

MEDYCYNA WETERYNARYJNA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POSWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST, sekretarz naukowy: dr Stanisław WOŁOSZYN
Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, doc. dr Jerzy MAZURCZAK,
prof. dr Abdon STRYSZAK

RADA PROGRAMOWA

Prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Mieczysław CENA, prof. dr Bronisław GANCARZ, dr Kazimierz GOLISZEWSKI, prof. dr Jan HAY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Tadeusz JASTRZĘBSKI, prof. dr Lech JAŚKOWSKI, doc. dr Adam KĄDZIÓŁKA, ppłk dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Stanisław KRAUSS, prof. dr Józef KULCZYCKI, doc. dr Zdzisław LARSKI, doc. dr Jerzy LIPANOWICZ, płk dr Konrad MILLAK, dyr. dr Henryk OBERFELD, prof. dr Wincenty PEZACKI, doc. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Alfred TRAWIŃSKI, doc. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Aleksander ZAKRZEWSKI, prof. dr Eugeniusz ZARŃOWSKI

CHOROBY GRZYBICZE

C. J. MIROCHA *), C. M. CHRISTENSEN, G. M. NELSON

Toksyczne produkty przemiany materii grzybów wywołujących mikotoksykozy

Uniwersytet Minnesota, St. Paul, USA

Mikotoksykozy są to choroby zwierząt i ludzi wywołane przez toksyny grzybów wytwarzane w czasie wzrostu tych mikroorganizmów na produktach spożywczych, paszach, ziarnach oraz innych składnikach pokarmowych.

Badania nad mikotoksynami autorzy rozpoczęli w 1963 r. w związku z ogólnym zainteresowaniem się tym problemem pracowników naukowych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu oraz Katedry Fitopatologii Instytutu Rolniczego. Pracownicy rozpoznawcze współpracowały ściśle z lekarzami — praktykami całego stanu Minnesota i częściowo sąsiednich stanów. W przypadkach masowych zachorowań lub padnięć zwierząt, o nieustalonej etiologii, lekarze terenowi przysyłał chore lub padłe zwierzęta do pracowników rozpoznawczych celem przeprowadzenia dokładnych badań. Licznych przypadków padnięć lub chorób w stadach świń, bydła, kurcząt i indyków, jak również gwałtownego spadku nieśności kur, nie można było przypisać infekcjom wirusowym, bakteryjnym i innym znanym czynnikom. Istniało zatem uzasadnione podejrzenie, że przynajmniej część tych chorób jest spowodowana jakimiś czynnikami zawartymi w paszy np. mikotoksynami. W pracy przedstawiono kilka problemów dotyczących tego zagadnienia.

Założeniem pracy było poznanie źródeł zaroi grzybiczych oraz określenia roli i wpływu mikotoksyn na zdrowotność zwierząt domowych w stanie Minnesota. Szczególną uwagę zwrócono na zespół objawów estrogennych u świń i bydła, wybroczynowość u kurcząt i indyków, poliencfalomalację i inne choroby o nieznannej etiologii u bydła.

Metodyka badań

Podejrzone próbki ziarna i paszy posiewano na podłoża agarowe. Średnio 5 do 20 wyizolowanych szczepów grzybiczych przesiewano dla przetrzymywania kultur na podłoża z jałową glebą. Następnie grzyby te namnażano na podłożu z wyciągiem kukurydzy oraz na wyjałowionym ryżu i kukurydzy. Posiewy inkubowano 2 tyg. w 22—25°C oraz 3 tyg. w 12°C, a następnie materiał suszono i mielono. Przygotowane w ten sposób próbki podawano każdorazowo dwom białym szczurom, jako jedyny pokarm. Grzyby, które powodowały zejścia śmiertelne obydwu użytych do próby szczurów, w okresie 7—10 dni, określono w tabeli jako letalne. Grzyby posiadające zdolność wzrostu na ziarnach zbóż podawano kurczętom lub indycętom, względnie obydwu tym gatunkom piskląt. Wyniki podano w tabelach.

Spośród 969 szczepów, wyosobnionych w ciągu ostatnich 2 lat, około 50% było toksycznych dla szczurów. 157 spośród 396 szczepów grzybiczych wyizolowanych z orzeszków ziemnych oraz 331 z 573 wyizolowanych ze zbóż i pasz określano jako letalne dla szczurów (tab. 1.). Z orzeszków ziemnych najczęściej izolowano pleśniaki z rodzaju *Penicillium*, przy czym większość z nich posiadała właściwości toksyczne. Biorąc pod uwagę częstotliwość występowania, można grzyby te uszeregować na-

*) Prof. dr C. J. Mirocha z Uniwersytetu Minnesota był we wrześniu 1967 r. gościem Polskiej Akademii Nauk. Wyniki badań, reprezentowanego przez siebie środowiska, a dotyczące mikotoksykoz, referowane były na posiedzeniu PTNW w Warszawie i Lublinie, i stanowią treść niniejszej publikacji.

Tab. 1. Ilość szczepów grzybiczych toksycznych dla szczurów, wyizolowanych z różnych pasz w latach 1965—67 w pracowniach Uniwersytetu Minnesota

Źródło	Ilość badań	Ilość i odsetek szczepów letalnych
Orzeszki ziemne	396	157/40 %
Pasze z kukurydzą	573	331/58 %
Ogółem	969	488/50 %

stępująco: *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Chaetomium* i *Alternaria* (tab. 2). Próby biologiczne na kurczętach, kaczkach, indyczętach i szczurach wykazały, że największą toksycznością cechowały się gatunki: *Aspergillus*, *Penicillium* i *Chaetomium*. Celem określenia częstości występowania toksycznych grzybów w paszy podjęto, pod kierunkiem prof. dr C.M. Christensena, badania nad mikroflorą czarnego pieprzu. Zgromadzono próbki z Indii, Anglii, Meksyku, USA, Polski i Japonii. Zbadano metodą rozcieńczeń 30 próbek i otrzymano średnio z 1 grama zmielonego pieprzu 39 000 kolonii grzybów. Łączna ilość kolonii bakteryjnych, z 11 badanych próbek, wynosiła 194 mln/g. Spośród wyosobnionych grzybów pewne szczepy *Aspergillus flavus* i *Asp. ochraceus*, namnożone przez 8—10 dni na podłożu z kukurydzą, działały letalnie na białe szczury i dwudniowe kaczęta rasy „Pekin”. Z jednej hodowli *Asp. flavus*, na podłożu z kukurydzą otrzymano aflatoksynę B. Szczep ten izolowano z czarnego pieprzu. Spożywanie pokarmów z czarnym pieprzem przez wiele lat i ewentualnie zawartych w nim toksyn grzybiczych jest sprawą wymagającą wyjaśnienia.

Tab. 2. Toksyczność dla szczurów grzybów najczęściej izolowanych z orzeszków ziemnych

Rodzaj	Ilość szczepów	Ilość szczepów letalnych
<i>Alternaria</i>	23	12
<i>Aspergillus</i>	37	25
<i>Chaetomium</i>	26	11
<i>Fusarium</i>	65	28
<i>Penicillium</i>	80	40
Ogółem	231	116/50%

Toksyczność kukurydzy zakażonej *Chaetomium globosum* dla szczurów.

Obserwowano zejścia śmiertelne szczurów karmionych kukurydzą zakażoną szczepami *Chaet. globosum* wyizolowanymi uprzednio z kukurydzy i pasz znajdujących się w obrocie handlowym. Liczne szczepy powodowały padnięcia szczurów po 4—5 dniach od skarmienia ok. 5 gramów tej paszy. Już drugiego dnia po spożyciu sztucznie zakażonej paszy spostrzegano objawy zaburzeń ze strony ośrodkowego układu nerwowego wyrażające się podnieceniem, światłowstrętem i utratą zmysłu równo-

Tab. 3. Toksyczność grzybów najczęściej wyosobnionych z pasz zawierających kukurydzę

Rodzaj	Zwierzę testowe	Ilość badanych szczepów	Ilość i odsetek szczepów letalnych
<i>Alternaria</i>	R	60	53/88%
<i>Aspergillus</i>	R-C-D	159	60/38%
<i>Chaetomium</i>	R	18	15/83%
<i>Cladosporium</i>	R	41	19/46%
<i>Fusarium</i>	R-T	87	65/75%
<i>Penicillium</i>	R-T	116	53/46%
Ogółem		481	265/55%

C — kurczęta, D — kaczęta, T — indyczęta, R — szczury.

wagi. W następnych dniach (1—2) wystąpiła u tych zwierząt śpiączka prowadząca szybko do śmierci. Przy sekcji najczęściej stwierdzano wybroczyny podoponowe, krwiotoczny stan zapalny jelit i hemoglobinurię. Czas protrombinowy, oznaczony trzykrotnie u dwu szczurów tuż przed śmiercią, wynosił ponad 5 minut, tzn. był 20 krotnie wyższy niż w grupie kontrolnej.

Toksyna *Chaetomium* wywołująca ciężkie objawy u szczurów okazała się całkowicie nieszkodliwa dla świń. U siedmiu 6-tygodniowych warchlaków karmionych *ad libitum* wyłącznie kukurydzą zakażoną *Chaetomium*, nie obserwowano żadnych objawów chorobowych.

Toksyczny związek, czy też związki, były rozpuszczalne w chlorku metylenu, chloroformie i acetonie. Nie rozpuszczały się w eterze naftowym (temp. wrzenia 30—60° albo 60—70°C), metylu Cellosolve oraz w wodzie (tab. 4). Badania na szczurach wykazały, że przez wstępne ekstrahowanie eterem naftowym (t. wr. 60—70°C), a następnie acetonem lub chlorkiem

Tab. 4. Ekstrakcja toksyny produkowanej przez *C. globosum*

Sposób ekstrahowania	Działanie letalne	Ilość skarmianej paszy w gramach
Kontrola — kukurydza niezakażona	brak	40
Eter naftowy (temp. wrz. 60—70°C)	brak	32
Eter naftowy (temp. wrz. 30—60°C)	brak	48
Eter naftowy (temp. wrz. 30—60°C) po wstępnej ekstrakcji eterem naftowym temp. wrz. 60—70°C)	brak	48
Aceton	Śmierć (10 dni)	14
Aceton po wstępnej ekstrakcji eterem naftowym (temp. wrz. 60—70°)	Śmierć (6 dni)	6
Chlorek metylenu	Śmierć (10 dni)	17
Chlorek metylenu po wstępnej ekstrakcji eterem naft. (temp. wrz. 60—70°C)	Śmierć (6 dni)	18

Średnia ilość pokarmu spożyta przez każdego szczura. 500 gramów paszy ekstrahowano różnymi rozpuszczalnikami lub sekwencją rozpuszczalników i wyciąg dodawano do 100 g jajoowej kukurydzy. Dawka dla szczura wynosiła 50 g.

metylenu uzyskiwano więcej materiału toksycznego niż po ekstrakcji pojedynczej jednym z wymienionych rozpuszczalników. Ekstrakty acetonowe zawierały więcej pigmentu i materiału toksycznego niż ekstrakty z chlorkiem metylenu.

Wyciągi oczyszczano na kolumnie z żelazem krzemionkowym (o wym. 2×15 cali) i eluowano różnymi rozpuszczalnikami. Testy skarmiania zwierząt modelowych wykazały, że substancja toksyczna znajdowała się w eluacie acetonowym (tab. 5). Toksynę oczyszczano dalej na kolumnie żelaz krzemionkowego metodą gradientu elucji. Znajdowała się ona we frakcji eluatu otrzymanego 5% roztworem chloroformowym acetonu. Przy dalszym frakcjonowaniu na kolumnie gradientowej toksyna występowała we frakcji 2% acetonu w chloroformie. Nie udało się jednak uzyskać dostatecznej ilości związku do oznaczeń chemicznych. Wydaje się, że toksyna *Ch. globosum* różni się od innych znanych dotychczas mikotoksyn.

Tab. 5. Dalsze oczyszczanie toksyny *Chaetomium* wyeluowanej z kolumny z żelazem krzemionkowym z frakcją acetonową

Eluent	Ilość eluentu ml	Działanie letalne
Chloroform	1500	brak
5 % aceton w CHCl ₃	1500	śmierć
10 % aceton w CHCl ₃	1250	brak
20 % aceton w CHCl ₃	1500	brak
50 % aceton w CHCl ₃	1000	brak
aceton	500	brak
woda	500	brak

Eluent zagęszczono i dodano do 100 gramów kukurydzy. Dawka dla szczura wynosiła 50 gramów.

Syndrom krwiotoczny

Toksyny wytwarzane przez pleśnie z rodzaju *Penicillium* wywołują u kurcząt, kacząt i indycząt zespół objawów określaną mianem „syndromu krwiotocznego”. Wyraża się on silnie zaznaczoną anemią i ogólną wybrocznością związaną z obniżeniem funkcji szpiku kostnego, co w rezultacie prowadzi do zejścia śmiertelnego. *Penicillium* występuje często tylko w pewnych partiach kukurydzy, orzeszków ziemnych i innych nasion. W prowadzonych badaniach stwierdzono, że jednym z najczęściej spotykanych i najobficiej rosnącym był pleśniak *Penicillium*. Liczne wyizolowane szczepy, po namnożeniu na podłożu z kukurydzą, powodowały zejścia śmiertelne szczurów w ciągu 3 dni. Sekcyjnie, u tych zwierząt, obserwowano wybroczny w błonie śluzowej jelit oraz w tkankach podoponowych mózgu.

Toksyna względnie toksyny ekstrahowane eterem naftowym (t.w. 30—60°C) lub alkoholem metylowym były bardzo labilne. Były one trudno rozpuszczalne w eterze naftowym (t.w. 60—70°C) i acetonie oraz nierozpuszczalne w chlorku metylenu, chloroformie i alkoholu etylowym.

Syndrom rujotwórczy (estrogeny)

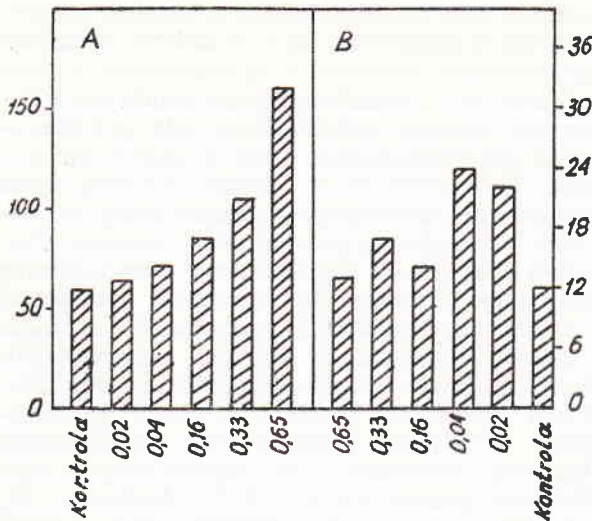
Zespół objawów rujowych charakteryzował się u świni rozpułchnieniem i obrzękiem sromu, zmniejszeniem wielkości jąder u młodych

knurków oraz powiększeniem gruczołów mlecznych tak u maciorek, jak i knurków. Niekiedy obserwowano ronienia u pierworódek i starszych macior. Czynnikiem przyczynowym okazała się toksyna grzyba *Fusarium graminearum* i prawdopodobnie innych gatunków rodzaju *Giberellazeae* w czasie wzrostu tych grzybów na kukurydzy pozostawionej w korytach. Toksynę tę produkowały szczepy *Fusarium* również na wyjałowionej w autoklawie kukurydzy. Szczepy te uprzednio izolowano z kukurydzy paszowej pochodzącej z ferm w stanie Minnesota, w których obserwowano objawy rujowe u świń. Ponadto szczepy *Fusarium* izolowano również z paszy granulowanej. Pierwsze badania nad izolowaniem i budową chemiczną tych rujotwórczych metabolitów przeprowadzili F.N. Andrews, M. Stob (patent belgijski 611630, 1961, patent USA 3, 196, 019, 1965). Częściową charakterystykę tych związków podał Christensen i wsp. (2, 5). Ostatnie badania nad strukturą chemiczną tego estrogenu wykazały, że jest to jeden z enantiomorfów, 6—/10—hydroksy — 6 — oksy-trans 1-undecyl/—β— lakton kwasu rezorcynowego (8). Opisany czynnik estrogeny, badacze z Minnesota (1) oznaczyli umownym mianem „F—2”; Commercial Solvents Corporation jako „RAL”, a ostatnio jako „Zearalenone” (8). Związki o podobnej strukturze chemicznej, ale nieaktywne biologicznie opisano uprzednio, np.: curvularin produkowany przez grzyby z rodzaju *Curvularia*, *Penicillium steckii* Zaleski i *Penicillium expansum* Link (7), radicol wytwarzany przez *Nectria radicola* (6) i monorden produkowany przez grzyby z rodzaju *Monosporium* sp. (4).

Zakres biologicznej aktywności F—2

1. Odpowiedź estrogenowa u szczurów i myszy.

Wstrzyknięcie oczyszczonego roztworu F—2 lub podawanie *ad libitum* postaci krystalicznej młodym (odsadzonym), dziewiczym samiczkom szczura daje typową odpowiedź estrogenną, charakteryzującą się wzrostem wagi macicy. Zależność między dawką od 20 do 650 mcg stosowaną w ciągu 7 dni, a wzrostem wagi przedstwia rys. 1-a, na której widać wyraźny wpływ wielkości dawki na zwiększenie wagi macicy. Odnosiło się to również do średnich przyrostów wagi ciała. U szczurów, którym podawano najwyższe stężenia F—2 (rys. 1-b) nie spostrzegano wyższych przyrostów wagi w porównaniu do kontroli, natomiast najniższe dawki powodowały względne zwiększenie przyrostów wagowych. Podobnie zbadano aktywność estrogenną używając jako modelu macicy myszek. (tab. 6 i 7). Po podskórnym podaniu myszkom, stwierdzono, że F—2 był 0,00063 razy bardziej aktywny niż specyfik firmy Estrone (tab. 6). F—2 wprowadzony sondą dożołądkowo okazał się 0,01 bardziej



Rys. 1. (A) Wpływ różnych dawek F-2 stosowanych domięśniowo na wagę macicy szczura. (B) Wpływ tych samych dawek na wagę ciała.

Tab. 6. Oznaczenie właściwości estrogennych „F-2” na myszkach (iniekcja podskórna)

Substancja badana	Całkowita dawka	Ilość myszek	Średnia wartość dla macicy ± S.E.
Kontrola	0	10	0,75 ± 0,09
Estrone	0,05	10	1,48 ± 0,09
	0,1	10	2,66 ± 0,36
	0,2	10	3,37 ± 0,32
	0,4	10	3,60 ± 0,18
F - 2	5	10	0,72 ± 0,05
	20	10	0,88 ± 0,03
	80	9	1,41 ± 0,11

Dane wg Dr. Ralph I. Dorfman (Syntex) F-2 0.00062 x aktywniejszy od Estrone.

Tab. 7. Oznaczenie właściwości estrogennych „F-2” na myszkach (podawano sondą dożołądkowo)

Substancja badana	Całkowita dawka	Ilość myszek	Średnia wartość dla macicy ± S.E.
Kontrola	0	10	0,76 ± 0,06
Estrone	0,5	10	1,21 ± 0,12
	1	9	1,19 ± 0,10
	2	9	2,12 ± 0,23
	4	10	2,93 ± 0,21
F - 2	12,5	10	1,11 ± 0,04
	25	10	1,48 ± 0,18
	50	10	1,80 ± 0,12
	100	9	2,35 ± 0,17

Dane wg Dr. Ralph I. Dorfman z Syntex F-2. 016 aktywniejszy od estrone.

aktywny niż Estrone. Jak podaje Dr R.I. Dorfman (Syntex) F-2 wykazuje większą aktywność po podaniu doustnym. Ponadto stwierdzono, że F-2 stymuluje rozrost mięśnia kroczonego myszy (tab. 8). Aktywność ta nie dorównała jednak aktywności specyfiku Stilbestrol i wg Dr R.I. Dorfmana, nawet po znacznym zwiększeniu dawki nie przekraczała pewnej wartości granicznej. Podobne wyniki

Tab. 8. Stymulacja przerostu mięśnia krocza

Substancja badana	Dawka całkowita w mg	Ilość zwierząt	Wartość średnia dla macicy ± S.E.
Kontrola	0	10	0,60 ± 0,03
Diethylstilbestrol	0,33	9	0,80 ± 0,06
	1,0	10	1,04 ± 0,04
	3,0	10	1,19 ± 0,06
	60	9	0,99 ± 0,09
	540	10	1,03 ± 0,05

Dane wg Dr Ralph I. Dorfman (Syntex).

uzyskano w hodowli tkanek szczurzych i roślinnych.

II. Działanie na wzrost hodowli tkanek roślinnych.

Wpływ F-2 na stymulację wzrostu komórek roślin wyższych badano na hodowli tkanek (pith callus) tytoniu. Tkanek namnożono w 28°C, w ciemnym pomieszczeniu przy 75% wilgotności względnej. Do oznaczeń użyto F-2 w stężeniach od 0,02 do 25 micromol/l. Podłoże zawierało ponadto 2,0 mg/l kwasu 3-indoloctowego i 0,2 mg/l kinetyny. F-2 po rozpuszczeniu w 1 ml oczyszczonego 100% etanolu rozcieńczonego gorącą, podwójnie destylowaną wodą do odpowiedniej objętości i dodawano do podłoża przed wyjałowieniem. W podanym układzie doświadczenia F-2 pobudzał nieznacznie wzrost w stężeniach od 0,02 do 1,0 mikromol/l (tab. 9). W stężeniu 2,5 mi-

Tab. 9. Stymulacja wzrostu hodowli tkankowej kalusa pod działaniem F-2 w obecności kwasu indoloctowego i kinetyny. Wzrost — 7 tygodni

F - 2 M/1	Wydajność w gramach uzyskiwana z 1 butelki	
	Wilgotna masa	Sucha masa
0	3,79 ± 0,2	0,23
0,02	4,17 ± 0,3	0,23
0,1	3,98 ± 0,3	0,28
0,5	4,04 ± 0,1	0,28
1,0	3,71 ± 0,2	0,26
2,5	2,86 ± 0,3	0,21
12,5	0,62 ± 0,06	0,06
25,0	0,48 ± 0,03	0,05

Dane wg Dr. E. M. Linsmaler-Bednar, University of Minnesota.

kromol/l — co odpowiada poniżej 1 ppm — obserwowano działania hamujące F-2. Przy stosowaniu wzrastających stężeń F-2 jednocześnie ze zwiększonymi dawkami kinetyny, obserwowano, że duże stężenie kinetyny (0,2 mg/l) lub wysoki poziom endogennej cytokininy podnoszą tolerancję badanej tkanki roślinnej na wyższe stężenia F-2. Tkanek namnożono przy niskich lub zerowych stężeniach kinetyny, a następnie badane w obecności 0,2 mg/l kinetyny okazały się niewrażliwe na hamujące działanie F-2 w stężeniach do 25 mikromol/l. W następnych doświadczeniach

zbadano wpływ F—2 na zdolność wytwarzania narządów w niezróżnicowanej tkance callus. Stwierdzono, że związek ten stymuluje tworzenie łodygi. Jednocześnie ze wzrostem łodygi spostrzegano zanik ilościowy tkanki callus. Badania te wykonane były przez Dr E.M. Linsmaier — Bednar, Uniwersytet Minnesota.

III. Działanie na mikroorganizmy

Badania wykazały pobudzające działanie F—2 na rozwój stadium dojrzałego (sexual) *Fusarium graminearum* (wg Cesaria Eugenio, Uniw. Minnesota). F—2 jest wytwarzany przez ten gatunek *Fusarium* i stanowi naturalny składnik tego układu biologicznego, hamuje on tworzenie się stadium dojrzałego. Niskie stężenia F—2 hamowały tworzenie stadium dojrzałego u *Helmenthosporium carbonum* i grzybów rodzaju *Neocosmospora* (wg Dr D. Huisingh, Uniwersytet stanu Ph. Karolina w Raleigh).

Enzymy biorące udział w biosyntezie są indukowane w niskiej temperaturze (12°C). Jednotygodniową hodowlę *Fus. graminearum* na jałowej, nawilgoconej kukurydzy w temp. pokojowej inkubowano następnie przez 3,5 tyg. w temperaturach 12 i 25°C. Zaobserwowano, że hodowla prowadzona w 12°C zawierała 390 ppm estrogenu, podczas gdy w 25°C związku tego nie stwierdzono (tab. 10).

Tab. 10. Zależność pomiędzy temperaturą inkubacji i produkcją F-2 przez *Fusarium graminearum*

Wiek hodowli w tyg.	Temperatura inkubacji	F — 2 ppm	Ergosterol ppm
3,5	12°C	390	0
3,5	25°C	0	528
7,5	12°C	2,328	0
7,5	25°C	0	1,680
11,0	12°C	4,200	0
11,0	25°C	0	1,596
11,0	25°C—8 tyg. i 12°C—3 tyg.	0	1,824

W tym samym układzie doświadczenia prowadzonego przez 7,5 i 11 tyg. również tylko w temp. 12°C uzyskano po 11 tyg. 4200 ppm. Natomiast ergosterol był syntetyzowany w temp. 25°C, co przedstawia tab. 10, a więc zachowywał się odwrotnie niż F-2. Z chwilą wytworzenia lub aktywacji w temp. 12°C, enzymów odpowiedzialnych za syntezę F-2, optymalne ilości tej substancji można uzyskiwać w temperaturach wyższych. Po aktywacji lub indukcji enzymów w odpowiednim czasie i temperaturze (12°C) hodowle inkubowano w temp. 12, 27 i 32°C. We wszystkich przypadkach największą wydajność uzyskano w temp. 27°C po 3, 5, 7 i 11 dniach (tab. 11). Po 11-dniowej inkubacji w temp. 27°C otrzymano ponad 8000 ppm, tzn. 3,5 raza więcej niż w temp. 12°C.

F-2 jest syntetyzowany na jałowym, nawilgoconym ryżu lub kukurydzy z dodatkiem lub bez dodatku glikozy. Zależnie od temperatury i czasu inkubacji uzyskiwano od 10 000 do 15 000 ppm. Wydajność F-2, na ryżu i kukurydzy, była taka sama. Glikoza w stężeniach 2 i 4%, na podłożach z ryżem i kukurydzą inkubowanych w 12°C przez 5, 6,5 i 8 tyg. działała hamująco, co silniej zaznaczone było na podłożu z kukurydzą. Przy 6% stężeniu stymulowała ona tworzenie F-2 jedynie na podłożu ryżowym.

Tab. 11. Wytwarzanie F-2 w temperaturach wyższych po uprzedniej indukcji enzymów w niskiej temperaturze

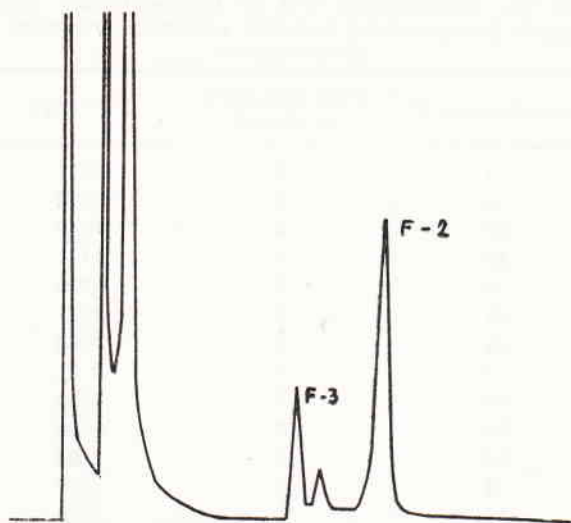
Temperatura 0°	Czas inkubacji w dniach	F — 2 (*)
12	0	1834
12	3	2082
27	3	3619
32	3	1134
12	5	1810
27	5	6511
32	5	3888
12	7	3.11
27	7	7280
32	7	3056
12	11	2360
27	11	8375
32	11	4674

(x) = Średnia z 4 powtórzeń.

Najnowsze badania nad biosyntezą F—2 wykazały istnienie niezidentyfikowanego związku o właściwościach podobnych do F—2, który oznaczono symbolem F—3. Jest on pośrednim związkiem w biosyntezie F—2 przez *Fus. graminearum* i w hodowlach tego grzyba występuje w małych ilościach. Prawdopodobnie większe znaczenie praktyczne ma występowanie tego związku w próbkach podejrzanych o powodowanie ronień i jałowoci w stadach bydła mlecznego w stanie Minnesota. Z próbek kukurydzy podejrzanych o wywoływanie ronień u świń izolowano *Fus. graminearum*, podczas gdy przypadki jałowoci u bydła przypisywano paszy zakażonej *Fus. moniliforme*. Co więcej, ten ostatni nie wytwarzał F—2 lecz obfite ilości F—3. Ostatecznie ustalono, że F—3 występuje w paszy podejrzanej o powodowanie masowej jałowoci bydła.

Badania nad budową i właściwościami chemicznymi F—3 wykazały wysoką wrażliwość tego związku na czynniki utleniające. Można go łatwo ekstrahować z materiału biologicznego, tymi samymi metodami i rozpuszczalnikami co F—2. Widmo spektrofotometryczne F—3 w ultrafiolecie jest identyczne jak F—2. Wykazuje jedynie brak maksimum absorpcji przy 314 m. F—3, w odróżnieniu od F—2, nie posiada grupy ketonowej w pierścieniu bocznym, o czym świadczy brak reakcji z odczynnikiem Girarda (chlorek trójmetylaminoacetohydrazyny). Pozwala to na identyfikację tych związków. F—3 podobnie jak F—2 reaguje z czynnikiem silanującym (N,O — Bis) Trimethylsilyl) — Acetamide) tworząc eter trójmetyl-silanowy. Związek ten można rozdzielić na kolumnie SE — 30 G.L.C. W temp. 260°C czas retencji F—3 był o ok. 2 min. krótszy niż F—2 (rys. 2).

F—3 podobnie jak F—2 można oddzielić od innych składników biologicznych na kolumnie z żelom krzemionkowym. Przy stosowaniu



Rys. 2. Rozdział pochodnych eteru trójmetylsilanowego F-2 (6-)-10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyli)-B resorcylic acid lactone i F-3 (niezidentyfikowany — podobny do F-2) przy pomocy chromatografii gazowej. Związki F-2 i F-3 wyekstrahowano z ryżu zakażonego sporami *Fusarium graminearum*.

zwykłych eluotropowych rozpuszczalników, eluowany on jest z frakcją eteru dwuetylowego.

Planuje się prowadzenie dalszych badań celem otrzymania większych ilości tego związku, co umożliwi analizę grup funkcjonalnych w oparciu o różne metody analizy spektroskopowej.

Piśmiennictwo

1. Christensen C. M., Franse H. A., Nelson G. H., Mrs. Fern Bates, Mirocha C. J.: Microflora of black and red pepper. *App. Microbiol.* 15, 622, 1967.
2. Christensen C. M., Nelson G. H., Mirocha C. J.: *Appl. Microbiol.* 13, 653, 1965.
3. Christensen C. M., Nelson G. H., Mirocha C. J., Fern Bates, Dorworth C. E.: *Appl. Microbiol.* 14, 774, 1966.
4. McCapra F. A., Scott I., Delmotte P., Delmotte-Placque J., Bhacca N. S.: *Tetrahedron Letters*, 15, 869, 1964.
5. Mirocha C. J., Christensen C. M., Nelson G. H.: *Appl. Microbiol.* 15, 497, 1967.
6. Mirrington B. N., Ritchie E., Shoppee C. W., Taylor W. C., Sternhell S.: *Tetrahedron Letters*, 7, 365, 1964.
7. Shibata S., Natori S., Udagana S.: *List of fungal products*. Univ. Tokyo Press, Tokyo, 1964.
8. Urry W. H., Wehrmeister H. L., Hodge E. B., Hidy P. H.: *Tetrahedron Letters*, 27, 3109, 1966.

STANISŁAW WOŁOŻYŃ

Badania nad właściwościami i budową antygenową *Histoplasma farciminosum* (*Cryptococcus farciminosus* — Rivolta) Część I. Hodowla i właściwości morfologiczne

Katedra Epizootiologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr S. KRAUSS

Jednym z najbardziej obecnie aktualnych zagadnień w mikologii lekarskiej jest sprawa ujednoczenia terminologii i systematyki grzybów chorobotwórczych. W istniejących podziałach panują duże rozbieżności spowodowane tym, że wszystkie prawie grzyby chorobotwórcze zostały odkryte przez lekarzy, którzy nadali im mniej lub bardziej trafne nazwy.

Za podstawę w określaniu przynależności gatunkowej brano właściwości morfologiczne fazy pasożytniczej spotykanej w organizmie oraz cechy morfologiczne i częściowo biochemiczne fazy saprofitycznej uzyskiwanej na podłożach sztucznych. Duża zmienność morfologiczna uzależniona od wielu, często bliżej nieznanym czynników zewnętrznych sprawiła, że jeden i ten sam grzyb był zaliczany do różnych gatunków i opisywany pod różnymi nazwami, co niezmiernie utrudnia korzystanie z piśmiennictwa. Przykładem może być drożdżak *Candida albicans* dla którego podano 172 synonimów (Spiesiwcewa — 89).

W ostatnim dziesięcioleciu szereg mikologów (Biquet i wsp. — 5, 6; Evans — 23; Salvin — 74; Seeliger — 80, 81) postulują przeprowadzanie badań nad strukturą antygenową grzybów uważając, że tą drogą można będzie często łatwiej ustalić przynależność gatunkową, a nawet pochodzenie filogenetyczne. Kaufmann i Kaplan (39) twierdzą, że poznanie budowy antygenowej umożliwi może ujednoczenie i rewizję klasyfikacji botanicznej. Dotychczas, w sposób wystarczający opracowano budowę antygenową tylko niektórych chorobotwórczych dla ludzi szczepów z rodzajów *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Histoplasma*, *Trichophyton* oraz *Sporotrichum*. Bardzo przydatne do tego celu okazały się, szeroko obecnie

w bakteriologii stosowane, odczyny precypitacji w żelu i immunoelektroforezy.

Celem pracy było zbadanie niektórych właściwości biochemicznych oraz powiązań antygenowych grzyba wywołującego epizootyczne zapalenie naczyń chłonnych koni i wybranych przedstawicieli rodzaju *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Saccharomyces*, *Trichophyton* i innych grzybów przy użyciu wyodrębnionych i określonych serologicznie, a częściowo również chemicznie, frakcji antygenowych tych mikroorganizmów. Poza tym postanowiono przebadać *in vitro* wrażliwość *Histoplasma farciminosum* na niektóre antybiotyki fungistatyczne, zalecane obecnie w leczeniu grzybic. Podjęcie takich badań wydawało się uzasadnione, tak ze względów poznawczych jak i praktycznych. Pozycja systematyczna tego grzyba nie jest ustalona. Grzyb ten od chwili wyosobnienia go przez Rivoltę (1873) opisywany był kolejno pod następującymi nazwami — synonimami:

Cryptococcus farciminosus (Rivolta — 1873)

Saccharomyces equi (Tokishige — 1896)

Saccharomyces farciminosum (Vuillemin — 1901)

Endomyces farciminosus (Boquet i Negre, Eberbeck — 1926)

Blastomyces farciminosus (Bennet) — 1931