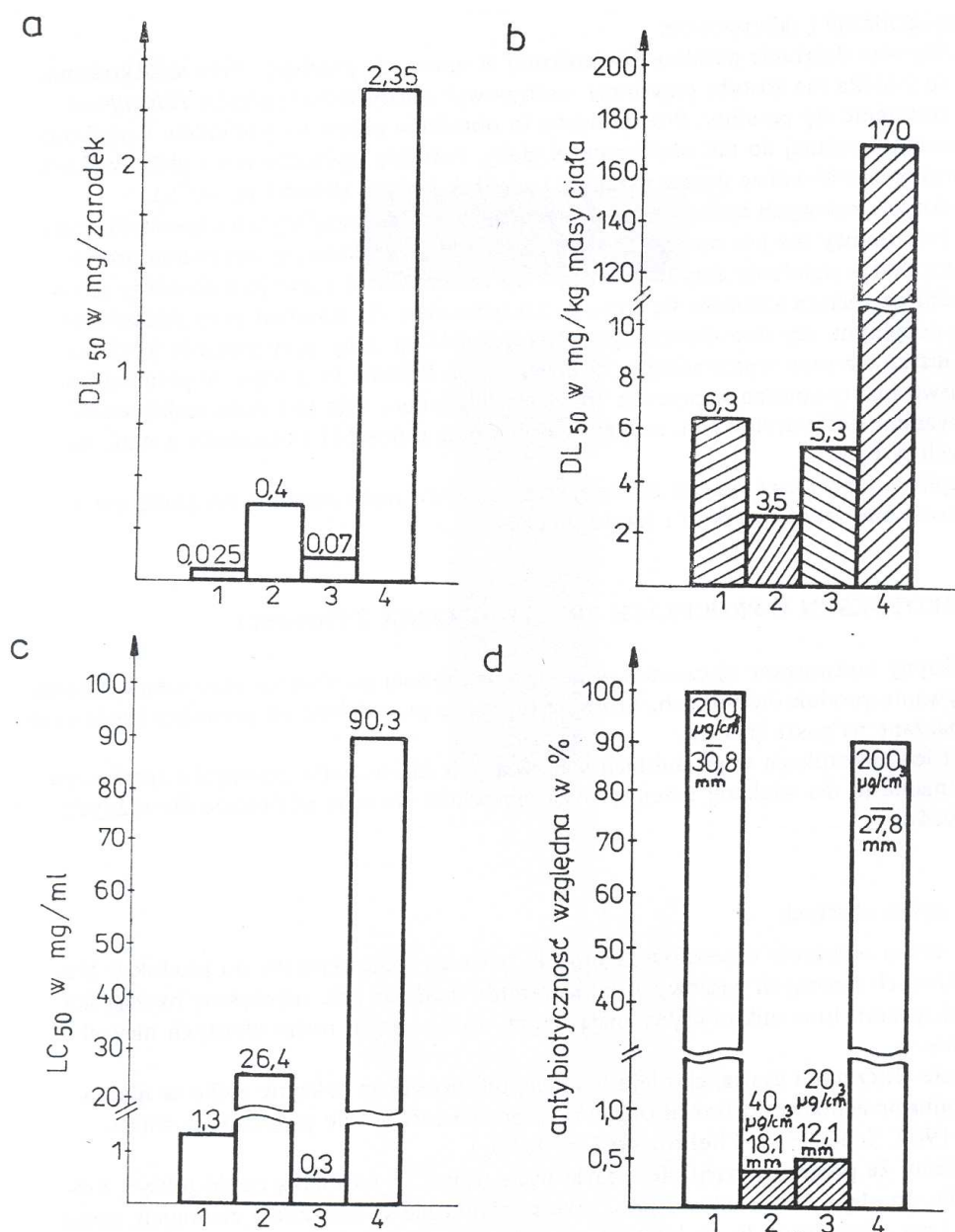
Patulina zanieczyszcza zasadniczo przede wszystkim jabłka, gruszki, winogrona, sok z jabłek i wina owocowe z jabłek. Powstaje w wyniku infekcji owoców przez grzyb *Penicillium expansum*, wywołujący zgniliznę mokrą. *Penicillium expansum* nie jest patogenem i wnikać może do wnętrza owocu przez uszkodzenia mechaniczne skórki lub dokonuje infekcji wtórnej po wnikięciu innych grzybów. Grzyb rozwija się w komórkach owocu dość szybko i w bardzo charakterystyczny sposób. Grzyb rozrasta się promieniście powodując uszkodzenie komórek, prowadzące do obfitego wyciekania soku z owoców. W ciągu kilku dni od infekcji punktowej w temperaturze pokojowej zgniliznie ulega połowa jabłka (Stott i Bullerman 1975). W opanowanych przez grzyb częściach owocu gromadzi się patulina. Obecność patuliny stwierdzono średnio w 50% zgniłych jabłek w ilości od 0,02 do 18 mg na jabłko o średniej masie 130 g (Harwig i in. 1973). Przy przerobie przemysłowym jabłek, część surowca ulega porażeniu i zawiera patulinę, która przechodzi do soków, m.in. koncentratów owocowych i innych przetworów. Stwierdzono częstsze występowanie patuliny w wyrobach domowych niż w przemysłowych.

Sok z jabłek i koncentrat soku z jabłek, produkowane w Polsce, zawierały patulinę. Przebadano 77 prób koncentratu soku jabłkowego produkowanego w 10 zakładach. Średnia zawartość patuliny w próbach ze wszystkich zakładów wynosiła 5,4-41,8 µg/l, poziom maksymalny 112,1 µg/l, a minimalny 3,5 µg/l. Tylko dwie próby zawierały ponad 50 µg/l. Pierwszym krajem, w którym ustalono dopuszczalną granicę zawartości patuliny w sokach na 50 µg w litrze była Szwecja (Kubacki i Goszcz 1979). Obecnie powyższe zalecenie górnej zawartości patuliny w sokach owocowych obowiązuje również w krajach Unii Europejskiej (patrz Tabela 4).

Zawartość patuliny w przetworach owocowych, szczególnie z jabłek, jest dobrym wskaźnikiem jakości surowca użytego do produkcji tych przetworów (Task Force Report 2003).

Sposób działania na organizmy zwierzęce, rośliny i drobnoustroje

W początkowym okresie badań nad patuliną znane były jej silne właściwości antybiotyczne. Została zastosowana do leczenia zaziębień w marynarce amerykańskiej w formie aerozolu. Wkrótce jednak okazało się, że ma silne działanie toksyczne, a także teratogeniczne i rakotwórcze. Patulina jest dobrym przykładem jak szerokie i różnorodne jest działanie metabolitów grzybowych (rys. 7).



Rysunek 7.

Porównanie toksyczności i działania antybiotycznego czterech mikotoksyn: 1-aflatoksyny B₁, 2-ochratoksyny A, 3-T-2 toksyny, 4-patuliny, a-toksyczność dla zarodków jaj kurzych, b-toksyczność dla kurcząt przy podaniu per os, c-toksyczność dla larw krewetek (*Artemia salina*), d-zahamowanie wzrostu bakterii *Bacillus thuringiensis*, w procentach hamowania wzrostu przez aflatoksynę B₁ zaznaczono stężenie hamujące wzrost na pożywce agarowej i wielkość strefy zahamowania wzrostu.

Wykazano następujące działanie patuliny na drobnoustroje, rośliny i zwierzęta (Stott i Bullerman 1975):

- 1) antybiotyczne względem takich bakterii, jak: *Escherichia coli* czy *Streptococcus aureus* oraz grzybów rodzaju *Rhizopus* i główni pyłkowiej;

- 2) fitotoksyczne – patulina hamuje wzrost siewek ogórków, grochu, pomidorów i pszenicy;
- 3) zootoksyczne w stosunku do różnych zwierząt;
- 4) teratogeniczne i rakotwórcze.

Fitotoksyczne działanie patuliny stwierdzono w uprawach pszenicy. Przy ściółkowaniu gleby, o ile ściółka nie została przyorana, następował obfity rozwój grzyba *Penicillium urticae* i tworzenie się patuliny. Powodowało to obniżenie procentu wschodów i wielkości roślin pszenicy wysianej do tak ściółkowanej gleby. Patulinę wyizolowano z gleby wykazującej fitotoksyczność wobec upraw pszenicy i szkółek jabłoni.

Jak z dotychczasowych badań wynika, przedostawanie się patuliny do organizmu przez przewód pokarmowy nie jest niebezpieczne poza bardzo wysokimi jej stężeniami prowadzącymi na skutek działania antybiotycznego, do zahamowania rozwoju mikroflory jelitowej. Zasadnicza różnica zaznacza się między toksycznością dla zwierząt przy podaniu doustnym a dożylnym, czy dootrzewnowym. Toksyczność patuliny przy podaniu jej doustnym jest znacząco niższa, niż przy wprowadzeniu do krwioobiegu. Powodem tego jest reaktywność patuliny i jej inaktywacja w procesie trawienia, kiedy to reaguje z aminokwasami sulfhydryłowymi, zawierającymi wolną grupę SH i tworzy z nimi nietoksyczne pochodne. Niewątpliwie największe ryzyko zanieczyszczenia żywotności patuliną związane jest z jej właściwościami rakotwórczymi i teratogenicznymi.

3.0. Los mikotoksyn w procesach przetwarzania żywności

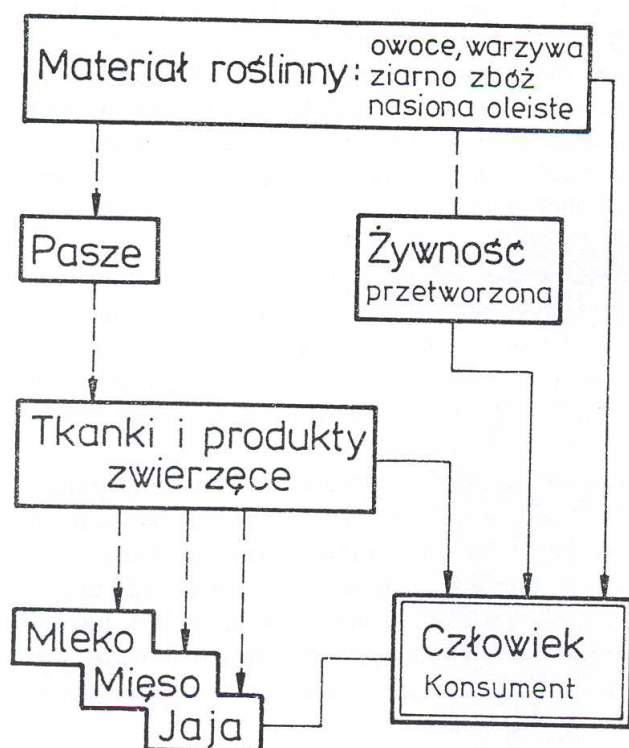
Mikotoksyny wytwarzane są zarówno w polu przed żniwami jak również po zbiorze przy niewłaściwym przechowywaniu płodów rolnych, które następnie są przetwarzane na produkty spożywcze lub przeznaczone na pasze (rys. 8). Jaki jest los mikotoksyn w produktach stanowiących surowce dla przemysłu spożywczego? Zagadnienie to dla większej przejrzystości omówione zostanie oddzielnie dla różnych grup surowców.

3.1. Nasiona roślin oleistych

Nasiona roślin oleistych: orzeszków ziemnych, bawełny, soi, używane do produkcji tłuszczów roślinnych i cennych paszowych koncentratów białkowych, najczęściej bywają skażone aflatoksynami. Inne mikotoksyny mają w przypadku nasion roślin oleistych niewielkie znaczenie.

W procesie tłoczenia i ekstrakcji oleju benzyną lub heksanem toksyny tylko w nieznacznym stopniu przechodzą do frakcji olejowej, a prawie

całkowicie pozostają w śrucie (Goldblatt 1969; Scott 1978; Chełkowski 1985). Stwierdzono, że proces rafinacji oleju całkowicie usuwa tę niewielką część toksyn, która przechodzi do oleju. Przykładowo przy przetwarzaniu partii orzeszków ziemnych, zawierających 5,5 mg aflatoksyny B₁ w 1 kg, zawartość toksyny w śrucie wynosiła 11,0 mg/kg, a w oleju 0,12 mg/kg przy ekstrakcji heksanem i spadała do ilości niewykrywalnych po procesie rafinacji oleju (Goldblatt 1969).



Rysunek 8.

Schemat ilustrujący sposoby przedostawania się mikotoksyn do żywności.

Jak wynika z powyższych danych śruta zawiera około dwukrotnie wyższe stężenie toksyn niż surowiec wyjściowy. Stąd w chwili obecnej zawartość aflatoksyn w śrutach jest w wielu krajach obowiązkowo kontrolowana. Jako górną dopuszczalną granicę zawartości aflatoksyny B₁ w śrutach arachidowych przyjęto 1 mg/kg. Śruty silniej zanieczyszczone są "rozcieńczane" słabo skażonymi śrutami lub traktowane gazowym amoniakiem w celu rozkładu aflatoksyny B₁. Opracowano też nowe technologie produkcji oleju i śrut zapewniające skuteczne usuwanie aflatoksyn. W procesach tych śruty są dodatkowo ekstrahowane bardziej

polarnymi rozpuszczalnikami, takimi jak: aceton, etanol lub metanol, które rozpuszczają aflatoksyny.

3.2. Ziarno zbóż

W ziarnie zbóż, szczególnie kukurydzy, obecne mogą być aflatoksyny, zearalenon, DON, fumonizyny i ochratoksyna A. Dlatego też zbadano, co dzieje się z tymi mikotoksynami w procesach przetwarzania ziarna.

Aflatoksyny, zearalenon i DON stwierdza się głównie w ziarnie kukurydzy. DON i inne trichoteceny jest często występującymi metabolitami w ziarnie zbóż drobnoziarnistych. Tworzeniu się tych toksyn sprzyjają warunki klimatyczne, w których uprawia się kukurydzę na ziarno (Shotwell 1977; Lillehoj i in. 1976 i 1980).

Przy produkcji krochmalu z kukurydzy 80-90% toksyn przechodziło do frakcji glutenowo-włóknikowej, przeznaczonej na paszę. Krochmal mikotoksyn nie zawierał.

Przy produkcji kaszki i mąki kukurydzianej 7-10% ogólnej zawartości aflatoksyny B₁ przechodziło do tych frakcji. Zanieczyszczenie frakcji zarodków i otrąb wynosiło odpowiednio 1520 i 640 µg/kg i było wyższe niż skażenie użytego surowca (510 µg/kg). Stosowane w młynach oczyszczanie ziarna kukurydzy nie pozwalało na usunięcie aflatoksyn, gdyż były one obecne w całej masie ziarna, choć oddzielone na sitach, połamane i zanieczyszczone ziarniaki zawierały na ogół aflatoksyny w wyższych stężeniach. Przy przerobie porażonego ziarna kukurydzy na alkohol, aflatoksyny pozostawały w wywarze przeznaczonym na paszę.

Podobne wyniki uzyskano dla rozmieszczenia zearalenonu w ziarnie kukurydzy. Proces czyszczenia ziarna pozwalał usunąć zaledwie 3-10% zearalenonu. Wszystkie frakcje po przemiale zawierały zearalenon, jednakże kaszki i mąka zawierały zaledwie 20% całej ilości toksyny. Najwyższe zawartości zearalenonu stwierdzono we frakcji otrąb i zarodków. Przykładowo jeżeli w ziarnie kukurydzy stwierdzono 3,5 mg ZEA/kg, to kaszka zawierała 0,6 mg/kg, mąka 0,8 mg/kg, otręby 4,6mg/kg, a frakcja zarodkowa 7 mg/kg.

Los ochratoksyny A w procesie przetwarzania przebadano w ziarnie pszenicy i jęczmienia. Stwierdzono, że w skażonych partiach zbóż ochratoksyna występuje dość równomiernie we wszystkich frakcjach masy ziarna. Nie obserwowano większych jej ilości w zanieczyszczeniach, połamanych ziarnach itp. usuwanych w czasie odsiewania. Nie można więc liczyć na jej usunięcie w procesie oczyszczania ziarna na sortownikach ani też czyszczenia na mokro. Także ziarna zapleśniałe – pokryte grzybnia – nie zawsze wykazywały wyższy poziom ochratoksyny niż ziarna bez wyraźnego rozwoju grzybni.

Okazało się również, że ochratoksyna A znajduje się nie tylko na powierzchni ziarniaka, lecz dyfunduje do jego wnętrza. Analiza poziomu skażenia w mące i otrębach po zmieleniu kilku partii skażonego naturalnie ziarna wykazała podobną zawartość ochratoksyny A w obydwu frakcjach. Wysoki poziom skażenia ochratoksyną A otrąb, a znacznie niższe skażenie pęczaku po przetworzeniu jęczmienia na kaszę, wskazuje na to, że ochratoksyna w głównej mierze gromadzona jest w warstwach komórek subaleuronowych, znajdujących się pod okrywą owocowo-nasienną. Ekstrakcja powierzchniowa wskazuje na możliwość akumulacji do 90% ochratoksyny wewnątrz ziarniaka, a tylko niewielkiego procentu na powierzchni ziarniaka (plewki, okrywa), szczególnie przy wyższych skażeniach (Chelkowski 1985, 1989, 1991, 1998).

Przemiał czy przetworzenie na kaszę nie usuwa więc ochratoksyn z ziarna, przedostają się one w podobnym stopniu do frakcji zarówno otrąb, jak i mąki. Kasze zawierają mniej, bo tylko 10-30% całej zawartości toksyny w ziarnie. Nie można więc usunąć ochratoksyny A żadnym z zabiegów stosowanych w technologii przetwórstwa ziarna, takich jak: odsiewanie, usuwanie ziaren zapleśniałych czy obłuszczenie. Zabiegom detoksykacji podane być musi całe ziarno. W otrębach, szczególnie z kaszarni, poziom ochratoksyn może być szczególnie wysoki. Przykładowo po przetworzeniu na kaszę partii jęczmienia, zawierającego ochratoksynę A w ilości 0,7 mg/kg, w kaszy stwierdzono – 0,160 mg/kg, a w otrębach – 1,5 mg/kg.

W procesie produkcji piwa ochratoksyna A, obecna w ziarnie w niewielkich stężeniach, jest całkowicie rozkładana. Ponieważ partie silnie porażone ochratoksyną A nie spełniają wymogów stawianych jęczmieniom browarowym, można uważać, że praktycznie nie występuje zanieczyszczenie piwa tymi toksynami.

Z uwagi na częste zanieczyszczenie kanadyjskiej pszenicy deoksyniwalenolem, zbadano możliwość dostawania się toksyny do chleba. Ziarno zawierające 7,1 mg DON/kg poddano przemiałowi. W mące stwierdzono 4,1 mg DON/kg, w chlebie po wypieku 4,2 mg/kg, a w zanieczyszczeniach otrzymanych po procesie czyszczenia 16,7 mg/kg oraz w otrębach 16,5 mg/kg (Scott i in. 1983). Zawartość mikotoksyn w mące po przemiale ziarna w młynach jest zależna od szczegółów technologii przeprowadzenia przemiału. Omówienie przeglądowe prac nad losem mikotoksyn fuzaryjnych w procesach przetwarzania żywności omówili Patey i Gilbert (1989) oraz Sinha i Bhatnagar (1998) i Task Force Report (2003).

Z przeprowadzonych dotychczas prac można wyciągnąć wniosek, że mikotoksyny dyfundują dość głęboko w głąb ziarniaków, obecne są głównie w warstwie aleuronowej i w subaleuronowej warstwie bielma i w procesach przetwarzania przechodzą do wszystkich produktów przemiału, jednak w

największych stężeniach występują szczególnie w przeznaczonych na paszę frakcjach otręb i zarodków.

3.3. Owoce i warzywa

Dotychczas wykonano jedynie badania nad powstawaniem patuliny w jabłkach i nad jej losami w procesach ich przetwarzania (Harwig i in. 1973; Stott i Bullerman 1975). Patulina obecna jest wyłącznie w obrębie komórek objętych zgnilizną, a tylko niewielkie jej stężenia przechodzą do komórek sąsiadujących z tą strefą. Najwyższe stężenie patuliny wykrywa się w gnijących częściach zdrowych owoców. W jabłkach, całkowicie objętych zgnilizną, stężenie patuliny jest niższe niż w gnijącej części jabłek częściowo porażonych. Patulina przechodzi do przetworów z jabłek zarówno przy ich wielkoprzemysłowej produkcji, jak i do przetworów domowych. Jest jednak nietrwała w procesach fermentacji i ulega rozkładowi w czasie produkcji win owocowych. Jej zawartość w soku z jabłek spada o 50% w temp. 22°C po 5 tygodniach, a w 80°C – po 10 minutach (Scott i in. 1968).

Znana jest zdolność do tworzenia toksyn przez zasiedlające owoce i warzywa grzyby należące do takich gatunków jak: *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Stemphylium botryosum*, *Fusarium avenaceum* i *F. sambucinum* oraz *Aspergillus alliaceus*. Brak jednak danych, czy w procesie psucia może dojść do wytworzenia się mikotoksyn, a następnie do ich przedostania się do żywności (Scott i Somers 1969; Rodricks 1976, Rodricks i in. 1977). Najwięcej informacji dostępnych jest o toksynach tworzonych przez gatunki *Alternaria* – jedne z najczęściej zasiedlające płody rolnicze i ogrodnicze (Chełkowski i Visconti 1992, Sinha i Bhatnagar 1998). Do tej pory nie wykazano znaczącego zanieczyszczenia żywności i pasz metabolitami tych grzybów.

4.0. Eliminacja i unieczynnianie mikotoksyn

Niemożliwość uniknięcia zanieczyszczeń płodów rolnych mikotoksynami przyczyniła się do opracowania metod eliminacji i unieczynniania mikotoksyn (Sinha i Bhatnagar 1998, Task Force Report 2003).

W celu zmniejszenia skażenia produktów, otrzymywanych z orzeszków ziemnych, stosuje się sortowanie ich przed przerobem. Orzeszki porażone przez grzyb *Aspergillus flavus* mają zmienioną barwę, a po zdjęciu osłonki nie rozpadają się na dwie części. Można więc odsortować ręcznie lub maszynowo orzeszki porażone i w ten sposób zmniejszyć zawartość aflatoksyn w przerabianej partii. Nie da się jednak tym sposobem usunąć aflatoksyn całkowicie.

4.1. Unieczynnianie

Ponieważ w czasie przerobu nasion roślin oleistych na olej toksyny przechodzą przede wszystkim do śruty poekstrakcyjnej, opracowano metody przemysłowe rozkładu aflatoksyn przez traktowanie śrut gazowym amoniakiem pod ciśnieniem. W wielu krajach afrykańskich pracują już stacje unieczynniania aflatoksyn w śrutach (Goldblatt 1969; Chełkowski 1985, Sinha i Bhatnagar 1998). Amoniakowanie powoduje jednak częściowy rozkład niezbędnych aminokwasów, głównie lizyny, oraz pociemnienie śrut. Stąd bardziej celowe jest usuwanie aflatoksyn przez ich ekstrakcję ze śrut rozpuszczalnikami polarnymi, np. etanolem czy metanolem, zaraz po wytlóczeniu oleju i ekstrakcji benzyną. Rozpuszczalnik może być w znacznym procencie odzyskiwany po procesie. W procesie prażenia, jakiemu poddawane są orzeszki konsumpcyjne w temperaturze 200-300°C, aflatoksyny w znacznym stopniu ulegają rozkładowi. Metoda unieczynniania aflatoksyn w zanieczyszczonej kukurydzy paszowej polega na traktowaniu ziarna kukurydzy amoniakiem gazowym lub wodą amoniakalną dodawaną do osiągnięcia końcowego stężenia amoniaku wynoszącego ok. 2%. Proces ten przebiega w temperaturze pokojowej dość długo, kilka tygodni, zarazem jednak konserwuje kukurydżę (Keyl, Norred 1976). W tych samych warunkach rozkładowi ulegają też inne mikotoksyny: ochratoksyna A, cytrynina, kwas penicylinowy. Wartość paszowa tak traktowanego ziarna zmniejsza się nieznacznie, tak że pozostaje ono wartościowym składnikiem paszowym pod warunkiem odpędzenia amoniaku przed spasaniami.

Ciekawe jest stwierdzenie, że tradycyjny sposób wyrobu placków kukurydzianych, tzw. tortillas, wypiekanych z dodatkiem wody wapiennej przez mieszkańców Ameryki, prowadzi do rozkładu aflatoksyn. Istotnym czynnikiem jest środowisko alkaliczne i podwyższona temperatura.

Oczywiście procesowi unieczynniania toksyn warto poddawać tylko znacznie zanieczyszczone nimi surowce. O ile jest to możliwe, partie skażone można "rozcieńczyć" składnikami czystymi, wolnymi od toksyn tak, aby uzyskać ich poziom nieszkodliwy dla zwierząt karmionych skażoną paszą (Shreeve i in. 1975).

W ostatniej dekadzie pojawiło się szereg prac nad nieczynnieniem mikotoksyn przez inne grzyby i bakterie. Jak na razie nie zostały te drobnoustroje wykorzystane w praktyce.

4.2. Wykorzystywanie skażonej paszy

Jak już wspomniano w rozdziale 2, organizmy zwierzęce mogą metabolizować bez szkody dla zdrowia pewne ilości mikotoksyn i dopiero przekroczenie tych poziomów wywołuje objawy chorobowe. W warunkach braku pasz najbardziej ekonomicznym sposobem zagospodarowania pasz

zanieczyszczonych będzie karmienie nimi zwierząt tolerujących pewien poziom określonej toksyny (por. Tabele 9 i 13). Należy jednak pamiętać, że karmienie zwierząt zanieczyszczoną paszą będzie się zawsze wiązać z pewnym ryzykiem. Jeżeli oprócz mikotoksyn występują inne czynniki szkodliwe dla zwierząt (braki pokarmowe, czynniki chorobotwórcze), to może mimo wszystko dojść do strat: zmniejszenia przyrostów, zwiększonych zachorowań i upadków. Badania nad tolerancją na mikotoksyny przebiegają w warunkach można powiedzieć pewnego "luksusu", w optymalnych warunkach termiczno-wilgotnościowych, przy dobrej jakości paszy i dobrej zdrowotności stada zwierząt. Przy braku tych warunków ujemny wpływ skażonej paszy może być znacznie silniejszy od spodziewanego i zawsze należy o tym pamiętać.

Wskazówki praktyczne przy skarmianiu paszy podejrzanej o zawartość mikotoksyn streszczono poniżej. Jeśli ze względów ekonomicznych okaże się konieczne karmienie zwierząt gospodarskich paszą lub składnikami paszowymi (ziarno zbóż, śruta zbożowa itp.) wykazującymi zapleśnienie, należy przestrzegać kilku zasad:

- 1) wymieszać taką paszę w stosunku 1:10 ze składnikami czystymi;
- 2) nie karmić taką paszą zwierząt młodych, ciężarnych, karmiących ani krów mlecznych;
- 3) jeżeli ma się do czynienia z hodowlą wielkostadową, należy podać pasze najpierw niewielkiej grupie i dopiero jeżeli nie wystąpią objawy wskazujące na toksyczność paszy, zużytkować ją na większą skalę.

5.0. Zapobieganie tworzeniu się mikotoksyn

Ponieważ procesy unieczynniania mikotoksyn i ich eliminacji są kosztowne oraz czaso- i pracochłonne, najbardziej celowe jest zwrócenie uwagi na zapobieganie ich powstawaniu.

Zapobieganie tworzeniu się mikotoksyn obejmuje dwa etapy.

Pierwszy etap to działania agrotechniczne, do których można zaliczyć:

- a) dobór odpowiednich odmian mniej podatnych na porażenie przez toksynotwórcze grzyby,
- b) właściwą ochronę fitosanitarną upraw dla zmniejszenia możliwości porażeń przez grzyby,
- c) zapobieganie inwazji owadów uszkadzających nasiona i przenoszących materiał infekcyjny grzybów,
- d) właściwy zbiór.

Krótko mówiąc przestrzeganie prawidłowej agrotechniki i ochrony roślin zmniejsza możliwość infekcji toksynotwórczymi grzybami. Do całości

zabiegów agrotechnicznych zaliczyć należy właściwy zbiór. Jeżeli ziarno zbóż jest zebrane we właściwym czasie, przy możliwie niskiej wilgotności, właściwie uregulowanymi maszynami, tak aby nie zostało nadmiernie zabrudzone ziemią, liśćmi chwastów oraz aby nie zostało uszkodzone mechanicznie, to mniejsze są szanse zanieczyszczenia go zarodnikami toksynotwórczych grzybów. W fazie zbioru mają zasadnicze znaczenie dwa czynniki: uszkodzenia mechaniczne oraz zabrudzenia. Uszkodzenie mechaniczne ziarna zbóż, owoców, warzyw otwiera łatwy dostęp do tkanek toksynotwórczym grzybom. Zabrudzenie takie, jak: ziemia, kurz, mogą zawierać znaczną liczbę zarodników grzybów toksynotwórczych (Chełkowski 1989 i 1991).

W ostatnich latach przyjęto w Unii Europejskiej nazwę „dobra praktyka rolnicza”, w skrócie GAP – Good Agricultural Practice. Ponieważ jednym ze źródeł zanieczyszczenia ziarna zbóż mikotoksynami jest inokulum grzybów – zwraca się uwagę na takie prowadzenie zabiegów agrotechnicznych, by nie powodować wzrostu inokulum grzybów w płodach rolnych oraz na polach produkcyjnych.

Wprowadzane energooszczędne zabiegi uprawy gleby powodują wzrost inokulum patogenicznych dla zbóż gatunków grzybów *Fusarium*. Uprawa pszenicy w sąsiedztwie kukurydzy czy na polach gdzie uprzednio uprawiano kukurydzę też prowadzi do wzrostu inokulum tych patogenów, które mogą rozwijać się obficie i zarodnikować na resztkach późniejszych kukurydzy.

Położono też nacisk na badanie podatności różnych odmian, szczególnie kukurydzy, pszenicy i jęczmienia, na rozwój toksynotwórczych grzybów i tworzenie się aflatoksyn (Zuber i in. 1976), zearalenonu i deoksyniwalenolu (Shanon i in. 1980, Miller i in. 1985, Snijders i Perkowski 1990, Mesterhazy i in. 1999, 2003).

Drugi etap zapobiegania to właściwe przechowywanie, odpowiednio do wymagań składowania, zbóż, owoców i warzyw. Jednak dla przechowywania istotne znaczenie ma "historia" przechowywanych produktów, np. ziarna zbóż, na jaką składają się:

- cechy genetyczne (gatunek, odmiana – patrz rys. 4),
- uszkodzenie przez owady, zanieczyszczenie inokulum grzybów zarówno już na polu, jak i w czasie zbioru i młócenia,
- zanieczyszczenia ziemią, kurzem, łodygami i liśćmi chwastów (zwiększają lokalnie wilgotność).

Gdy dostarczona do przechowalni partia ziarna jest czysta, bez uszkodzeń i o niskiej wilgotności, będzie się dobrze przechowywać. Jeżeli dostarczony materiał jest silnie zanieczyszczony rozwijającymi się już grzybami, to nie nadaje się do przechowywania i powinien być szybko zużyty. Na etapie przechowywania najbardziej istotna jest wilgotność. Ponieważ ziarno zbóż

jest przechowywane wiele miesięcy, jego wilgotność powinna być zredukowana do poziomu 13,0-13,5%. Przy wyższej wilgotności może następować powolny, lecz systematyczny rozwój grzybów i tworzenie się mikotoksyn (por. rys. 3, Ryniecki i Szymański 2006).

Należy podkreślić, że w naszych warunkach klimatycznych większe ilości mikotoksyny np. ochratoksyny A, kwasu penicylinowego, cytryniny i innych tworzą się stosunkowo wolno. Znaczący rozwój grzybów przechowalniczych zachodzi z szybkością zależną w pierwszym rzędzie od aktywności wodnej ziarna i od temperatury. Obecność tych mikotoksyn w przechowywanym ziarnie świadczy o poważnym zaniedbaniu i pozostawieniu ziarna nadmiernie wilgotnego na zbyt długi okres. Z zawartości toksyny można wyliczyć orientacyjnie, jak długo ziarno było nieprawidłowo przechowywane.

Szczegółowe omówienie wpływu przechowywania ziarna na jego jakość znajdzie czytelnik w opracowaniu A. Ryniecki i P. Szymański „Dobrze przechowane zboże. Poradnik”. Wydanie III. Mr INFO Poznań 2006.

Zagadnienia powstawania mikotoksyn są częścią patologii poźniwej, tj. należą do działu fitopatologii zajmującego się chorobami roślin po zbiorze i należy je rozpatrywać jako jeden z elementów strat, zachodzących w trakcie przechowywania płodów rolnych.

6.0. Metody oznaczania zawartości mikotoksyn i oceny ich toksyczności

6.1. Oznaczanie zawartości mikotoksyn

Mikotoksyny są obecne w produktach spożywczych czy paszach w ilościach bardzo niewielkich, stąd metody ich oznaczania odznaczają się dużą czułością. Przykładowo w mleku krowim wykryć można 0,1 µg aflatoksyny M₁ w 1 litrze, co stanowi 10⁻¹⁰ część masy mleka. Podobnie niskie zawartości innych mikotoksyn można oznaczyć w produktach mięsnych, zbożowych, śrutach roślin oleistych. Analizę mikotoksyn wykonuje się z wykorzystaniem właściwości fizykochemicznych w trzech zasadniczych etapach:

- 1) ekstrakcji
- 2) oczyszczania ekstraktów
- 3) oznaczenia jakościowego i ilościowego

Do ekstrakcji mikotoksyn stosuje się najczęściej chloroform lub acetonitryl. Zastosowanie tych rozpuszczalników umożliwia dobrą ekstrakcję szeregu mikotoksyn równocześnie, z wydajnością 90-100%. Kiedy próba zawiera zanieczyszczenia przeszkadzające w analizie, konieczne jest usunięcie tych zanieczyszczeń. W celu oczyszczenia ekstraktów z kultur grzybowych wystarczająca jest ekstrakcja rozdzielnicza

ciecz-ciecz. Oprócz tego opracowane są metody oczyszczania ekstraktów za pomocą dostępnych w handlu kolumniek do chromatografii odpowiednio dla poszczególnych mikotoksyn, o ile są one obecne w nieznacznym ilościach, poniżej 1 mg/kg. Końcowym etapem ekstrakcji i oczyszczania jest odparowanie rozpuszczalnika dla zagęszczenia próby, co przeprowadza się pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze 40°C. Celem oznaczenia zawartości mikotoksyn po ich ekstrakcji z próby i oczyszczeniu ekstraktu opracowano wiele metod, które zostaną pokrótce omówione.

Chromatografią cienkowarstwową można w zasadzie oznaczyć wszystkie mikotoksyny przy doborze odpowiedniego rozpuszczalnika. Metoda ta jest szczególnie przydatna do oznaczania toksyn fluoryzujących – jest wtedy metodą bardzo czułą. Następujące najmniejsze (w ng) ilości mikotoksyn mogą być wykrywane na chromatogramach cienkowarstwowych:

aflatoksyny B ₁ , G ₁ i M ₁	0,1
ochratoksyna A	5
cytrynina	20
kwas penicylinowy	100
sterygmatozystyna	20
patulina	10
T-2 toksyna	100
DON	40
zearalenon	50

Można więc wykryć tą techniką bardzo niewielkie zawartości toksyn, rzędu 10^{-9} - 10^{-10} . Dodatkową zaletą chromatografii cienkowarstwowej jest możliwość oceniania barwy plam i jej odcieni w porównaniu z wzorcami co przy wprawie jest pomocne dla wnioskowania o identyczności mikotoksyn.

W przypadku takich mikotoksyn, jak trichoteceny, chromatografia cienkowarstwowa jest zbyt mało czuła i za mało specyficzna, może służyć jedynie do ich oznaczania wstępnego w mało zanieczyszczonych ekstraktach z kultur. Chromatografia cienkowarstwowa ma jednak duże zalety, a mianowicie jest to metoda tania, nie wymagająca kosztownego sprzętu i może być wykonana w każdym laboratorium. Dobrze nadaje się też do analiz seryjnych.

Z uwagi na częste występowanie w kulturach grzybów, surowcach zbożowych czy paszach związków o takich samych właściwościach fluorescencji i występujących na chromatogramach w tych samych punktach co mikotoksyny, konieczne jest stosowanie testów potwierdzających dla poszczególnych mikotoksyn. W przeciwnym przypadku można uzyskiwać fałszywe wyniki pozytywne co do ich obecności. Przy stosowaniu testu potwierdzającego, tworzy się pochodną mikotoksyny, najczęściej przez reakcję estryfikacji i sprawdza się, czy R_f występującego na chromatogramie związku zmienia się po reakcji tak samo jak R_f standardu mikotoksyny. Dla

szeregu mikotoksyn reakcje tworzenia pochodnych przeprowadza się bezpośrednio na chromatogramie, przy czym wystarczające są nanogramowe ilości toksyn.

Chromatografia gazowa i wysokosprawna chromatografia cieczowa są przydatne do oznaczania wszystkich grup mikotoksyn: trichotecen, patuliny, zearalenonu, kwasu penicylinowego, fumonizyn i szeregu innych metabolitów grzybów. W przypadku tych mikotoksyn uzyskuje się tą metodą lepszy rozdział toksyn, lepszą wykrywalność i specyficzność niż chromatografią cienkowarstwową. Dysponować jednak należy dobrej klasy chromatografem gazowym lub cieczowym. Połączenie chromatografu gazowego lub cieczowego ze spektrometrem masowym pozwala na najbardziej wiarygodną identyfikację mikotoksyn w badanej próbie.

Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa jest najnowszą metodą analizy mikotoksyn. Wymaga bardzo kosztownej aparatury umożliwiającej pełną automatyzację analizy. Zaletą tej metody jest duża czułość oraz wysoka rozdzielczość, a więc możliwość dobrego oddzielenia dużej liczby związków. Ma to duże znaczenie w przypadku np. trichotecen, których w jednej kulturze grzyba może być kilka, a nawet kilkanaście. Metoda wymaga bardzo dokładnego oczyszczenia próby, gdyż kolumny chromatograficzne łatwo się zanieczyszczają i tracą zdolności rozdzielcze.

Metoda spektrofluorometryczna znalazła zastosowanie do oznaczania ochratoksyny A w krwi i tkankach zwierząt. Polega ona na wykreśleniu widma fluorescencyjnego i wzbudzeniowego ochratoksyny A w badanej próbie. Testem potwierdzającym w tej metodzie jest zmiana w widmie fluorescencyjnym, jaka zachodzi po przeprowadzeniu ochratoksyny A w ochratoksynę α na skutek rozszczepienia wiązania peptydowego przez karboksypeptydazę.

Przydatność danej metody do ilościowych oznaczeń mikotoksyn ocenia się przez wyznaczenie odzysku standardu po analizie. Przyjmuje się, że standard dodany do próby powinien być odzyskiwany co najmniej w 80-90%.

Od kilku lat dostępne są prostsze i szybsze metody oznaczania mikotoksyn, oparte o test ELISA. Jest kilka wytwórni surowic monoklonalnych. Dostarczają one zestawy pozwalające na wstępne oszacowanie obecności mikotoksyn w ziarnie zbóż lub paszach.

6.2. Ocena toksyczności metabolitów grzybów

Ocenę tę przeprowadza się na zarodkach jaj kurzych, na zwierzętach laboratoryjnych: kaczkach, kurczętach, myszach, szczurach, świnkach morskich i innych. We wstępnym badaniu karmi się zwierzęta, najczęściej kurczęta ad libitum, paszą zawierającą hodowlę grzyba i ocenia zdrowotność zwierząt. Pełna zdrowotność zwierząt świadczy o braku toksyczności. O ile

nastąpi spadek przyrostów masy lub zachorowanie aż do upadku włącznie, przeprowadza się badania dokładniejsze. Po uzyskaniu czystej toksyny wyznacza się jej dawkę śmiertelną (DL_{50}), a specjaliści lekarze weterynarii i histopatolodzy badają zmiany wywoływane przez spożycie toksyny w różnych narządach: wątrobie, nerkach, przewodzie pokarmowym. powstawanie nowotworów itd. Na podstawie długoterminowych badań toksykologicznych ustala się dopuszczalne zawartości poszczególnych toksyn w żywności i paszach, takie jakie mogą być spożywane bez obawy o zdrowie człowieka i zwierząt. Badania biologiczne są bardzo kosztowne i wymagają odpowiedniego zaplecza, zwierzętarni i wykwalifikowanego personelu o różnych specjalnościach.

Opracowano też prostsze i tańsze laboratoryjne testy biologiczne. Przy ocenie toksyczności metabolitów grzybowych najczęściej stosuje się zarówno w celach badawczych, jak i kontrolnych larwy krewetek *Artemia salina*. Larwy te okazały się bardzo czułe na obecność mikotoksyn i zamierają w krótkim czasie przy niewielkich ich stężeniach (rzędu $0,1-100 \mu\text{g}$ w 1 cm^3). Analizę toksyczności przeprowadza się w objętości $0,1 \text{ cm}^3$ roztworu wodnego o zawartości 5% soli mineralnych. Metoda ta jest tania i mało kłopotliwa w porównaniu z innymi, a wynik uzyskuje się po 24 godzinach. Obecnie dostępne są dane o toksyczności kilkudziesięciu mikotoksyn, z których najważniejsze wymieniono w Tabeli 21.

Tabela 21.

Stężenie śmiertelne (LC_{50}) niektórych metabolitów grzybów dla larw krewetek *Artemia salina*.

Związek	LC_{50}	Związek	LC_{50}
	39	Kwas fuzariowy	186,5
Aflatoksyna B_1 *	13	Kwas kojowy	107,6
	1,3	Kwas penicylinowy	247,0
Aflatoksyna M_1	0,416	Niwalenol	20,85
Alternariol	630	Ochratoksyna A *	26,4
Kwas aspergilowy	57,8		10,1
Cytrynina	33,9	Patulina *	90,3
Citreowirydyna	11,2		75,0
	0,558	Rubratoksyna B *	29,3
Diacetoksycirpenol *	0,47		42,0
	0,466	Sterygmatocystyna *	5,95
	2,95		0,54
Gliotoksyna *	3,2	T-2 toksyna	0,311
		Zearalenon	77,0

* wartości LC_{50} uzyskane w różnych pracowniach, nieraz znacznie się różniące

Larwy *Artemia salina* stosowane są też do oceny toksyczności metabolitów grzybów, których budowy jeszcze nie ustalono i dla zdobycia informacji, czy dany mikroorganizm wytwarza toksyczne metabolity, jeżeli nie ma jeszcze metod chemicznych ich oznaczania. Jest to istotne wtedy, kiedy grzyb jest stosowany do biosyntezy białka enzymów czy preparatów o cechach biostymulatorów. Niezbędne jest wtedy sprawdzenie czy szczep, którym się dysponuje, nie wytwarza też metabolitów toksycznych (Leistner 1984). Metoda z zastosowaniem larw *Artemia salina* pozwala na wstępną ocenę pod tym względem kultur danego grzyba i cechuje się wysoką czułością.

Załączniki

Załącznik A.

UZUPEŁNIAJĄCE OMÓWIENIE MIKOTOKSYN

W 1974 r. grupa ekspertów, zajmujących się mikotoksynami, ustaliła listę mikotoksyn, które można było uznać za mające duże znaczenie toksykologiczne (Stoloff 1979). Wymieniono osiemnaście grup mikotoksyn, a mianowicie:

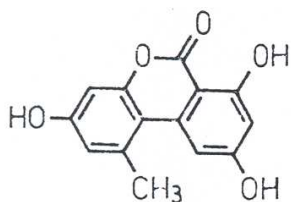
- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| 1) alkaloidy ergotaminowe, | 10) nidulina, |
| 2) alternariotoksyny, | 11) ochratoksyny ^x , |
| 3) aflatoksyny ^x , | 12) patulina ^x , |
| 4) butenolid, | 13) kwas penicylinowy, |
| 5) cytrynina ^x , | 14) rubratoksyny, |
| 6) gliotoksyna, | 15) sporydesminy, |
| 7) islanditoksyna, | 16) sterygmatocystyna, |
| 8) luteoskiryna, | 17) trichoteceny ^x , |
| 9) rugulozyna, | 18) zearalenon ^x . |

Wymienione związki spełniają dwa warunki: 1) przynajmniej jeden z tworzących daną toksynę grzybów był często spotykany w żywności i paszach; 2) toksyna jest niebezpieczna dla człowieka i zwierząt w małych dawkach lub też jest rakotwórcza. Poniżej podane zostaną informacje o mikotoksynach nie omówionych szerzej poprzednio, a które znalazły się na tej liście oraz kilku innych związkach wytwarzanych przez często występujące grzyby.

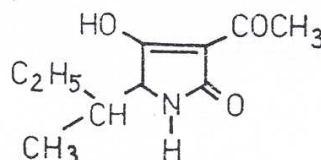
Związki oznaczone „x” zostały omówione w poprzednich rozdziałach skryptu. Alkaloidy ergotaminowe omawiane są w licznych podręcznikach farmakologii i toksykologii. Przy opracowywaniu niniejszego rozdziału wykorzystano następujące źródła: Ciegler i in. 1971; Moreau 1979; Purchase 1974, Davis i in. 1978.

Alternariotoksyny.

Grzyby rodzaju *Alternaria* występują na wielu płodach rolnych: ziarnie zbóż, warzywach i owocach i często rozwijają się na nich po zbiorach powodując ich psucie się. Do głównych toksycznych metabolitów tych grzybów zalicza się alternariol i kwas tenuazonowy (Visconti 1991).



alternariol

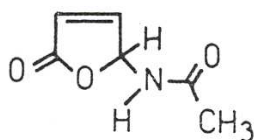


kwas tenuazonowy

Metabolity te są toksyczne zarówno dla roślin, jak i dla zwierząt. Ostatnio zwrócono uwagę na możliwość ich powstawania przy psuciu się pomidorów, przeznaczonych do przemysłowego przerobu na przeciery i koncentraty.

Butenolid.

Związek ten jest wytwarzany przez grzyby z gatunków *Fusarium sporotrichioides*, *F. graminearum* i *F. culmorum*.

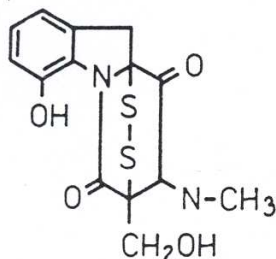


butenolid

DL₅₀ dla myszy wynosi 43,6+/-1,24 mg/kg. Jest związkiem produkowanym przez wymienioną grupę grzybów, równie obficie jak trichoteceny grupy A, a więc T-2 toksyna i inne.

Gliotoksyna.

Związek ten (pochodna dwuketopiperazyny) jest wytwarzany przez grzyby z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* oraz należące do gatunku *Trichoderma virens*.

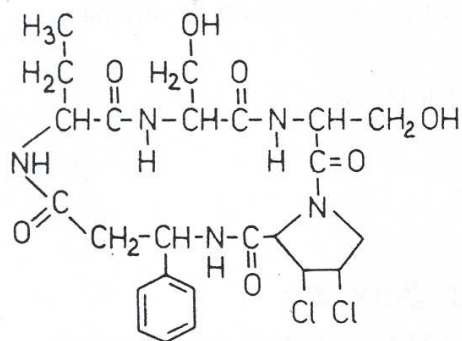


gliotoksyna

Ma on właściwości antybiotyczne np. w stosunku do patogena wielu roślin *Rhizoctonia solani*. DL₅₀ dla myszy wynosi 45-65 mg/kg.

Islanditoksyna.

Związek ten ma charakter polipeptydu i wytwarzany jest przez grzyb *Penicillium islandicum*.

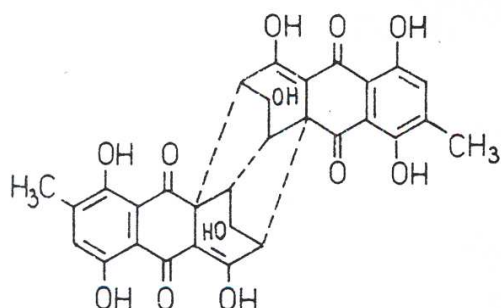


islanditoksyna

DL₅₀ dla myszy wynosi 6,55 mg/kg przy podaniu doustnym, 0,475 mg/kg przy podaniu podskórnym. Jest to hepatotoksyna, powodująca szybki zgon zwierząt przy zatruciu ostrym. Zatrucia przewlekłe prowadzą do wywołania nowotworów. Toksyna jest jednym ze związków stwierdzanych w tzw. żółtym ryżu, który wywołał liczne zatrucia ludności w Japonii i Chinach.

Luteoskiryna.

Pod względem chemicznym stanowi dwuantrochinon i jest obok islanditoksyny i rugulozyny, wytwarzana przez grzyb *Penicillium islandicum*.

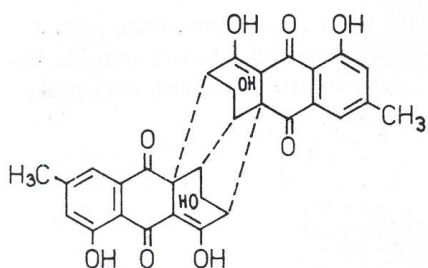


luteoskiryna

Jest jedną z toksyn powodujących atrofię wątroby. Zatrucia chroniczne prowadzą do wywołania nowotworów wątroby. Związek ten jest mniej toksyczny od islanditoksyny. DL_{50} dla myszy wynosi doustnie 221 mg/kg, przy podaniu podskórnym – 147 mg/kg, a dożylnym – 6,65 mg/kg.

Rugulozyna.

Rugulozyna jest barwnikiem wytwarzanym przez *Penicillium rugulosum*, *P. tardum*, *P. islandicum* i inne grzyby.

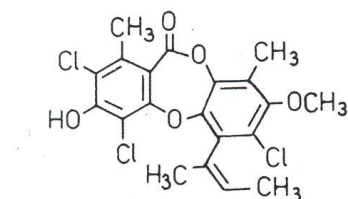


rugulozyna

Przy dawce 0,3 mg na zwierzę wywołuje u myszy raka wątroby oraz powoduje też, podobnie jak luteoskiryna, uszkodzenie wątroby.

Nidulina.

Jest metabolitem grzyba *Aspergillus nidulans* (Eidam) Wint, wytwarzającego też szereg antybiotyków i innych związków toksycznych.

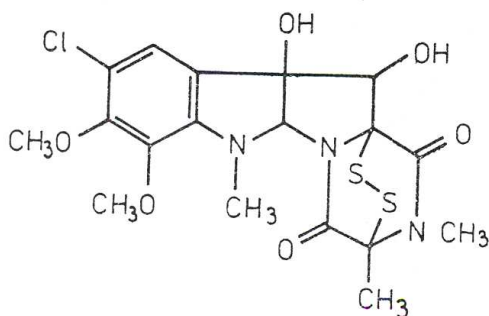


nidulina

Zainteresowano się tym grzybem i jego metabolitami w następstwie spowodowanego przez niego zatrucia niosek w USA.

Sporydesminy.

Znanych jest osiem związków z tej grupy oznaczonych literami A, B, C, D, E, F, G i H, pochodnych dwuketopiperazyny, wytwarzanych przez grzyb *Pithomyces chartarum* (syn. *Sporidesmium bakeri*), rozwijający się na pastwiskach pod koniec lata i jesienią, szczególnie przy obfitych deszczach.

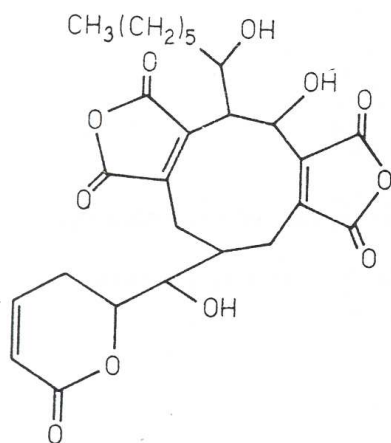


sporydesmina A

Zwierzętami najbardziej wrażliwymi na mikotoksyny są owce, dla których DL_{50} per os wynosi 1,5-2,0 mg/kg. Wrażliwe na te toksyny są również konie. Zatrucie objawia się zapaleniem i opuchnięciem błon śluzowych pyska i uszkodzeniem wątroby. Niedobór białka w diecie znacznie zwiększa wrażliwość zwierząt na te toksyny. Egzema pyska owiec była obserwowana na pastwiskach w Nowej Zelandii od 1894 r. i stanowi tam do dziś problem wymagający stałej uwagi i kontroli. Brak jest informacji o występowaniu na większą skalę tej choroby w innych częściach świata.

Rubratoksyny.

Rubratoksyny A i B są wytwarzane przez grzyby *Penicillium rubrum* i *P. purpurogenum*, bardzo rozpowszechnione na przechowywanych płodach rolnych. Rubratoksyna B, o dwóch grupach bezwodnikowych, uważana jest za związek decydujący o toksyczności grzyba.

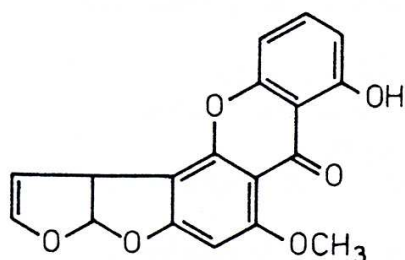


rubratoksyna B

Wartości DL_{50} rubratoksyny B różnią się znacznie w zależności od sposobu podania jej do organizmu; dla szczurów przy podaniu dożylnym DL_{50} wynosi ok. 0,3 mg/kg, a doustnym ok. 400 mg/kg. Świnie po spożyciu paszy, na której rozwijał się grzyb *P. rubrum*, wykazywały obfity ślinotok, okresy depresji i podniecenia oraz brak koordynacji ruchów. Przy badaniach histopatologicznych stwierdzono zmiany w żołądku, wątrobie, nerkach i ośrodkowym układzie nerwowym. *Penicillium rubrum* wywołuje alergie u osób ze skłonnościami astmatycznymi i chorującymi na tzw. katar sienny.

Sterygmatocystyna.

Jest związkiem, który w swej budowie, podobnie jak aflatoksyny, zawiera dwa pierścienie furanowe, jednak połączone nie z kumaryną, lecz z antrachinonem.

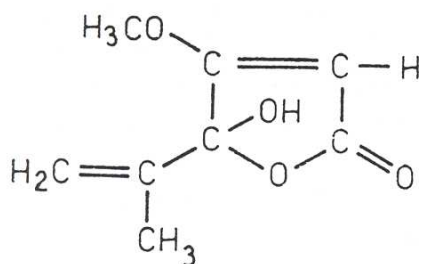


sterygmatocystyna

Wykazuje działanie rakotwórcze i hepatotoksyczne. DL₅₀ dla szczurów wynosi 120-160 mg/kg. Wytwarzana jest przez powszechnie występujące grzyby: *Aspergillus versicolor*, *A. nidulans* i z rodzaju *Bipolaris*. Grzyby wytwarzające sterygmatozystynę, szczególnie *A. versicolor*, występują bardzo często w żywności i paszach, a wysoki ich procent jest toksynotwórczy.

Kwas penicylinowy.

Razem z ochratoksyną A w szeregu próbach pasz występował kwas penicylinowy odkryty w 1913 r. przez Alsberga. Jest to związek o właściwościach rakotwórczych, wytwarzany także przez grzyby z grupy *Aspergillus ochraceus* oraz przez często występujący gatunek *Penicillium cyclopium* i ok. 20 innych gatunków grzybów (Moreau 1979). Kwas penicylinowy cechuje niska toksyczność przy podaniu doustnym, jednak może on być obecny w porażonych paszach w znacznych ilościach. DL₅₀ dla myszy przy podaniu podskórnym wynosi 110 mg/kg. Kwas penicylinowy jest związkiem jednopierścieniowym o charakterze kwasowym, będącym γ -hydroksylaktonem (Rodricks 1976).

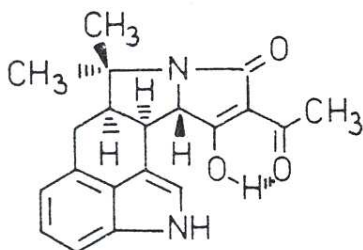


kwas penicylinowy

Wykazuje też właściwości antybiotyczne. Wytwarzanie kwasu penicylinowego np. przez *A. ochraceus* wzrasta w temperaturach niskich 10-15°C, natomiast wydajność ochratoksyny A jest najwyższa w temperaturze ok. 28°C.

Kwas cyklopiazonowy.

Związek ten jest wytwarzany przez bardzo często występujący grzyb *Penicillium cyclopium* (obecnie przyjęta nazwa *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (Westling) Samson i in. Kwas cyklopiazonowy jest związkiem pięciopierścieniowym, pochodną aminokwasu tryptofanu (Purchase 1974).



kwas cyklopiazonowy

Toksyna ta wytwarzana była przez 226 szczepów rodzaju *Penicillium* na 1481 badanych, głównie *P. verrucosum* var. *cyclopium*, a także przez szczepy *P. camembertii*, stosowane do produkcji serów (Leistner 1984). Kwas cyklopiazonowy okazał się silnie toksyczny dla zwierząt: DL_{50} dla szczurów wynosi przy podaniu dożylnym 2,3 mg/kg, a doustnym 32-41 mg/kg dla samców oraz 52-67 mg/kg dla samic. Wywołuje przede wszystkim zaburzenia układu nerwowego, martwicę wątroby i nerek. Brak jest danych o jego występowaniu poza stwierdzeniem go w orzeszkach arachidowych w USA.

ZAŁĄCZNIK B.

WYBRANE PIŚMIENNICTWO Z ZAKRESU MIKOTOKSYN

I. Pozycje książkowe w całości poświęcone mikotoksydom

- BETINA V. 1989. Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Toronto.
- CHEŁKOWSKI J. 1985. Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby, mikotoksyny i mikotoksykozy. SGGW, Warszawa.
- CHEŁKOWSKI J. (Ed.) 1989. *Fusarium* – Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. Elsevier, Amsterdam.
- CHEŁKOWSKI J. (Ed.) 1991. Cereal Grain – Fungi, Mycotoxins and Quality in Drying and Storage. Elsevier, Amsterdam.
- CHEŁKOWSKI J., VISCONTI A. (Eds.) 1992. *Alternaria* – Biology, Plant Diseases and Metabolites. Elsevier, Amsterdam.
- CHEŁKOWSKI J. (Ed.) 1995. Heminthosporia - Metabolites, Biology and Plant Diseases. *Bipolaris, Drechslera, Exserohilum*. IGR PAN, Poznań.
- CIEGLER A., KADIS S., AJL S.I. (Eds.) 1971. Microbiol. toxins. Fungal toxins. Acad. Press, New York, 6, 7 i 8.
- COLE R.J., COX R.H. 1981. Handbook of toxic fungal metabolites. Acad. Press, New York - London.
- DESJARDINS A.E. 2006. *Fusarium*, mycotoxins, chemistry, genetics and biology. APS Press, St. Paul, USA pp. 259.
- EGAN H. 1982. Environmental carcinogens. Selected methods of analysis. Vol. 5. Some mycotoxins. Intern. Agency for Research on Cancer, Lyon.
- GOLDBLATT L.A. 1969. Aflatoxin. Scientific background, control and implications. Acad. Press, New York.
- KWAŚNA H., CHEŁKOWSKI J., ZAJKOWSKI P. 1991. *Fusarium* (Sierpik) w serii: Grzyby (Mycota) tom XXII. Instytut Botaniki PAN, Kraków.
- LACEY J. (Ed.) 1985. Trichothecenes and other mycotoxins. John Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- LESLIE J.F., SUMMERELL B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Iowa, USA, 1-388.
- LOGRIECO A. (Ed.) 2001. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe. European Commission. EUR 1995.
- LOGRIECO A., BAILEY J.A., CORAZZA L., COOK B.M. (Eds.) 2002. Mycotoxins in Plant Diseases. Kluwer Academic Publishers. Europ. J. Plant Pathol. Vol.108, Issue 7.
- LOGRIECO A., VISCONTI A. 2004. An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- MARASAS W.F.O., NELSON P.E., TOUSSON T.A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species: Identity and mycotoxicology. Penn. State Univ. Press. University Park London.
- MILLER J.D., TRENHOLM H.L. (Eds.) 1994. Mycotoxins in Grain, Compounds Other Than Aflatoxin. Eagen Press, St Paul, USA.
- MOREAU C. 1979. Moulds, toxins and food. John Wiley and Sons, New York-Toronto.
- PACKA D. 2005. Fitotoksyczna aktywność patogenów nekrotroficznych z rodzaju *Fusarium*. Rozprawy i monografie nr 106. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-

Mazurskiego.

- PERKOWSKI J. 1999. Badania zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie zbóż. Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Rozprawy Naukowe. Zeszyt 295.
- PURCHASE I.E.H. (Ed.) 1974. Mycotoxins. Elsevier Press, Amsterdam-Oxford-New York.
- RODRICKS J.V. (Ed.) 1976. Mycotoxins and other fungal related food problems. Advances in Chemistry. Ser. nr 149. Am. Chem. Soc. Washington. D.C.
- RODRICKS J.V., HESSELTINE C.W., MEHLMAN M.A. (Ed.) 1977. Mycotoxins in human and animal health, Proc. of a Conference at University of Maryland, October 4-8, 1976, Pathotox Publ. Inc., Peoria, Illinois.
- RYNIECKI A., SZYMAŃSKI P. 2006. Dobrze przechowane zboże. Poradnik. MR INFO, Wydanie trzecie, Poznań.
- SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C., FILTENBORG O. 1995. Introduction to foodborne fungi. Centraalbureau voor Schimmeltcultures, Baarn-Delft, Holandia.
- SINHA K.K., BHATNAGAR D. 1998. Mycotoxins in Agriculture and Food Safety, Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong.
- STEYN P. (Ed.) 1980. The biosynthesis of mycotoxins. A study in secondary metabolism. Acad. Press, New York-London.
- UENO Y. (Ed.) 1983. Trichotecenes. Chemical, biological and toxicological aspects. Elsevier, Amsterdam, Kodansha LTD, Tokyo.
- TASK FORCE REPORT. 2003. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION 1979. Mycotoxins. Environmental Health Criteria No. 1 L Geneve.
- WYLLIE T.D., MOREHOUSE L.G. 1977. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. An Encyclopedia Handbook, Marcel Dekker Inc., New York-Basel, 1, 2 i 3.

Książki dostępne on-line w witrynach internetowych:

- SCHOLTEN O.E., RUCKENBAUER P., VISCONTI A., VAN OSENBRUGGEN W.A., DEN NIJS A.P.M. 2002. Food safety of cereals: A chain – wide approach to reduce *Fusarium* Mycotoxins. European Commission FAIR—CT98-4094.
www.mycotochain.org

II. Monografie, artykuły przeglądowe

- BENNETT, G.A., SHOTWELL, O.L, 1979: Zearalenone in cereal grains. J. Am. Oil Chem. Soc., 56; 812-819.
- BENNETT J.W., KLICH M. 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Review;36; 497-516.
- BOTTALICO A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals, species complex and related mycotoxin profiles in Europe. J. Plant Pathol. 80: 85-103.
- BOTTALICO A., PERRONE G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small grain cereals in Europe. European J. Plant Pathol. 108: 611-624.
- CHEŁKOWSKI J. 1998. Distribution of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal grains. In: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety (KK Sinha & D. Bhatnagar Eds) Marcel Dekker Inc, New York, pp. 45-64.
- FINK-GREMMELS J. 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. Vet.Quart.21; 115-120.

- FLANNIGAN B (1991) Mycotoxins. In: D'Mello JPF, Duffus CM, Duffus JH (Eds.), Toxic Substances in Crop Plants. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 226–257.
- GROMADZKA K., WAŚKIEWICZ A., CHEŁKOWSKI J., GOLŃSKI P. 2008. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal* 1(2): 209–220.
- HESELTINE C.W. 1976. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. W: *Mycotoxins and other fungal related food problems*. J.V. Rodricks (Ed.) *Advances in Chemistry* ser. 149. Am. Chem. Soc. Washington, DC.
- HAWKSWORTH D.L., ROSSMAN A.Y. 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* 87: 888–891.
- KRYŃSKI A., ROKICKI E. 1983. Mikotoksyny i mikotoksykozy. *Prz. hodowlany*, 2; 27–33.
- LOGRIECO A.F., MULE G., MORETTI A., BOTTALICO A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 697–609.
- MARQUARDT R.R., FROHLING A.A. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Science* 70; 3968–3988.
- MESTERHAZY A. 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding* 114: 377–386.
- MIROCHA C.J., CHRISTENSEN C.M. 1974. Fungus metabolites toxic to animals. *Ann. Rev. Phytopath.*, 12; 300–330.
- MIROCHA C.J., CHRISTENSEN C.M. 1976. Mycotoxins and the fungi that produce them. *Proc. Am. Phytopath. Soc.*, 3; 110–125.
- PATEY A.L., GILBERT J. 1989. Fate of *Fusarium* mycotoxins in cereals during food processing and methods for their detoxification. W : *Fusarium - Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Chełkowski J., Editor. Elsevier, Amsterdam.
- SCOTT P. 1978. Mycotoxins in food and ingredients and their origin. *J. Food Prot.* 41; 385–398.
- SCOTT P.M., SOMERS E. 1969. Biologically active compounds from field fungi. *J. Agricult. Food Chem.* 17; 430–436.
- SHOTWELL O.L. 1977. Mycotoxins corn related problems. *Cereal Foods World.* 22; 524–527.
- SHREEVE R.J., PATHERSON D.S.P. 1975. Mycotoxicosis. *Vet. Record*, 97, 15; 279–280.
- STEYN P.S. 1971. Ochratoxin and other dihydroisocoumarins. W: *Microbial toxins*. Acad. Press. New York-London, 7; 179.
- STOLOFF L. 1976. Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. W: *Mycotoxins and other fungal related food problems*, J.V. Rodricks (Ed.) *Advances in Chemistry* ser.149, Am. Chem. Soc., Washington, DC.
- STOLOFF L. 1979. The three eras of fungal toxin research. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56; 784–788.
- STOTT W.T., BULLERMAN L.R. 1975. Patulin: A mycotoxins of potential concern in foods. *J. Milk Food Technol.* 38; 695–705.
- TUITE J. 1979. Field and storage conditions for the production of mycotoxins and geographic distribution of some mycotoxin problems in the United States. *Pardue Agricult. Exp. Station J.* 7259.
- ZINEDINE A, SORIANO JM, MOLTŐ JC, MAÑES J (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxins. *Food Chem Toxicol* 45:1–18

III. Rozprawy naukowe

- BUŚKO M., CHEŁKOWSKI J., POPIEL D., PERKOWSKI J. 2008. Solid substrate bioassay to evaluate impact of *Trichoderma* on trichothecene mycotoxin production by *Fusarium* species. *J Sci Food Agric* 88: 533-541.
- CHEŁKOWSKI J. 2008. Mikotoksyny i grzyby toksynotwórcze, jako istotny wskaźnik jakości żywności i pasz. *Polskie Drobiarstwo*. 10: 22–26.
- CHEŁKOWSKI J. 1999. Fuzarioza kłosów pszenicy na Żuławach w sezonie 1998 r. *Ochrona Roślin*, Nr1, 8-9.
- CHEŁKOWSKI J., TOMCZAK M., KOSTECKI M. 2001. Fuzarioza kłosów pszenicy w latach 1998-2000. *Ochrona Roślin* Nr11/12, 4-5.
- CHEŁKOWSKI J., STĘPIEŃ Ł., TOMCZAK M., WIŚNIEWSKA H. 2002. Identification of toxigenic *Fusarium* species in wheat ears using PCR assay and their mycotoxins in kernels. *Phytopathol. Pol.* 25: 47-57.
- CHEŁKOWSKI J., RITIENI A., WIŚNIEWSKA H., MULE G., LOGRIECO A. 2006. Occurrence of Toxic Hexadepsipeptides in Preharvest Maize Ear Rot Infected by *Fusarium poae* in Poland. *J. Phytopathology* 155: 8-12.
- CHOUDHURY H., CARLSEN C.W., SEMENIUK G. 1971. A study of ochratoxin toxicity in hens. *Poultry Sci*, 6; 1855.
- CIEGLER A. 1972. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. *Can. J. Microbiol.*, 18; 631-636.
- CIEGLER A., FENNEL J., SANSING G.A., DETROY R.W., BENNET G.A. 1973. Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum* classification into subgroups. *Appl. Microbiol.*, 26; 271-278.
- ELLING F., HALD B., JACOBSEN C., KROGH P. 1975. Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Ser. A*, 83; 739.
- FRITSCH S, STEINHART H (1999) Occurrence of hormonally active compounds in food: A review. *Eur Food Technol* 209:153-179.
- FUNNEL H.S. 1979. Mycotoxins in animal feedstuffs in Ontario 1972 to 1977. *Can. J. Compar. Med.* 43; 243-246.
- GAJĘCKA M, JAKIMIUK E, SKORSKA-WYSZYŃSKA E, ZIELONKA L, POLAK M, PALUSZEWSKI A, RYBARCZYK L, GAJĘCKI M (2004) Influence of zearalenone micotoxicosis on selected immunological, haematological and biochemical indexes of blood plasma in bitches. *J Vet Sci* 7:175-180.
- GOLIŃSKI P., CHEŁKOWSKI J., GRABARKIEWICZ-SZCZĘSNA J., SZEBIOTKO K. 1983a. Wstępna ocena występowania nefropatii mikotoksynowej i pozostałości ochratoksyny A w nerkach świń. *Med. wet.* 39; 407-409.
- GOLIŃSKI P., CHEŁKOWSKI J., KONARKOWSKI A., SZEBIOTKO K. 1983b. Mycotoxins in cereal grain. Part VI; The effect of ochratoxin A on growth and tissue residues of the mycotoxin in broiler chickens. *Die Nahrung*, 27; 251-256.
- GOLIŃSKI P., GRABARKIEWICZ-SZCZĘSNA J., KNEBLEWSKI P., CHEŁKOWSKI J., SKOLIMOWSKI H., SZEBIOTKO K. 1984a. Występowanie nefropatii ochratoksynowej świń oraz pozostałości ochratoksyny A w nerkach wieprzowych. *Med. wet.*, 40; 1; 55-59.
- GOLIŃSKI P., HULT K., GRABARKIEWICZ-SZCZĘSNA J., CHEŁKOWSKI J., KNEBLEWSKI P., SZEBIOTKO K. 1984b. Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of Polish swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47; 1210-1212.

- GOLIŃSKI P., KOSTECKI M., LASOCKA I., WIŚNIEWSKA H., CHEŁKOWSKI J., KACZMAREK Z. 1996a. Moniliformin accumulation and other effects of *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. on kernels of winter wheat cultivars. J. Phytopat. 144: 495-499.
- GOLIŃSKI P., PERKOWSKI J., KOSTECKI M., GRABARKIEWICZ-SZCZĘSNA J., CHEŁKOWSKI J. 1996. *Fusarium* species and *Fusarium* toxins in wheat in Poland – comparison with neighbour countries. Sydovia, 48: 12-22.
- GOLIŃSKI P., KACZMAREK Z., KIECANA I., WISNIEWSKA H., KAPTUR P., KOSTECKI M., CHEŁKOWSKI J. 2002. *Fusarium* head blight of common Polish winter wheat cultivars – comparison of effects of *Fusarium avenaceum* and *Fusarium culmorum* on yield components. J. Phytopath. 150:135-141
- GROMADZKA K., CHEŁKOWSKI J., STĘPIEŃ Ł., GOLIŃSKI P. 2008. Occurrence of zearalenone in wheat and maize grain in Poland. Cereal Research Communications 36B: 361–363
- GROMADZKA K., BUŚKO M., WAŚKIEWICZ A., KOSTECKI M., CHEŁKOWSKI J., POPIEL D. 2008. Impact of *Trichoderma* and *Gliocladium* on *Fusarium* mycotoxins production in solid substrate. Cereal Research Communications 36B: 707–710.
- GROMADZKA K., CHEŁKOWSKI J., POPIEL D., KACHLICKI P., KOSTECKI M., GOLIŃSKI P. 2009. Solid substrate bioassay to evaluate the effect of *Trichoderma* and *Gliocladium* on the production of zearalenone by *Fusarium* species. World Mycotoxin Journal 2; 45-52.
- JONES R., GALLENBERG D. 1997. Scab of wheat and barley: a reemerging disease of devastating impact. Plant Dis 81: 1340-1348.
- JONES R.K., MIROCHA C.J. 1999. Quality parameters in small grains from Minnesota affected by *Fusarium* head blight, Plant Dis 83: 506-511.
- HAMILTON P.B. 1971. A natural and extremely severe occurrence of aflatoxicosis in laying hens. Poultry Sci. 50; 1880-1883.
- HAMILTON P.B. 1975. Proof of mycotoxicoses being a field problem and a simple method for their control. Poultry Sci., 54; 1706-1708.
- HAMILTON P.B., TUNG H.T., HARRIS J.R., GAINER J.H., DONALDSON W.E. 1972. The effect of dietary fat on aflatoxicosis in turkeys. Poultry Sci. 51; 165-170.
- HAMILTON P.B., HUFF W.E., HARRIS J.R., WYATT R.D. 1982. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. Poultry Sci., 61; 1832-1841.
- HARRACH B., BATA A. 1983. The presence of verrucarins J, satratoxin G and H in samples of straw responsible for *Stachybotrys* toxicosis in sheep and calves. International Mycotoxin Conference, Cairo, Egypt, 19-24 March 1983.
- HARWIG J., CHEN Y.K., KENNEDY B.P.C., SCOTT P. 1973. Occurrence of patulin and patulin producing strains of *Penicillium expansum* and natural rots of apple in Canada. J. Can. Inst. Food. Sci. Technol., 6; 22-25.
- HARWIG J., CHEN Y.K. 1974. Same conditions favoring production of ochratoxin A and citrinin by *Penicillium viridicatum* in wheat and barley. Can. J. Plant Sci., 54; 17-22.
- HESELSTINE C.W., SHOTWELL O.L., KWOLEK W.F., LILLEHOJ E.B., JACKSON W.K., BOTHAST R.J. 1976. Aflatoxin occurrence in 1973 corn at harvest. II. Mycological studies. Mycologia 68; 341-353.
- HESELSTINE C.W., ROGERS R.F., SHOTWELL O.L. 1978. Fungi, especially *Gibberella zeae*, and zearalenone occurrence in wheat. Mycologia 70; 14-18.
- HÖKBY E., HULT K., GATENBECK S., RUTQUIST L. 1979. Ochratoxin A and citrinin in 1976 crop of barley stored on farms in Sweden. Acta Agricult. Scandinavicae 29; 174-178.

- HUFF W.E., WYATT R.D., HAMILTON P.B. 1975. Nephrotoxicity of dietary ochratoxin A in broiler chickens. *Appl. Microbiol.* 30; 48-51.
- HUGHES B.L., BARNETT RD., JONES J.E., DICK J.W., NORRED W.P. 1979. Safety of feeding aflatoxin inactivated corn to white leghorn layer-breeders. *Poultry Sci.* 56; 1202-1209.
- HULT K., TEILING A., GATENBECK S. 1976. Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.* 42; 443-444.
- HULT K., HOKBY E. 1979. Ochratoxin A in pig blood, method of analysis and use as a tool for feed studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 38; 772-776.
- HULT K., HOKBY E., GATENBECK S., RUTQUIST L. 1980. Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden: Use in evaluation of toxin content of consumed feed. *Appl. Environ. Microbiol.* 39; 828-330.
- JARVIS B.B., MIDIWO J.O., TUTHILL D., BEAN G.A. 1981. Interaction between the antibiotic trichothecenes and the higher plant *Baccharis megapotamica*. *Science* 214; 460-462.
- JUSZKIEWICZ T., PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA J. 1976. Zawartość aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂, ochratoksyn A i B, sterygmatocystyny i zearalenonu w śrutach zbożowych. *Med. wet.* 32; 617-619.
- JUSZKIEWICZ T., PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA J. 1977. Zawartość mikotoksyn w przemysłowych mieszankach i koncentratkach paszowych. *Med. wet.* 33; 193-196.
- JUSZKIEWICZ T., PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA J., CYBULSKI W. 1977. Aflatoxins in milk and tissues, experiments on rabbits and goats. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.* 189; 41-45.
- JUSZKIEWICZ T., PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA J., WIŚNIEWSKA M. 1982. Ochratoxin A in laying hens: Tissue deposition and passage into eggs. *Proc. V Int. IUPAC Symp. on Mycotoxins and Phycotoxins, Vienna, September 1-3 1982*; 122-125.
- KEYL A.C., NORRED W.P. 1976. Utilization of aflatoxin contaminated food. *J. Agricult. Food Chem.* 24; 408-410.
- KROGH P. 1976. Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. *Nord. Vet.-Med.* 28; 452-458.
- KROGH P. 1977. Ochratoxin A residues in tissues of slaughter pigs with nephropathy. *Nord. Vet. Med.* 29; 402-405.
- KROGH P., HALD B., PEDERSEN E.J. 1973. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 81; 689.
- KROGH P., AXELSEN W.H., ELLING F. et al. 1974. Experimental porcine nephropathy. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, sec. A, suppl. nr 246.
- KROGH P., ELLING F., HALD B., LARSEN A.E., LILLEHOJ E.B. 1976. Time-dependent disappearance of ochratoxin A residues in tissues of bacon pigs. *Toxicology* 6; 235-242.
- KROGH P., HALD B., PLESTINA R., CEOVIC S. 1977. Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: Preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. sec. B*, 85; 238-240.
- KUBACKI S.J., GOSZCZ H. 1979. Metody badania i występowanie patuliny w przetworach spożywczych. *Przem. spoż.* 33; 427-428.
- LANZA G.M., WASHBURN K.W., WYATT R.D. 1980. Variation with age in response of broilers to aflatoxin. *Poultry Sci.* 59; 282-288.
- LEISTNER L. 1984. Toxinogenic *Penicillia* occurring in foods and feeds. W: *Toxigenic Fungi, Their Toxins and Health Hazard*. Kondasha Ltd., Tokyo.

- LILLEHOJ E.B., FENNEL D.I., KWOLEK W.F. 1976. *Aspergillus flavus* and aflatoxin in Iowa corn before harvest. Science 193; 495-496.
- LILLEHOJ E.B., KWOLEK W.F., HORNER E.S., WIDSTROM N.W., JOSEPHSON L.M., FRANZ A.O., CATALANO E.A. 1980. Aflatoxin contamination of preharvest corn: Role of *Aspergillus flavus* inoculum and insect damage. Cereal Chem. 57; 255-257.
- LOGRIECO A., MORETTI A., RITIENI A., CHEŁKOWSKI J., ALTOMARE C., BOTTALICO A., RANDAZZO G. 1993. Natural occurrence of beauvericin in preharvest *Fusarium subglutinans* infected corn crops in Poland. J. Agric. Food Chem. 41:2149-2152.
- MAŁECKA E., CHMIELEWSKA J. 1980. Aflatoksyna B₁ i B₂ w przemysłowych mieszankach paszowych i ich składnikach na terenie aglomeracji łódzkiej. Bromatologia i Chemia toksykologiczna 23; 339-340.
- MARASAS W.F.O., LEISTNER L., HOFMANN G., ECKARDT C. 1979. Occurrence of toxigenic strains of *Fusarium* in maize and barley in Germany. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7; 289-306.
- MCEVOY TG, ROBINSON JJ, ASHWORTH JA, ROOKE JA, SINCLAIR KD (2001) Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. Theriogenology 55:113-129.
- MESTERHAZY A., BARTOK T., MIROCHA C.G., KOMOROCZY R. 1999. Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. Plant Breeding 118: 97-110.
- MESTERHAZY A., BARTOK T., VARGA M., KASZANYI G., TOTH B. 2003. Influence of methodical and technological aspects on the control of *Fusarium* head blight in wheat. Proc. 2003 National *Fusarium* head blight Forum. 13-15 Dec. Bloomington, MN, 97-101.
- MILLER J.D., YOUNG J.C., SAMPSON R.D. 1985. Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. Phytopathology 113: 359-367.
- MING T.WU., AYRES J.C. 1974. Effect of dichlorvos on ochratoxin production. J. Agricult. Food Chem. 22; 536-537.
- NICHOLSON P., CHANDLER E., DRAEGER R.C., GOSMAN., SIMPSON D.R., THOMSETT M., EILSON A.H. 2003. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of *Fusarium* head blight of cereals. Eur J Plant Pathol 109: 691-703.
- PARRY D.W., JENKINSON P., MC LEOD L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in grain cereals-a review. Plant Path. 44: 207-238.
- PASCALE M., VISCONTI A., AVANTOGGIATO A., PROŃCZUK M., CHEŁKOWSKI J. 1999. Mycotoxin contamination of maize hybrids after infection with *Fusarium proliferatum*. J. Sci. Food Agric. 79:2094-2098.
- POGORZELSKI E., MASIOR S., CZYŻYCKI A., ŁUKOWSKA-PIETRZAK Z., PIASZCZYŃSKA M.A. 1977. Mikotoksyny w moszczach i winach z jabłek porażonych zgnilizną. Przem. ferment. rol. 5; 11-15.
- POPIEL D., KWAŚNA H., CHEŁKOWSKI J., STĘPIEŃ Ł., LASKOWSKA M. 2008. Impact of antagonistic fungi on *Fusarium* species – toxigenic cereal pathogens. Acta Mycologica 43: 29-40.
- POPIEL J, NICPON J, SAPIKOWSKI G (2004) Effect of the dry feed contaminated with moulds on the prevalence of alimentary tract disorders in cats. Vet Feed Hygiene 82-87.
- PRIOR M.G., SISODIA C.S. 1978. Ochratoxicosis in White Leghorn Hens. Poultry Sci. 57; 619-623.
- PRIOR M.G., O'NELL J;B., SISODIA C.S. 1978. Effect of ochratoxin A on production characteristics and hatchability of Japanese quail. Can. J. Anim. Sci. 58; 29-33.

- RUCKNBAUER P., BUERTSMAYR H., LEMMENS M. 2001. Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.). *Euphytica* 119: 121-127.
- RUTQUIST L., BJORKLUND N.E., HULT K., GATENBECK S. 1977. Spontaneous occurrence of ochratoxin residues in kidneys of fattening pigs. *Bl. Vet. Med.* 24; 402-408.
- RUZSAS C., BIRO-GOSZTONYI M., WOLLER L., MESS B (1979) Effect of the fungal toxin (zearalenone) on the reproductive system and fertility of male and female rats. *Acta Biologica, Academia Scientia Hungarica* 30:335-345.
- SCHROEDER H.W., CHRISTENSEN J.J. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*. 53: 831-838
- SCOTT P., SOMERS E. 1968. Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *Agricult. Food Chem.* 16; 483-485.
- SCOTT P., LAU P.Y., KANHERE S.R. 1981. Gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 64; 1364-1371.
- SCOTT P.M., KANHERE S.R., LAU P.Y., DEXTER J.E., GREENHALGH R. 1983. Effect of experimental flour milling and breadbaking on retention of deoxynivalenol (vomitoxin) in hard red spring wheat. *Cereal Chem.* 60; 421-424.
- SEELING K., DÄNICKE S, UEBERSCHÄR KH, LEBZIEN P, FLACHOWSKY G (2005) On the effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows. *Food Add Contam* 22: 847-855.
- SHANON G.M., SHOTWELL O.L. 1980. Laboratory screening for zearalenone formation in corn hybrids and inbreds. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 63; 1275-1277.
- SHOTWELL O.L., VANDERGRAFT F.E., HESSELTINE C.W. 1978. Aflatoxin formation on sixteen soybean varieties. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61; 574-580.
- SHOTWELL O.L., BENNETT G.A., GOULDEN M.L., SHANNON G.M., STUBBLEFIELD R.D., HESSELTINE C.W. 1980. Survey of 1977 midwest corn at harvest for aflatoxin. *Cereal Foods World* 25; 12-13.
- SHREEVE B.J., PATTERSON D.S.P., ROBERTS B.A. 1975. Investigation of suspected cases of mycotoxicosis in farm animals in Britain. *Vet. Record* 97; 275-278.
- SKORSKA-WYSZYNSKA E, JAKIMIUK E, GAJECKA M, MLYNARCZYK J, OBREMSKI K., GAJECKI M (2004) Preliminary evaluation of influence of zearalenone on cocultures of granulosa and internal hela cells of ovarian follicles in bitches *in vitro* culture. *Vet. Feed Hygiene* 36-44.
- SNIJDERS C.H.A., PERKOWSKI J. 1990. Effect of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology* 80: 556-570.
- SOKOŁOWSKI M. 1983. Zawartość mikotoksyn w mieszankach i komponentach paszowych na podstawie badań własnych. *Med. Wet.* 39; 294-296.
- STĘPIEŃ Ł., POPIEL D., KOCZYK G., CHEŁKOWSKI J. 2008. Wheat infecting *Fusarium* species in Poland – their chemotypes and frequencies revealed by PCR assay. *J. Appl. Genet.* 49; 433-441.
- SZATHMARY C.I., MIROCHA C.J., PALYUSIK M., PATHRE S.V. 1976. Identification of mycotoxins produced by species of *Fusarium* and *Stachybotrys* obtained from eastern Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 32; 579-584.
- SZCZECZ G.M., CARLTON W.W., TUIE J., CALDWELL R. 1973. Studies of ochratoxin A toxicosis in swine. *Vet. Pathol.* 10; 347.
- TOMCZAK M., WIŚNIEWSKA H., STĘPIEŃ Ł., KOSTECKI M., CHEŁKOWSKI J., GOLIŃSKI P. 2002. Deoxynivalenol, nivalenol and moniliformin occurrence in wheat samples with scab symptoms in Poland (1998-2000). *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 625-630.

- TUCKER T.L., HAMILTON P.B. 1971. The effect of ochratoxin in broilers. Poultry Sci. 50; 1637.
- WAALWIJK C., KASTELEIN P., DE VRIES I., KERENYI Z., VAN DER LEE T., HESELINK T., KÖHL J., KEMA G. 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. Eur. J. Plant Pathol. 109: 743-754.
- WAALWIJK C, VAN DER HEIDE R, DE VRIES I, VAN DER LEE T, SCHOEN C, COSTREL-DE CORAINVILLE G, HÄUSER-HAHN I, KASTELEIN P, KÖHL J, LONNET P, DEMARQUET T, KEMA GHJ, 2004. Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. Eur J Plant Pathol 110, 481-494.
- VANDERGRAFT F.E., HESSELTINE C.W., SHOTWELL O.L. 1975. Grain preservatives: Effect on aflatoxin and ochratoxin production. Cereal Chem. 52; 79-84.
- VISCONTI A., BOTTALICO A. 1983. High levels of ochratoxins A and B in mouldy bread responsible for mycotoxicosis in farm animals. J. Agricult. Food Chem. 31; 1122-1129.
- WHICKLOW D.T., HESSELTINE C.W., SHOTWELL O.L., ADAMS G.L. 1980. Interference competition and aflatoxin levels in corn. Phytopathology 70; 761-764.
- WILSON D.M., MCMILLIAM W.M., WIDSTROM N.W. 1979. Field aflatoxin contamination of corn in South Georgia. J. Am. Oil. Chem. Soc. 56; 798-799.
- ZUBER M.S., CALVERT O.H., LILLEHOJ E.B., KWOLEK W.F. 1976. Preharvest development of aflatoxin B₁ in corn in the United States. Phytopathology 66; 1120-1121.
- ZIMMERMANN J.L., CARLTON W.W., TUIE J. 1979. Mycotoxicosis produced in swine by cultural products of an isolate of *Aspergillus ochraceus*. Vet. Pathol. 16; 583-592.

Załącznik C

European Mycotoxins Regulations

European regulations	PPB
Aflatoxins	
B₁ Only/Total for Aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ *	
Animal feed	20/-
Baby food and processed cereal for infants and young children	0.1/-
Cereal, processed	2/4
Cereal, unprocessed	-/-
Groundnuts for processing	8/15
Groundnuts, nuts, and dried fruit for direct human consumption	2/4
Maize, unprocessed	5/10
Nuts and dried fruits for sorting or processing	5/10
Spices (capsicum, pepper, nutmeg, ginger, turmeric)	5/10
Aflatoxin M₁	
Infant formula	0.025
Milk	0.05
Deoxynivalenol (DON)	
Bread, pastries, biscuit, cereal snacks, and breakfast cereals	500
Cereal flour, maize flour, maize grits, and maize meal	750
Pasta (dried)	750
Processed cereal-based food for infants and young children	200
Unprocessed cereals other than durum wheat, oats, and maize	1250
Unprocessed durum wheat and oats	1750
Unprocessed maize intended for wet milling	1750
Fumonisin (B₁ and B₂)	
Maize-based breakfast cereal and snacks	800
Maize grits/flour/meal and refined maize semolina	1000
Other maize-based foods for direct human consumption	1000
Processed maize-based foods for infants and young children and baby food	200
Unprocessed maize not intended for wet milling	4000
Ochratoxin A	
Cereal-based baby food and food for infants	0.5
Dried vine fruits	10
Processed cereals and cereal products	3
Cereals, unprocessed (including raw rice and buckwheat)	5
Roasted coffee beans, except soluble coffee	5
Soluble coffee (instant)	10
Wine, grape juice, grape must	2
Zearalenone	
Bread pastries, and biscuits	50
Cereal flour except maize flour	75
Cereal snacks and breakfast cereals	50
Maize intended for direct consumption and for maize-based snacks and cereals	100
Processed maize-based foods for infants and young children	20
Refined maize oil	400
Unprocessed cereals other than maize	100
Unprocessed maize not intended for wet milling	350

* Regulations for B₁ alone are listed first, followed by regulations for Total Aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂) after the /.