Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Leśny

mgr inż. Jakub Pałubicki

WPŁYW MIKOTOKSYN ZAWARTYCH W KUKURYDZY NA ROZRODCZOŚĆ DZIKÓW (*Sus scrofa* L.)

STRESZCZENIE

Praca doktorska wykonana w
Katedrze Łowiectwa i Ochrony Lasu
pod kierunkiem prof. dr hab. Lesława Łabudzkiego

Poznań 2016

Wstęp

Przyczyną podjęcia przedstawionych badań były coraz częściej obserwowane w populacjach dzików zaburzenia rozrodu. Praktycznie przez cały rok spotyka się lochy prowadzące pasiaki, co może dowodzić, że okres godowy trwa znacznie dłużej jak do tej pory zakładano. Dodatkowo coraz młodsze osobniki mają potomstwo, co z kolei mogłoby wskazywać na obniżenie wieku płodności. Przyczyn tego zjawiska zaczęto się dopatrywać w intensyfikacji uprawy kukurydzy i stałym wzroście obszaru przez nią zajmowanego. Niniejsza praca przedstawia związek pomiędzy wielkoobszarową uprawą kukurydzy, a wzmożoną rozrodczością dzików, co utrudnia racjonalne gospodarowanie ich populacjami. Zdaniem autora spowodowane mogło to być głównie poprawą bazy żerowej oraz zmianami klimatycznymi. Wielkoobszarowe łany kukurydzy dostarczają pokarmu i utrudniają pozyskanie zwierzyny podczas polowań, a wtórne metabolity grzybów pleśniowych występujących na kolbach mogą powodować zaburzenia, szczególnie w zakresie regulacji rozrodu.

Dzik – charakterystyka gatunku

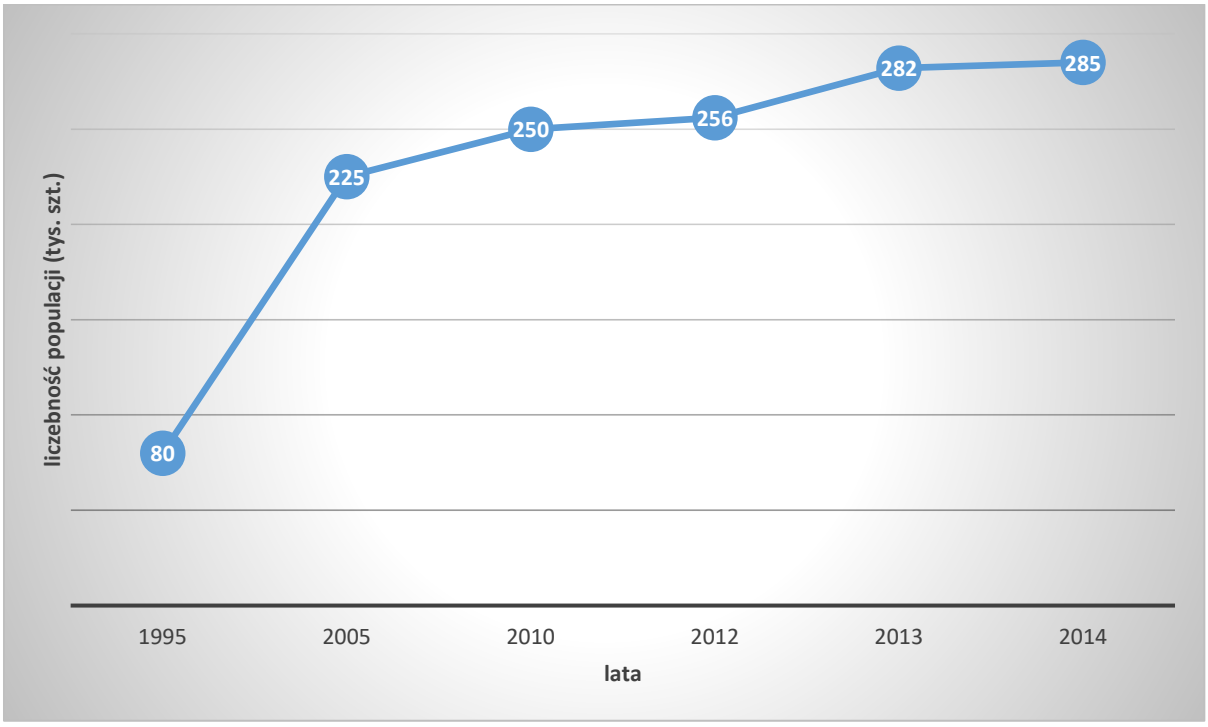
W Polsce dzik pospolity jest w całym kraju, a jego największe populacje spotykane są w części zachodniej i północnej. Pierwotnie głównym środowiskiem bytowania gatunku był las. Zasiedlał on wszystkie jego typy, najczęściej jednak lasy mieszane, ze szczególnym uwzględnieniem terenów obfitujące w mokradła i bagna w głębi większych kompleksów. Pola penetrowały dziki jedynie w nocy poszukując pożywienia, a podczas dnia zalegały w ostojach leśnych. Dzik jest głównie roślinożercą. Pokarm roślinny stanowi około 90 % udziału (w tym rośliny uprawne ok. 30%), a pokarm zwierzęcy około 10 %.

Znaczenie gospodarcze i walory łowieckie stawiają ten gatunek na czołowym miejscu wśród naszych zwierząt łownych. Wysoki przyrost naturalny stwarza myśliwym możliwość intensywnego użytkowania łowieckiego, a odpowiednia struktura pozyskania prowadzi do wyhodowania silnego i stabilnego stada podstawowego. Zgodnie z biologią gatunku ruja (huczka) powinna przypadać na miesiące późno jesienne i zimowe, ciąża trwa 108-120 dni, prawidłowy okres wyproszeń to marzec i kwiecień, przy czym lochy przystępują tylko raz w roku do rozrodu. Przedstawiona wzorcowa biologia gatunku ulega jednak ciągłym zmianom. Dzik ze zwierzęcia typowo leśnego staje się gatunkiem bytującym w większości na polach, głównie w dużych łanach zbóż, gdzie oprócz obfitej bazy żerowej znajduje schronienie aż do

zimy. Tylko okres najcięższych mrozów spędza w głębi lasu, a wraz z nastaniem wiosny wraca w pobliże swych letnio – jesiennych ostoi. Udział spożywanej roślinności uprawnej, w tym głównie kukurydzy, wzrasta z optymalnych 30% do ponad 70%. W wielkoobszarowych łanach kukurydzy dziki są aktywne cały dzień, ruja trwa od jesieni do późnej wiosny, udział w niej biorą już osobniki młodociane, a wyproszenia następują od zimy do lata.

Wraz ze zmianą biologii gatunku, można zaobserwować znaczący wzrost jego liczebności w naszym kraju z ok. 80 tys. osobników w roku 1995, do ok 285 tys. dzików w roku 2014. Niekontrolowane zwiększenie populacji prowadzi do narastającego konfliktu pomiędzy człowiekiem, a dzikiem który następuje na czterech płaszczyznach:

- wzrost szkód w uprawach rolnych,
- wzrost zagrożenia chorobami przenoszonymi przez dziki (obecnie szczególnie wirusowa choroba afrykańskiego pomoru świń),
- inwazja dzików na tereny zurbanizowane,
- zwiększenie ilości kolizji drogowych z udziałem omawianego gatunku.



Ryc. 1. Zmiany liczebności populacji dzików w wybranych latach z okresu 1995 – 2014

Kukurydza

Przyczyny wzrostu liczebności dzików mogą być dwojakie: brak wrogów naturalnych i zmiany w gospodarce rolnej, a w szczególności zwiększenie powierzchni zasiewów kukurydzy. Wielkoobszarowa uprawa kukurydzy, to czynnik, który wielostronnie oddziałuje na populacje gatunku, gdyż znacznie zwiększa bazę pokarmową, powoduje zmianę środowiska bytowania, a także może powodować zaburzenia hormonalne.

Na przestrzeni ostatnich 15 lat w Polsce, powierzchnia uprawy i plony kukurydzy na ziarno bardzo mocno się zwiększyły. W 2000 roku zbiory ziarna były na poziomie 923 tys. ton, a w 2014 roku wartość ta osiągnęła ok. 4,47 mln ton [GUS 2014]. Tym samym można stwierdzić, że żaden inny gatunek uprawiany w Polsce nie osiągnął w tak krótkim okresie ponad 400%-go wzrostu pod względem zbiorów. Wzrost plonów kukurydzy w ostatnich latach, związany jest bezpośrednio ze wzrostem areału jej uprawy. Zwiększa się zarówno powierzchnia kukurydzy uprawianej na zielonkę, jak i na ziarno. Na początku XXI wieku wartości te wynosiły łącznie ok. 300,000 ha, z tego prawie 50% z przeznaczeniem na ziarno, by w roku 2014 osiągnąć obszar ponad 1,000,000 ha, w tym 678,000 ha na ziarno i 541,000 ha na zielonkę.

Oddziaływanie wielkoobszarowych upraw kukurydzy na populacje dzików

Wraz z powiększaniem się areału i intensyfikacją uprawy wzrasta znaczenie gospodarcze chorób i szkodników kukurydzy. Szczególnie groźne są patogeny, które posiadają zdolność wytwarzania metabolitów drugorzędowych, czyli mikotoksyn. Warunki pogodowe występujące jesienią w naszej strefie klimatycznej sprzyjają rozwojowi grzybów pleśniowych na kolbach kukurydzy, należących przede wszystkim do rodzajów *Aspergillus, Penicillium i Fusarium*, które podczas rozwoju wydzielają mikotoksyny. Jednym z głównych metabolitów grzybów *Fusarium graminearum i Fusarium culmorum* (powodującymi zgniliznę kłosów i kolb) jest naturalny estrogen zearalenon (ZEN) nazywany również toksyną F2. Ta mikotoksyna produkowana jest przez grzyby pleśniowe występujące praktycznie na całym świecie, we wszystkich warunkach klimatycznych.

Estrogeny to ważna grupa hormonów steroidowych zaliczanych do tzw. hormonów płciowych. Nazywane są hormonami żeńskimi i najważniejszą rolę odgrywają w organizmach żeńskich, ale są też niezbędne dla osobników męskich – ich niedobór w jądrach może powodować bezpłodność. W organizmach żeńskich ich synteza zachodzi głównie w jajnikach podczas fazy pęcherzykowej, chociaż niewielkie ilości są też syntezowane w obszarze macicy

i łożyska oraz w nadnerczach. Wpływają one na wiele cech i funkcji organizmu, m.in. są odpowiedzialne za regulację cyklu rozrodczego. Szczególną rolę odgrywają w pierwszej jego fazie, kiedy to stymulują rozrost błony śluzowej macicy przygotowując ją do implantacji zarodka oraz wpływają na przyrost i zwiększenie pobudliwości mięśni gładkich (macicy i jajowodów).

Analizując, na podstawie obserwacji własnych, aktualną biologię dzików na uwagę zasługuje fakt, iż w okresie od września do grudnia praktycznie nie stwierdza się wyproszeń, a pierwsze warchlaki pojawiają się w styczniu. Może to świadczyć o wpływie pobieranego pokarmu na gotowość godową samic. Uwzględniając długość okresu ciąży, huczka praktycznie nie występuje od maja do września, czyli w okresie, gdy zapleśniały pokarm stanowi niewielki procent pobieranego pokarmu.

Ogólna charakterystyka grzybów rodzaju *Fusarium*

Grzyby rodzaju *Fusarium* należą do naturalnej mikroflory górnej warstwy gleby i poprzez aktywizację rozkładu biomasy odgrywają ważną rolę w naturalnym obiegu materii. Jednocześnie, jako patogeny negatywnie oddziałują na uprawy zbożowe powodując obniżenie jakości i wielkości plonów. Wtórnymi metabolitami grzybów pleśniowych są toksyczne związki zwane mikotoksynami, które jako produkty metabolizmu wtórnego grzybów pleśniowych, mogą powstawać w wielu płodach rolnych i to na różnych etapach, począwszy od fazy wzrostu roślin, przez zbiory, a także okres ich przechowywania. Szerokie spektrum działań toksycznych i zazwyczaj wysoka odporność na temperaturę sprawia, że ich obecność w żywności i paszach niesie ze sobą poważne zagrożenie dla zdrowia zarówno ludzi, jak i zwierząt, u których mogą powodować schorzenia zwane mikotoksykozami.

Ze znanych ponad 300 gatunków mikotoksyn, największe znaczenie, ze względu na powszechność występowania i specyfikę działania odgrywa zaledwie kilkanaście z nich. Najważniejsze mikotoksyny są wytwarzane przede wszystkim przez grzyby z rodzajów *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Mucor* oraz *Claviceps*. Największe znaczenie gospodarcze, spośród wymienionych rodzajów, mają wytwarzane z reguły w warunkach polowych, podczas wegetacji roślin toksyczne metabolity *Fusarium* spp, ze szczególnym uwzględnieniem zearalenonu.

Ogólna charakterystyka ZEN

Zearalenon to metabolit grzybów rodzaju *Fusarium*, działający estrogennie, nieposiadający struktury sterydowej. Mikotoksyna ta jest koloru białego, struktury krystalicznej, o temperaturze topnienia ok. 165°C, nierozpuszczalna w wodzie, ale rozpuszczalna w środowisku zasadowym i innych rozpuszczalnikach organicznych.
ZEN powszechnie występuje w zbożach, ze szczególnym uwzględnieniem kukurydzy. Biochemicznie jest to lakton kwasu 6 – (10 hydroksy-6 oksy-trans 1-undecenylobebeta-rezorcylowego), a nazwa łączy w sobie elementy dominującego występowania – „zea" – kukurydza (łac. *zea mays*), „ral" – lakton kwasu rezorcylowego (resorcylic acid lactone), „en" – dla olefinowego podwójnego wiązania, oraz „one" dla grupy ketonowej. Wiele gatunków grzybów rodzaju *Fusarium* jest głównymi patogenami roślin zbożowych powodujących fuzariozę kłosów czy kolb kukurydzy.

Zearalenon po podaniu doustnym wchłania się całkowicie. Następnie częściowo może być metabolizowany w świetle i ściankach przewodu pokarmowego oraz w wątrobie zwierząt monogastrycznych, w wyniku czego powstają mniej lub bardziej aktywne biologicznie metabolity. Określany jest mianem niesteroidowego estrogenu lub mikoestrogenu, ze względu na swoje estrogenne właściwości, a jego pochodne, mogą wykazywać dziesięciokrotnie wyższe działanie estrogenne jak sam ZEN. Głównymi metabolitami biotransformacji są: zearalanon (ZAN), α – zearalenol (αZOL), β – zearalenol (βZOL), α – zearalanol (αZAL), β – zearalanol (βZAL). Zearalenon jest szybko wchłaniany z przewodu pokarmowego i metabolizowany. U zwierząt istnieją dwie podstawowe drogi biotransformacji ZEN. Pierwsza to hydroksylacja, w wyniku której formuje się α – ZOL oraz β – ZOL, druga to sprzęganie ZEN z kwasem glukuronowym. Zearalenon i jego metabolity mogą wywoływać zmiany profilu metabolicznego komórek sterydozależnych, jak np. komórki ziarniste muralne pęcherzyka jajnikowego. Toksyczność ostra ZEN jest niska, natomiast długotrwałe narażenie na związek powoduje zaburzenia płodności prowadzące w konsekwencji do hiperestrogenizmu.
Zearalenon jest fitoestrogenem wskazującym, ze względu na obecność pierścienia fenolowego w jego budowie chemicznej, na aktywność i powinowactwo do obu estrogenowych receptorów ERα i ERβ, obecnych w tkankach ssaków. Powoduje on zmiany funkcjonalne w układzie rozrodczym, przy czym działanie estrogenne ZEN jest kilka razy silniejsze jak w przypadku naturalnie występujących estrogenów.

Zearalenon, dostarczany do organizmu, jako naturalny estrogen, stopniowo i w niewielkich dawkach powoduje zaburzenia płodności i cyklu rozrodczego m.in. przez spowolnienie i

przedłużenie owulacji. W przypadku dzików może to powodować sytuację, w której samice są gotowe do zapłodnienia przez większą część roku, co bezpośrednio wpływa na wydłużenie okresu rui. Dodatkowo narażenie na zearalenon może być przyczyną przedwczesnego dojrzewania osobników żeńskich. W przypadku populacji dzików fakt ten można połączyć z badaniami przeprowadzonymi w Wyższej Szkole Weterynarii (TIHO) w Hanowerze, które dowodzą, że ponad 80% urodzonych każdego roku warchlaków ma matki, które same są jeszcze warchlakami lub przelatkami. Przekłada się to bezpośrednio na wzrost pogłowia, gdyż od czteroletniej lochy możemy w okresie jej płodności oczekiwać jeszcze ok. 40 warchlaków, a od przelatkowej loszki nawet 80 sztuk.

Badania nad wpływem zearalenonu na organizm dzików nie są obecnie zbyt zaawansowane. Jak do tej pory bardzo niewiele badań dotyczyło wpływu mikotoksyn na populacje dzików. Jednak z uwagi na fakt, że jest on protoplastą świni domowej, co odzwierciedla się zarówno w budowie zewnętrznej jak i wewnętrznej, ale przede wszystkim w przynależności systematycznej badania nad trzodą chlewną w zakresie negatywnego oddziaływania ZEN i jego pochodnych na układ rozrodczy świni można odnieść do populacji dzików. Stopień dojrzałości płciowej czy faza cyklu rujowego determinuje w gonadach zmiany o różnorodnym charakterze, w tym również zwiększenie lub zmniejszenie liczby pęcherzyków jajnikowych. Zmiany w morfologii gonad zaobserwowane po intoksykacji loszek zearalenonem wskazały na pęcherzyki jajnikowe jako docelowe struktury oddziaływania ZEN w tym narządzie, przy czym młode loszki są bardziej wrażliwe niż maciory. Według danych literaturowych oddziaływanie ZEN podczas okresu płodowego ogranicza ilość pęcherzyków jajnikowych, czego efektem może być przedwczesne wyczerpnie się ich puli, co może wpływać na ograniczoną wielkość miotu.

Cel i zakres pracy

Mikotoksyną mającą największy wpływ na układ rozrodczy i cykl rujowy jest bez wątpienia ZEN. Dlatego chcąc potwierdzić, że głównym źródłem dostarczanego do organizmu dzików zearalenonu są kolby kukurydzy, często zapleśniałe z dużą ilością patogenów grzybowych przeprowadzono badania, których celem było porównanie zawartości ZEN i jego pochodnych w narządach, tkankach i płynach ustrojowych (krew, żółć, wątroba, nerki, mięśnie, mocz, treść żołądka, treść jelita grubego i jajnik) loszek dzików. Były one pozyskane w terenach wielkoobszarowych zasiewów kukurydzy (ponad kilkaset ha) oraz w zwartych kompleksach leśnych, o powierzchni powyżej kilku tysięcy ha, gdzie w promieniu kilku

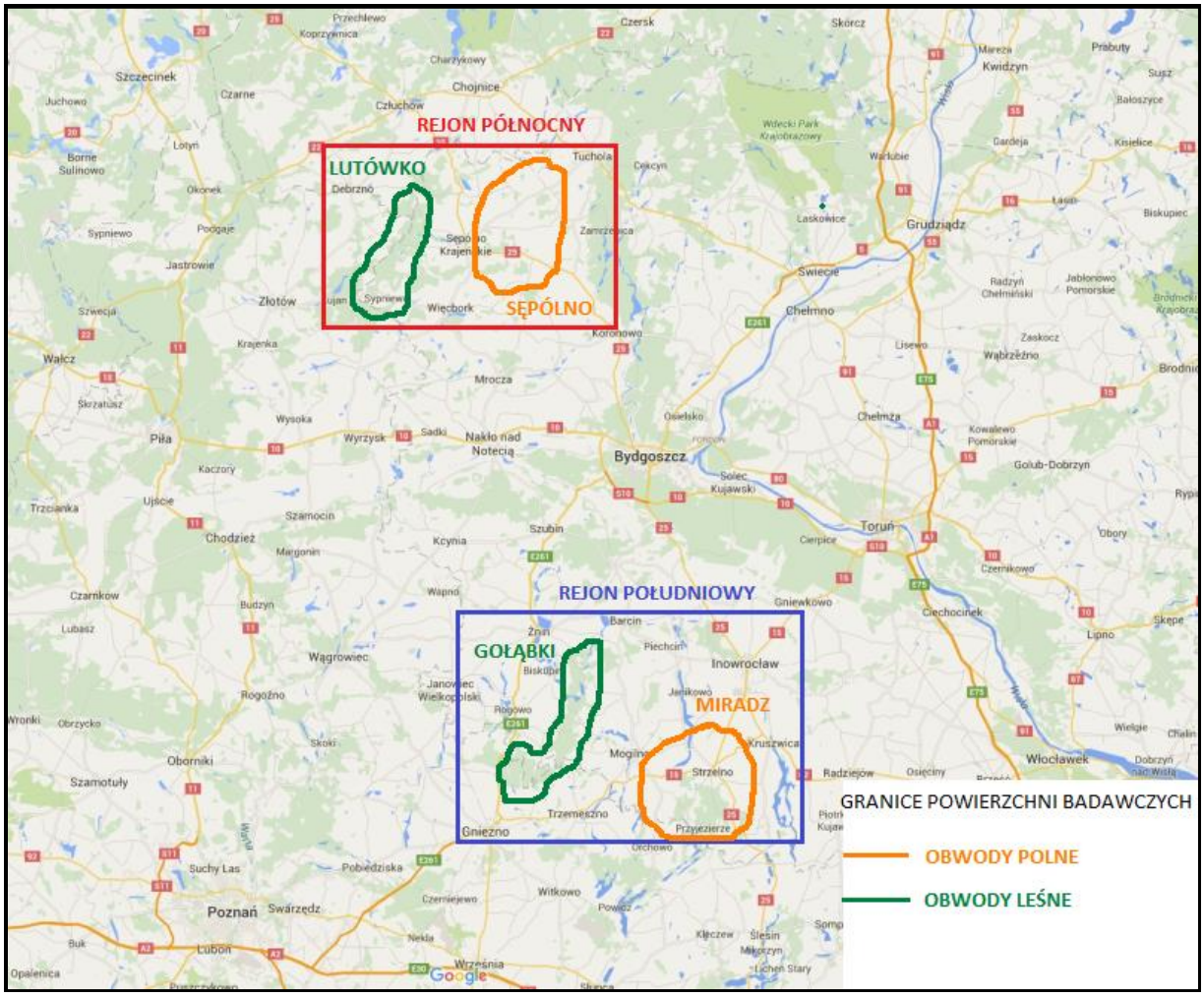
kilometrów od granicy lasu nie było wielkoobszarowych upraw kukurydzy, a dziki żywiły się głównie tym, co znalazły w lesie (łącznie z paszą z karmowisk) oraz na terenach bezpośrednio do niego przyległych. W przedmiotowych badaniach porównano również ilość pierwotnych i wtórnych pęcherzyków jajnikowych loszek dzików w zależności od środowiska ich bytowania oraz przeprowadzono analizę zmian liczebności populacji dzików na obszarach objętych badaniami.

Fot. 1. Zapleśniała kolba kukurydzy zainfekowana grzybami z rodzaju *Fusarium*

Próbki pochodzenia zwierzęcego

Materiał do badań stanowiły próbki krwi, żółci, moczu, mięśni, jajników, wątroby, nerek, treści żołądka i kału pobrane od loszek dzików w drugim roku życia (przelatków) o masie tuszy 40 – 60 kg pozyskanych w okresie od listopada 2011 do lutego 2014 roku, podczas polowań w obwodach łowieckich leżących na terenie bydgoskiego okręgu PZŁ. Wybrano dwa rejony badań, w północnej i południowej części regionu oraz zgodnie z przyjętymi założeniami, wyznaczono w ich granicach powierzchnie badawcze, które podzielono na dwie kategorie:
– obwody polne – tereny bez zwartych kompleksów leśnych z powszechnie spotykaną wielkoobszarową uprawą kukurydzy. Pierwszą powierzchnię badawczą, znajdującą się w północnej części województwa stanowiły obwody łowieckie: nr 48, 56 i 75 położone na terenie Nadleśnictwa Runowo, we wschodniej części powiatu sępoleńskiego (oznaczone jako Sępólno). Drugą powierzchnię badawczą, znajdującą się w południowej części regionu,

tworzyły: obwód łowiecki nr 243 i nr 254, leżące na terenie Nadleśnictwa Miradz, w centralnej części powiatu mogileńskiego w okolicach miejscowości Strzelno (oznaczone jako Miradz);
– obwody leśne – tereny ze zwartymi kompleksami leśnymi w pobliżu których nie było wielkoobszarowych upraw kukurydzy. Pierwszą powierzchnię badawczą, położoną w północnej części województwa stanowił obwód łowiecki nr 35, obejmujący zachodnią część lasów Nadleśnictwa Lutówko (oznaczony jako Lutówko). Druga powierzchnia badawcza leżąca w południowej części regionu obejmowała obwody łowieckie nr 228 i 244 znajdujące się na terenie Nadleśnictwa Gołąbki (oznaczone jako Gołąbki).



Ryc. 2. Lokalizacja poszczególnych powierzchni badawczych

Pasze z miejsc dokarmiania – obwód leśny

Pasze z karmowisk w obwodach leśnych badane były w sezonie 2011/2012. W każdym z rejonów wyznaczono po trzy nęciska, na które pasza treściwa dostarczana była regularnie, co tydzień w ilości kilkunastu kg. Próbki wysuszonego ziarna kukurydzy oraz owsa (po ok. 0,5

kg) z miejsc sezonowego dokarmiania zwierzyny pobrano losowo w trzech powtórzeniach, w odstępach jednego miesiąca (od połowy listopada do połowy stycznia). Periodyczność wykładania oraz stosunkowo niewielka ilość sprawia, że karma była regularnie zjadana, przez co nie zalegała w terenie, w efekcie czego nie powinna podlegać negatywnym oddziaływaniom czynników środowiskowych.

Ziarno kukurydzy – obwód polny

W sezonie 2011/2012 w terenach określonych jako obwód polny przeprowadzono analizę ziarna kukurydzy (pobranego bezpośrednio z kolb) pod kątem zawartości mikotoksyn. Na każdej powierzchni badawczej wybrano losowo wielkoobszarowy łan kukurydzy, z którego pobrano pięć razy po 10 kolb w następujących terminach:
- październik – kolby pobrane losowo z rosnących jeszcze roślin;
- listopad – kolby pobrane losowo ze ścierniska;
- grudzień, marzec, kwiecień – zakopane kolby pobrane z wyznaczonych poletek kontrolnych.

W styczniu i lutym nie pobierano próbek kolb kukurydzy, ponieważ ich wykopanie uniemożliwiła zamarznięta ziemia.

Liczebność populacji

W celu porównania rozrodczości dzików, z czym bezpośrednio związany jest przyrost populacji, przeanalizowano na podstawie rocznych planów łowieckich sporządzonych dla obwodów nr 35, 48, 56, 75, 228, 243, 244 oraz 254 liczebność wg stanu na dzień 10.03 i pozyskanie gatunku w sezonach łowieckich 2010/2011 – 2014/2015.

Przebieg tworzenia kolekcji prób

Badaniami objęto łącznie 91 dzików pozyskanych w sezonach łowieckich 2011/2012 – 2013/2014 oraz próbki materiału roślinnego pobranego w sezonie 2011/2012.

Pobrany materiał (kolby kukurydzy, pasza z miejsc dokarmiania, oraz materiał zwierzęcy) został dostarczony do Laboratorium Badawczego Mikotoksyn UKW w Bydgoszczy, gdzie rozpoczęto etap ekstrakcji i analiz. Dodatkowo próbki jajnika przekazano do Zakładu Patomorfologii Klinicznej CM UMK w Bydgoszczy w celu wykonania badań histologicznych.

Metody analiz określające zawartość mikotoksyn

Badania przeprowadzono z zachowaniem wszelkich obowiązujących standardów przy wykorzystaniu najnowszych metod. Schemat poszczególnych etapów badań pozwalających określić zawartość mikotoksyn w badanym materiale przedstawia się następująco:

HOMOGENIZACJA ⟹ EKSTRAKCJA ⟹ OSUSZANIE ⟹ CHROMATOGRAF

Zgodnie z ogólnymi założeniami analizy mikotoksykologicznej, przed przystąpieniem do badań należy zmielić większe fragmeny próbki (np. koby lub ziarno) przy pomocy młynka. Następnie odważa się odpowiednią ilość analizowanej substancji, którą z dodanym metanolem homogenizuje się, aby związki z fazy stałej przeszły do frakcji płynnej. Otrzymaną zawiesinę przesącza się przez sączki karbowane, a uzyskany roztwór podlega ekstrakcji na kolumienkach powinowactwa immonulogicznego, które są swoistym złożem przeciwciał i pełnią rolę filtra. Podczas przedmiotowych badań odpowiednio dobrany wzorzec spowodował, że zearalenon i jego pochodne zatrzymały się w kolumience, a pozostałe związki przepłynęły przez nią. Następnie analizowane metabolity wypłukuje się z filtra metanolem, a otrzymany przesącz trafia do fiolek i odparowywany jest w strumieniu azotu o temp. 40 – 50°C. Tak przygotowany ekstrakt trafia na chromatograf, który pozwala określić zawartość poszczególnych związków.

Ocena histologiczna materiału zwierzęcego

Z dostarczonych do badań fragmentów jajnika wraz z jajowodem pobrano łącznie 36 wycinków tkankowych, które umieszczono w jałowych pojemnikach i utrwalono przez 24 godziny w 10% roztworze formaliny. Ocenę mikroskopowa liczby pęcherzyków pierwotnych w jajnikach przeprowadzono przy czterdziestokrotnym powiększeniu obiektywu w trzech polach widzenia, wybierając do badań obszary charakteryzujące się najwyższą liczbą pęcherzyków w każdym kolejnym badanym jajniku.

Analiza statystyczna

Dane dotyczące zawartości każdego metabolitu w poszczególnych narządach, tkankach, płynach ustrojowych oraz w treści żołądka i kale dzików zostały sprawdzone pod względem

zgodności rozkładów z rozkładem normalnym za pomocą testu Shapiro-Wilka 'W' w poszczególnych grupach obiektowych.

Wyniki analizy zawartości mikotoksyn w kukurydzy i paszach z miejsc dokarmiania

W badanym materiale roślinnym wykryto kilka wtórnych metabolitów pleśni o bardzo zróżnicowanym stężeniu, jednak zgodnie z ogólną charakterystyką mikotoksyn zaburzenia hormonalne u zwierząt (mające bezpośredni wpływ na rozrodczość) wywołuje ZEN, dlatego też różnice w zawartości tej mikotoksyny poddano dalszej analizie. Jak wskazują uzyskane wyniki w obwodzie polnym skażenie kukurydzy zearalenonem było najniższe w październiku. Wraz z upływem czasu zawartość tej mikotoksyny stopniowo rosła, by w grudniu osiągnąć wartość najwyższą i stężenie ponad 11 razy większe niż na początku analizowanego okresu. Następnie do wiosny zawartość ZEN stopniowo malała, jednak zdecydowanie wolniej, jak odnotowany pomiędzy październikiem a grudniem wzrost, o czym świadczy tylko o ok. 20% niższy poziom mikoestrogenu na końcu analizowanego okresu. Spowodowane jest to najprawdopodobniej procesami biodegradacji ziarna kukurydzy prowadzącymi do jego biologicznego rozkładu.

Zawartość zearalenonu w ziarnie kukurydzy pochodzącym z miejsc dokarmiania w lesie była wyraźnie niższa jak w terenie polnym (odpowiednio o ok. 135. – krotnie mniejsza od wartości w październiku i aż ok. 1553 razy mniejsza od wartości maksymalnej). Wyższą zawartością ZEN wykazał się wykładany w lesie owies, jednak i tu stężenie tej mikotoksyny było odpowiednio 4. i 340. – krotnie niższe jak skrajne zawartości odnotowane w ziarnie kukurydzy pobranej prosto z pola.

Zawartość poszczególnych metabolitów w próbkach pochodzenia zwierzęcego

Uzyskane wyniki badań własnych dowodzą, że ZEN występował w zdecydowanej większości analizowanych próbek jajnika, krwi, żółci, wątroby, nerek, mięśni, moczu, kału i treści żołądka – pobranych zarówno z terenów polnych jak i leśnych, jednak różnice w jego stężeniu były znaczne i w obrębie badanego płynu, narządu lub tkanki zależały głównie od środowiska bytowania. Najwyższe stężenia analizowanych związków (dochodzące do 20 ng/ml) odnotowano w moczu i żółci. Zdecydowanie mniejsze wartości prezentowały analizowane tkanki, organy i narządy (nie przekraczające 1 ng/g). Pośrednie wartości były w treści żołądka i w kale. Przedstawione wyniki dowodzą, że ZEN i jego metabolity są

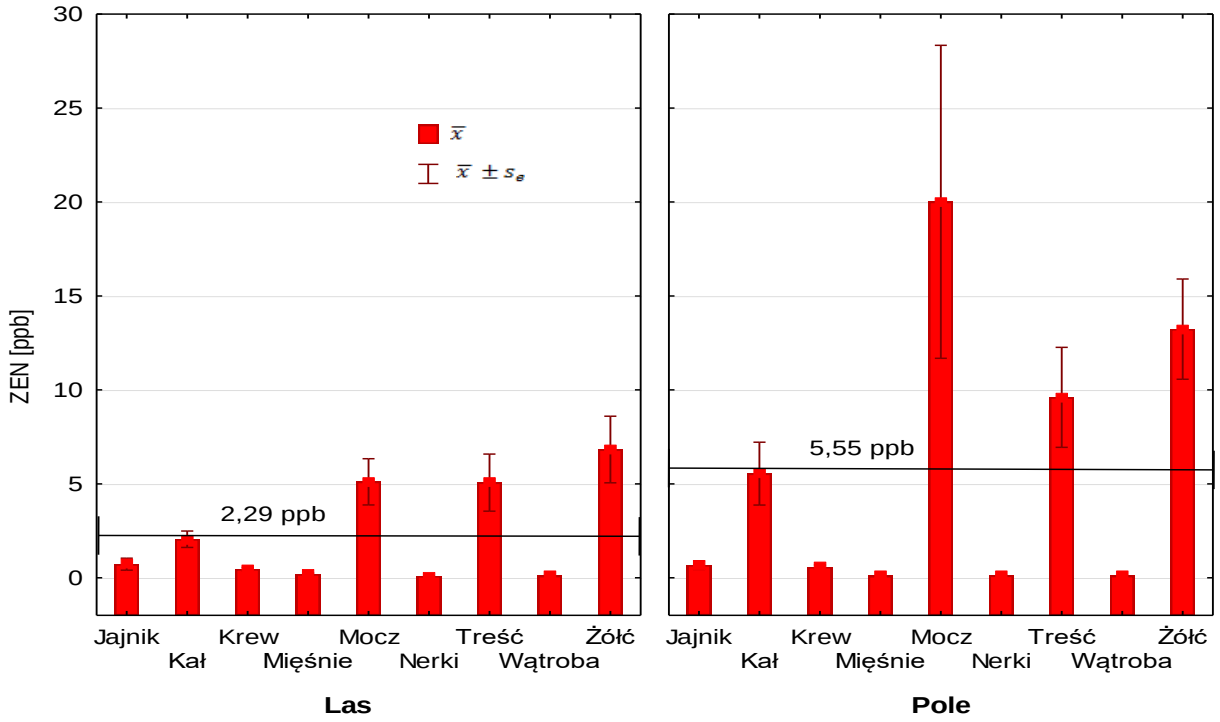
stosunkowo szybko wydalane z organizmu, a stopień przeniesienia (carry – over factor) mikotoksyn do tkanek jest niewielki.

Praktycznie we wszystkich analizowanych przypadkach większe stężenie zearalenonu występowało w analitach pobranych z dzików bytujących w terenach polnych, choć procentowy jego udział we wszystkich analizowanych próbkach był w obu siedliskach podobny. W obwodzie polnym ZEN wykryto w 85,4% przebadanych próbek, a najczęściej wykrywaną pochodną był α ZAL oznaczony w 38,8% analiz. Wykrywalność pozostałych pochodnych stopniowo malała i wynosiła odpowiednio dla ZAN 24,1%, β ZOL 14,4%, α ZAL 2% i β ZAL 1,1% wszystkich przeanalizowanych próbek. W obwodzie leśnym ZEN wykryto w 82,8% przebadanych próbek, a najczęściej wykrywaną pochodną był również α ZAL oznaczony w 44,2% analiz. Wykrywalność pozostałych pochodnych stopniowo malała i wynosiła odpowiednio dla ZAN 24,3%, β ZOL 18,6%, α ZAL 3,1% i β ZAL 1,1% wszystkich przeanalizowanych próbek. Procentowy udział zearalenonu i jego metabolitów oznaczonych we wszystkich analizowanych próbkach jest zbliżony dla obu porównywanych biotopów dzików, co wskazuje na powszechne występowanie tej mikotoksyny w środowisku. Jednak średnie zawartości ZEN i jego pochodnych są wyższe w obwodzie polnym, co może potwierdzać tezę, że dziki bytujące i żerujące w obwodach z wielkoobszarową uprawą kukurydzy, pobierają wraz z pokarmem zdecydowanie więcej mikoestrogenu zearalenonu, który wraz z metabolitami wykrywany jest w narządach, tkankach i płynach ustrojowych.

U zwierząt bytujących w lesie średnia zawartość ZEN w organach, tkankach i płynach ustrojowych wyniosła 2,29 ppb a u zwierząt związanych z polem 5,55 ppb. Podobnie średnia sumarycznej zawartość pochodnych ZEN w analizowanym materiale zwierzęcym była wyższa u osobników związanych z terenem polnym i wynosiła 2,17 ppb, przy średniej zawartości w terenie leśnym na poziomie 1,43 ppb. Analizując szczegółowo wartości poszczególnych metabolitów można zaobserwować, że w przypadku ZAN, α i β ZOL oraz β ZAL również ich średnia zawartość była wyższa w próbkach pochodzących z terenów polnych. Wyjątek stanowi tylko średnia zawartość pochodnej α ZAL, która to jest nieznacznie wyższa w analizowanych próbkach pochodzących z obszarów leśnych.

Spośród wszystkich pobranych do badań narządów, tkanek, wydzielin i płynów ustrojowych dzików, ich mocz wykazał się największym zróżnicowaniem ze względu na kolejny rok badań i siedlisko bytowania oraz współzależność pomiędzy rokiem a siedliskiem. Analiza statystyczna zawartości ZEN w moczu loszek wykazała wysoce istotny wpływ roku badań (F=8,07, p=0,001), siedliska bytowania (F=4,62, p=0,03) oraz współdziałania pomiędzy okresem badań a siedliskiem (F=5,61, p=0,005). W pierwszym roku zawartość ZEN była

istotnie najwyższa i wyniosła średnio 41,3 ng/ml, po czym w kolejnych latach malała (100. – krotnie w drugim i 9. – krotnie w trzecim roku badań). Środowisko bytowania dzików wpłynęło na to, że u osobników, które częściej żerowały na polach, poziom ZEN w moczu wyniósł średnio 20,0 ng/ml, a dzików bytujących w lesie 5,11 ng/ml. Zdecydowanie najwyższą zawartość ZEN w moczu wykryto w pierwszym roku badań u osobnika, który żerował na polach – 69,0 ng/ml, a istotnie mniejszą wykryto u tych, które w tym roku były w lesie – 9,07 ng/ml. W roku drugim, jednakowo niskie stężenie było w moczu w obydwu grupach dzików, a w trzecim roku różnice nie zostały statystycznie potwierdzone.

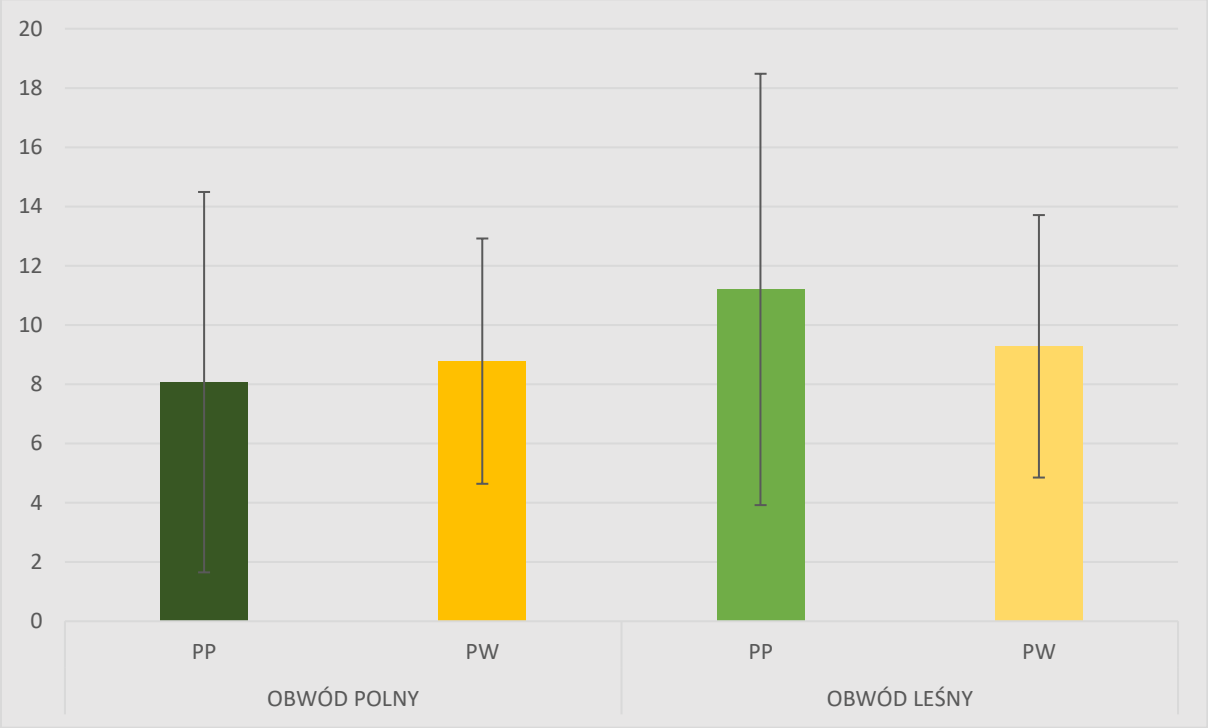


Ryc. 3. Zawartość ZEN [ppb] w poszczególnych analitach pobranych z dzików oraz średnia dla nich wszystkich u zwierząt związanych z siedliskiem lasu *vs.* pole. Statystyka *t*-Studenta = 2,62, *p*=0,009, *df* = 817

Wyniki oceny histologicznej materiału zwierzęcego

Ocena histologiczna obejmowała liczbę pęcherzyków pierwotnych i wtórnych. W analizowanych fragmentach jajnika loszek dzików pochodzących z terenów leśnych średnia ilość pęcherzyków pierwotnych była o ok. 38% wyższa jak ich ilość u osobników z terenów polnych. Różnica ta jednak zmalała ponad 7.5 – krotnie w przypadku pęcherzyków wtórnych i wynosiła ok. 5%. Dowodzi to, że w terenach polnych procentowo więcej pęcherzyków

pierwotnych przekształca się w pęcherzyki wtórne. Może to powodować sytuację, w której samice są przez dłuższy okres gotowe do zapłodnienia, co przekłada się bezpośrednio na wydłużenie rui. Dodatkowo uwzględniając fakt, że liczba pęcherzyków pierwotnych jest w organizmie z góry określona, już w momencie urodzenia, to mniejsza ilość w jajniku może wskazywać, że ich eksploatacja następuje wcześniej w organizmach dzików bytujących w terenach polnych. Zwiększona ilość wtórnych metabolitów grzybów pleśniowych istotnie wpływa na regulację cyklu, co skutkuje zarówno wchodzeniem do rozrodu młodocianych loszek jak i w terminie nieoptymalnym dla dzików. Prawdopodobny mechanizm tego procesu polega na wiązaniu się mikotoksym z receptorami estrogenowymi i w następstwie uruchomienie całej kaskady hormonalnej, która w efekcie powoduje zwiększenie ilości pęcherzyków wtórnych.



Ryc. 4. Średnie ilości pęcherzyków pierwotnych (PP) oraz wtórnych (PW) w jajnikach dzików w zależności od środowiska bytowania

Łącząc powyższe informacje z uzyskanymi wynikami badań, w których wyższe stężenie ZEN i jego pochodnych odnotowano w organizmach dzików pochodzących z terenów polnych, można stwierdzić, że mikotoksyny zawarte w kukurydzy mogą być przyczyną zaburzeń hormonalnych prowadzących do zwiększonej rozrodczości dzików bytujących w pobliżu wielkoobszarowych upraw kukurydzy.

Analiza zmian liczebności populacji dzików na obszarach objętymi badaniami

Podstawowym materiałem do przeprowadzenia tej części badań były informacje dotyczące stanu i pozyskania dzików w sezonach 2010/2011 – 2014/2015, które pochodziły z rocznych planów łowieckich dla obwodów 35, 48, 56, 75, 228, 243, 244, 254. Zgodnie z przyjętymi założeniami porównania dynamiki rozwoju populacji dokonano, zarówno w poszczególnych rejonach, jak i pomiędzy powierzchniami badawczymi.

Przeprowadzona analiza dynamiki rozwoju populacji dzików występujących na wyznaczonych powierzchniach badawczych wykazała zdecydowany wzrost liczebności gatunku w obwodach polnych, chociaż jak wynika z rocznych planów łowieckich w obu przypadkach dążono do jej ograniczenia, poprzez pozyskanie wyższe, niż zakładany przyrost potencjalny. W przypadku Sępólna przy średnim przyroście planowanym na poziomie 114 % pozyskiwano średnio 123% stanu wiosennego, a w Miradzu przy średnim potencjalnym przyroście wynoszącym 120%, średnia pozyskania wynosiła 139% liczebności na dzień 10.03.

W analizowanym okresie nastąpiło jednoczesne zmniejszeniu udziału dzików z populacji leśnej. W rejonie północnym pomimo pozyskania na poziomie 114% stanu wiosennego, czyli nieznacznie mniejszym jak planowany przyrost – 118%, nastąpił spadek liczebności dzików o ponad 30%. Tylko w przypadku leśnej powierzchni badawczej oznaczonej jako Gołąbki, populacja dzików cechowała się stabilną liczebnością. Średnia pozyskania wynosząca 112% przy założonym średnim przyroście na poziomie 114% stanu populacji w dniu 10.03, spowodowała bardzo nieznaczny jej wzrost.

Prawdopodobną przyczyną analizowanych zmian liczebności może być przyrost zrealizowany, inny niż zakładany w planach łowieckich przyrost potencjalny i związana z tym bezpośrednio wielkość pozyskania. Chcąc określić przyrost zrealizowany w poszczególnych obwodach, porównano liczebność na początku i końcu danego sezonu z uwzględnieniem ilości pozyskanych dzików. Zgodnie z powszechnymi założeniami stan na koniec okresu polowań równa się liczebności na początku sezonu zwiększonej o przyrost zrealizowany i pomniejszonej o wielkość pozyskania (odstrzał i ubytki), co przyjmuje postać równania:

przyrost zrealizowany = (stan 10.03 roku następnego + pozyskanie – stan 10.03)/stan 10.03.

W obwodzie polnym rejonu północnego (Sępólno) pomiędzy 10.03.2010 r. i 10.03.2015 przy średnim przyroście potencjalnym wynoszącym 114% stanu populacji w dniu inwentaryzacji i średnim rocznym pozyskaniu na poziomie 123% stanu wiosennego liczebność gatunku wzrosła

o 35%, a średni przyrost zrealizowany wyniósł 131% i zawierał się w przedziale od 97% w sezonie 2012/2013 do 157% w sezonie 2013/2014. Uzyskane wyniki badań nad dynamiką rozwoju populacji dowodzą, że przyrost zrealizowany był średnio o 14% wyższy jak zakładany przyrost potencjalny, co mogło być jedną z głównych przyczyn, które doprowadziły do wzrostu liczebności dzików na tym terenie.

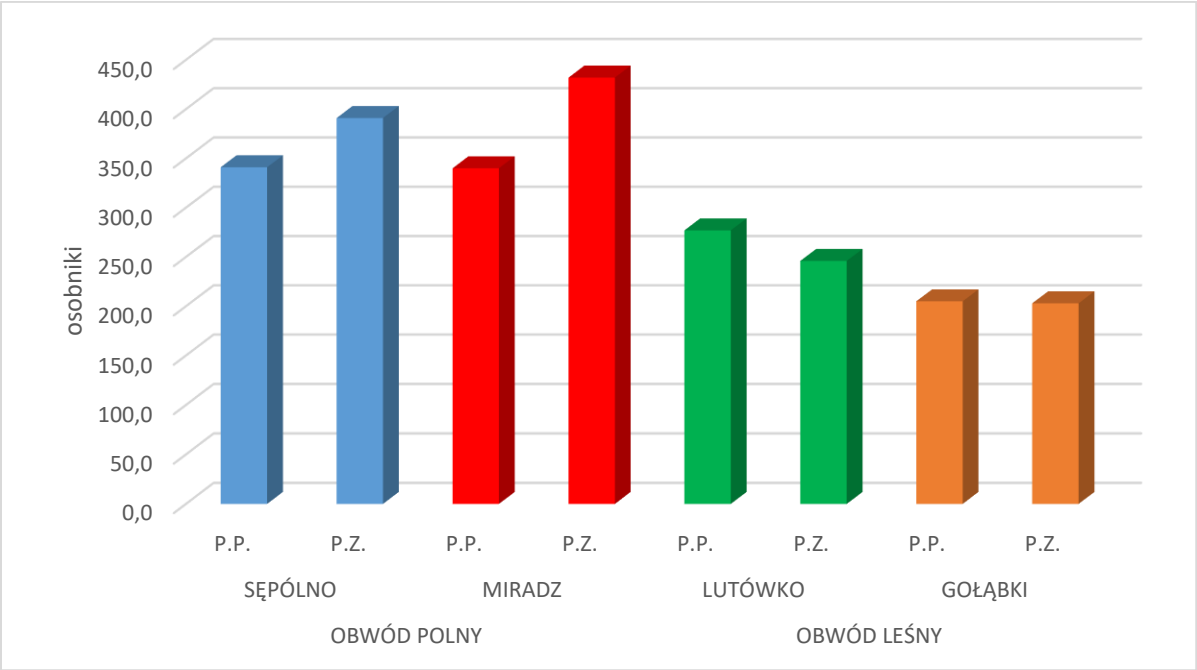
W obwodzie polnym rejonu południowego (Miradz) pomiędzy 10.03.2010 r. i 10.03.2015 r. przy średnim przyroście potencjalnym i średnim rocznym pozyskaniu na jednakowym poziomie wynoszącym 120% stanu populacji w dniu inwentaryzacji liczebność gatunku wzrosła o 67%, a średni przyrost zrealizowany wyniósł 153% i zawierał się w przedziale od 92% w sezonie 2011/2012 do 183% w sezonie 2013/2014. Uzyskane wyniki badań nad dynamiką rozwoju populacji dowodzą, że przyrost zrealizowany był średnio o 27% wyższy jak zakładany przyrost potencjalny, co mogło być jedną z głównych przyczyn które doprowadziły do wzrostu liczebności dzików na tym terenie.

W obwodzie leśnym rejonu północnego (Lutówko) pomiędzy 10.03.2010 r. i 10.03.2015 r. przy średnim przyroście potencjalnym wynoszącym 122% stanu populacji w dniu inwentaryzacji i średnim rocznym pozyskaniu na poziomie 97% stanu wiosennego, liczebność gatunku zmalała o 33%, a średni przyrost zrealizowany wyniósł 106% i zawierał się z w przedziale od 83% w sezonie 2012/2013 do 150% w sezonie 2014/2015. Uzyskane wyniki badań pozwalają stwierdzić, że przyrost zrealizowany był średnio o 13% niższy jak zakładany przyrost potencjalny, co mogło być jedną z głównych przyczyn, które doprowadziły do spadku liczebności populacji na tym terenie.

W obwodzie leśnym rejonu południowego (Gołąbki) pomiędzy 10.03.2010 r. i 10.03.2015 r. przy średnim przyroście potencjalnym wynoszącym 112% stanu populacji w dniu inwentaryzacji i średnim rocznym pozyskaniu na poziomie 100% stanu wiosennego liczebność gatunku wzrosła o 2%, a średni przyrost zrealizowany wyniósł 114% i zawierał się w przedziale od 52% w sezonie 2011/2012 do 200% w sezonie 2010/2011. Uzyskane wyniki badań świadczą, że przyrost zrealizowany na poziomie 102% przyrostu potencjalnego spowodował nieznaczną zmianę liczebności populacji wynoszącą zaledwie 2%.

Przeprowadzona analiza dynamiki rozwoju populacji dzików na wybranych powierzchniach badawczych wskazuje, że główną przyczyną zmian liczebności były najprawdopodobniej różnice pomiędzy zakładanym przyrostem potencjalnym, a przyrostem zrealizowanym danej populacji. W przypadku obu powierzchni badawczych oznaczonych jako obwód polny przyrost zrealizowany był wyższy jak zakładany, co doprowadziło do kilkudziesięcioprocentowego wzrostu liczebności dzików na tym terenie. W obwodzie leśnym

oznaczonym jako Lutówko zawyżony przyrost potencjalny doprowadził do spadku liczebności, a w przypadku Gołąbek zbliżone przyrosty pozwoliły utrzymać populację na stabilnym poziomie.



Ryc. 5. Średnie wartości przyrostu potencjalnego (P.P.) i przyrostu zrealizowanego (P.Z.) dla poszczególnych powierzchni badawczych w sezonach 2010/2011 – 2014/2015

Podsumowanie wyników badań

Wysokoenergetyczna baza pokarmowa oraz bezpieczne schronienie w wielkoobszarowych łanach to bez wątpienia czynniki sprzyjające rozwojowi populacji, jednak nie wpływające bezpośrednio na płodność. Przytoczone powyżej wyniki badań własnych wskazały, że wraz z pobieranym ziarnem kukurydzy dziki dostarczają do swego organizmu mikotoksyny fuzaryjne i to właśnie one mogą powodować zaburzenia hormonalne. Powiązanie tych czynników sprawia, że dziki bytujące w terenach polnych mają przez większą część roku dogodne warunki do wyprowadzenia potomstwa, co w powiązaniu z zaburzeniami rozrodu może być bezpośrednią przyczyną wydłużenia okresu godowego i wzrostu liczebności gatunku. Powyższe potwierdza analiza dynamiki rozwoju populacji dzików zajmujących różne biotopy. Jak dowiodły badania autorskie, przyrost zrealizowany u osobników występujących w terenach polnych z powszechną wielkołanową uprawą kukurydzy jest o ok. 30% wyższy, jak u dzików

bytujących w zwartych kompleksach leśnych. Potwierdza to założoną hipotezę, że mikotoksyny zawarte w kukurydzy, które wraz z pobieranym pokarmem przedostają się do organizmów dzików mogą wpływać na rozrodczość powodując zwiększony przyrost gatunku.

KONKLUZJA

1. Kukurydza to roślina, która może wielostronnie oddziaływać na populacje dzików. Jej wielkoobszarowe uprawy znacząco zwiększają wysokoenergetyczną bazę pokarmową i zapewniają bezpieczne schronienie zwierzętom aż do późnej jesieni. Dodatkowo warunki pogodowe naszej strefy klimatycznej sprzyjają rozwojowi grzybów pleśniowych z rodzaju *Fusarium* (zasiedlających kolby kukurydzy) i powstawaniu ich wtórnych metabolitów – mikotoksyn, zaliczanych do grupy mikoestrogenów lub estrogenów środowiskowych.
2. Estrogeny środowiskowe są zaliczane do związków określanych jako EDs (endocrine disrupters), które mogą w zasadniczy sposób wpływać na procesy życiowe wielu organizmów w tym prowadzić do zaburzeń hormonalnych.
3. Przeprowadzone badania własne wykazały, że zawartość zearalenonu w ziarnie kukurydzy pobranym z pola w kwietniu jest kilkakrotnie wyższa jak w październiku. Świadczy to o tym, że przyoranie kolb nie hamuje dalszego powstawania mikotoksyn, lecz powoduje wzrost ich zawartości, co stanowi istotne źródło potencjalego zagrożenia dla dzików.
4. Zearalenon występował w zdecydowanej większości, analizowanych podczas badań własnych, próbek jajnika, krwi, żółci, wątroby, nerek, mięśni, moczu, kału i treści żołądka – pobranych zarówno z terenów polnych jak i leśnych, jednak różnice w jego stężeniu były znaczne i w obrębie badanego płynu, narządu lub tkanki zależały głównie od środowiska bytowania.
5. Procentowy udział zearalenonu i jego metabolitów oznaczonych we wszystkich analizowanych podczas badań własnych próbkach jest zbliżony dla obwodów polnych i leśnych, co wskazuje na powszechne występowanie tej mikotoksyny w środowisku.
6. Średnie poziomy zawartości zearalenonu i jego pochodnych są wyższe w analizowanej karmie pochodzącej z obszarów polnych. Dlatego też dziki bytujące i żerujące w

pobliżu wielkoobszarowych upraw kukurydzy pobierają wraz z pokarmem zdecydowanie więcej mikoestrogenu zearalenonu.

7. Jedne z najniższych zawartości zearalenonu i jego metabolitów odnotowano w mięśniach, co wskazuje, że kumulacja mikotoksyn w tej tkance jest niewielka.

8. Przeprowadzone badania własne wskazują, iż środowisko bytowania dzików, ze szczególnym uwzględnieniem wielkoobszarowych łanów kukurydzy, może być przyczyną zaburzeń hormonalnych, w konsekwencji prowadzących do hiperestrogenizmu, co bezpośrednio przekłada się na dysfunkcję układu rozrodczego.

9. Stała obecność zearalenonu w materiale roślinnym pobieranym przez samice dzików w okresie jesienno – zimowym powoduje pogłębienie końcowej fazy okresu bezrujowego (anestrus), a zaistniała sytuacja może powodować wstrzymanie rozwoju pęcherzyków jajnikowych, co z kolei prowadzi do spowolnienia i wydłużenia owulacji.

10. Mikotoksyny zawarte w kukurydzy mogą mieć też wpływ na zaburzenia cyklu rozrodczego dzików poprzez wywoływanie zaburzeń hormonalnych prowadzących do obniżenia wieku dojrzałości płciowej.

11. Kilkuletnie lochy przyczyniają się do wzrostu liczebności dzików nie więcej niż o 20%. Kontrola nad populacją jest możliwa tylko wtedy, gdy udział pozyskanych warchlaków wynosi ok. 80%. Uzasadnione jest to wysoką liczbą młodzieży w populacji i stosunkowo wysokim przyrostem loch w tej kategorii wiekowej.

12. Przyrost zrealizowany populacji z terenów polnych może być nawet o kilkadziesiąt procent wyższy jak w obszarch leśnych, co potwierdza hipotezę, że pobierane z pokarmem mikotoksyny mogą wpływać na rozrodczość dzików.

13. Zakładany w planach łowieckich przyrost populacji należy dostosować do specyfiki obwodu, a w szczególności do charakteru dominujących upraw rolnych.

14. Przyczyną wzrostu liczebności populacji dzików jest najprawdopodobniej wydłużenie okresu godowego i obniżenie wieku dojrzałości płciowej. Sytuacja ta spowodowana jest splotem czynników klimatycznych, korzystnymi dla dzików zmianami składu gatunkowego upraw oraz zaburzeniami hormonalnymi powodowanymi przez wtórne metabolity grzybów pleśniowych z rodzaju *Fusarium* rozwijających się na kolbach kukurydzy.