

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Zanieczyszczenie zbóż grzybami mikroskopowymi oraz ich metabolitami zebranych na terenie Wielkopolski

KINGA STUPER, MACIEJ BUŚKO, ANNA MATYSIAK, JULIUSZ PERKOWSKI
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU, KATEDRA CHEMII

STRESZCZENIE

Patogeniczne i toksynotwórcze gatunki grzybów mikroskopowych powodują co roku na całym świecie znaczne straty ekonomiczne. W związku z powyższym konieczne jest kontrolowanie poziomu zanieczyszczenia ziarna zbóż tymi mikroorganizmami oraz ich toksycznymi metabolitami określanymi jako mikotoksyny. W ramach niniejszej pracy przebadano po 15 próbach ziarna pięciu gatunków zbóż: takich jak: pszenżyto, pszenica, jęczmień, żyto i owies. Próby pobierano bezpośrednio po zbiorze z magazynów rolników indywidualnych na terenie Wielkopolski w 2007 roku. Oznaczono w nich stężenie ergosterolu (ERG), sumę mikotoksyn z grupy trichotecenów za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem masowym i chromatografii cieczowej oraz liczbę JTK (jednostek tworzących kolonie) klasyczną metodą zalewową. Stwierdzono, iż spośród analizowanych gatunków zbóż owies i żyto charakteryzowały się najwyższym stężeniem ERG. Natomiast najniższe stężenie tego metabolitu oznaczono w ziarnie pszenicy. Stężenie sumy toksyn wynoszące 0,081 mg/kg było najwyższe w próbach ziarna owsa, a najniższe wynoszące 0,018 mg/kg w próbach ziarna pszenicy. W przypadku jednostek tworzących kolonie, ziarno owsa charakteryzowało się najwyższą liczbą JTK (3,16log jtk/g), natomiast ziarno pszenicy najniższą (1,26log jtk/g). Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej zaobserwowano wysoce istotną korelację między stężeniem ERG, a stężeniem sumy toksyn. W żadnej z przebadanych prób nie stwierdzono przekroczenia dopuszczalnego przez UE stężenia mikotoksyn w zbożach nieprzetworzonych.

Contamination of cereal by microscopic fungi and their metabolites collected in Wielkopolska region

ABSTRACT

Microscopic fungi are major pathogenic microorganisms affecting quality of cereal products. Their toxic secondary metabolites, called mycotoxins, may have a significant effect on the quality of grain, milling products

and as a result also the final product such as baked goods. In view of the fact that the problem of occurrence of microscopic fungi and their toxic metabolites is of considerable importance both in Poland and worldwide it was decided to conduct studies presented in this work. The aim of these investigations was to determine the concentration of ergosterol (HPLC), level of CFU and mycotoxins from the group of trichothecenes (GC/MS) in 15 samples from each five cereal grain (triticale, wheat, barley, rye and oat), collected from Wielkopolska region individual farms in 2007. The highest concentration of ERG was found in oat and rye samples, the lowest was in wheat samples. Content of total toxins was 0,081 mg/kg in oat, but the lowest 0,018 mg/kg in wheat samples. Count of CFU was the highest in oat samples (3,16 log cfu/g), for wheat CFU was 1,26 log cfu/g. Based on the conducted analysis of correlations between concentrations of ERG, total toxins and CFU level for all tested objects positive significant correlations were found between all characteristics. Higher correlation coefficients were found for the dependence of ERG concentration on total toxins, in relation to the correlation of CFU on total toxins.

1. WSTĘP

Zanieczyszczenie grzybami mikroskopowymi oraz ich toksycznymi metabolitami jakimi są mikotoksyny może nastąpić na każdym etapie technologicznym przerobu zbóż. Podczas wegetacji roślin na polu jest ono związane z występowaniem polowych grzybów mikroskopowych. Kolejnym etapem, w którym może dojść do zanieczyszczenia pleśniami jest niewłaściwe składowanie ziarna w okresie późniejszym. Do najczęściej występujących rodzajów grzybów mikroskopowych stanowiących zanieczyszczenie mikrobiologiczne ziarna zbóż należą: *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp. oraz *Mucor* spp. Większość z nich posiada właściwości toksynotwórcze, a najczęściej występującymi są: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *Penicillium verrucosum*, *P. nordicum*, *P. palitans*, *P. cyclopium*, *P. expansum*, *P. patulum*, *Fusarium graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum* [1]. Jednym z najbardziej szkodliwych dla kłosów zbóż jest gatunek *Fusarium culmorum* [2, 3]. Porażenie ziarna przez ten gatunek obniża nie tylko jakość materiału siewnego [4], ale i pogarsza jego wartość technologiczną [5]. Jednak tymi metabolitami, które najbardziej obniża walory użytkowe porażonego przez grzyby z rodzaju *Fusarium* ziarna, są mikotoksyny [6, 7]. Ich występowanie jest ściśle skorelowane z obecnością grzybów mikroskopowych. Można zatem stwierdzić, iż ocena zawartości biomasy grzybowej pozwala na oszacowanie zawartości mikotoksyn w badanym materiale [8, 9]. Stosowanie odpowiednich zabiegów agrotechnicznych oraz właściwe przechowywanie surowca jest skuteczną metodą zapobiegania rozwojowi grzybów mikroskopowych i produkcji przez nie mikotoksyn. Jednakże pomimo szeroko zakrojonych działań profilaktycznych, jak

wskazują badania epidemiologiczne [10] zanieczyszczenie tymi mikroorganizmami oraz ich metabolitami stanowi istotny problem na całym świecie. Opracowano dotychczas wiele metod ilościowego oznaczania mikroflory grzybowej. Podstawowymi są bezpośrednio opisane powyżej metody mikrobiologiczne, a w ostatnim czasie mamy do czynienia z rozwojem metod immunologicznych oraz biologii molekularnej. Na tle w/w metod wyróżniają się metody chemiczne. Stwierdzenie w roślinie obecności któregoś z metabolitów grzybowych wskazywać może na obecność grzyba i pośrednio innych produktów jego metabolizmu. Wśród metabolitów pierwszorzędowych na szczególną uwagę zasługuje ergosterol (ERG) [9]. Analiza zawartości ERG wskazuje na poziom nie tylko żywej biomasy grzybowej, ale przynajmniej częściowo, całkowitej biomasy grzybowej obecnej w badanej próbce. Stężenie ERG koreluje zarówno z liczbą JTK [11], jak i z zawartością mikotoksyn. Dowodem są liczne prace, w których współczynnik korelacji między jedną z najczęściej występujących toksyn w ziarnie zbóż naturalnie porażonych deoksyniwalenolem (DON), a stężeniem ERG jest wysoki [11]. Niewątpliwą korzyścią przeprowadzania analizy zawartości ergosterolu w ziarnie jest stosunkowo niski jej koszt w porównaniu z analizą sumy toksyn. Wśród całego spektrum mikotoksyn jakie produkują grzyby mikroskopowe w umiarkowanej strefie klimatycznej największe znaczenie mają trichoteceny [12]. Tworzą je grzyby z rodzajów: *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachbotrys*, *Trichoderma* oraz *Trichothecium* (Sweeney i Dobson, 1999) [13]. Izolaty grzybów należących do *F. culmorum* bądź *F. graminearum* produkują głównie trichoteceny grupy B. Zalicza się do nich: DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, Fus-X oraz NIV. Spośród nich najczęściej występującymi są DON oraz NIV. Trichoteceny grupy A, a mianowicie: T-2 toksyna, HT-2 toksyna, STO, DAS, NEO, T-2 Triol, T-2 Tetraol i inne ich pochodne, wytwarzane są przez następu-

jące gatunki *Fusarium*: *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. sambucinum* i *F. langsethiae* [13]. W związku z powyższym maksymalne stężenie jednej z najczęściej występujących mikotoksyn z grupy trichotecenów jaką jest DON jest normowane przez Rozporządzenie Komisji WE (nr 1881/2006 z 19.12.2006, Dz. Urz. UE L 364/5) i wynosi dla zbóż nie przetworzonych innych niż pszenica durum, owies i kukurydza 1250 µg/kg, dla nieprzetworzonej pszenicy durum i owsa wynosi 1750 µg/kg, w produktach zbożowych, przeznaczonych bezpośrednio do spożycia przez ludzi (również makaron) 750 µg/kg, natomiast dla chleba, ciasta i produktów śniadaniowych maksymalne dopuszczalne stężenie DON wynosi 500 µg/kg. Grzyby mikroskopowe oraz ich metabolity powodują corocznie na całym świecie ogromne straty gospodarcze. Spowodowana przez nie fuzarioza kłosa staje się coraz poważniejszym problemem. Doniesienia literaturowe wskazują, że problem ten ma zasięg ogólnoświatowy. Występuje ona powszechnie w Ameryce Północnej, w Ameryce Południowej, Azji, Afryce, Europie oraz w Australii [14]. W związku z powyższym monitorowanie poziomu zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi oraz mikotoksynami ziarna zbóż jest niezwykle ważnym elementem kontroli bezpieczeństwa mikrobiologicznego w łańcuchu produkcyjnym przerobu zbóż. Stąd celem niniejszych badań było oznaczenie poziomu zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi oraz ich metabolitami ziarna pięciu gatunków zbóż takich jak: pszenżyto, pszenica, jęczmień, żyto i owies pobierano bezpośrednio po zbiorze w 2007 roku z magazynów rolników indywidualnych znajdujących się na terenie Wielkopolski za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

2. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

2.1. Materiał badany

Określenie stężenia metabolitów grzybowych oraz liczby JTK poddano reprezentatywną ilość prób naturalnie porażonego ziarna pięciu gatunków zbóż (pszenżyto, pszenica, żyto, owies, jęczmień) pobranych bezpośrednio po zbiorze w 2007 roku z 15 magazynów należących do rolników indywidualnych na terenie Wielkopolski. W sumie przebadano 75 prób ziarna należących do 5 w/w gatunków zbóż.

2.2. Analiza zawartości trichotecenów

Próbki o masie 10 g rozdrobiono za pomocą młynka laboratoryjnego WŻ-1 (Instytut Badawczy Przemysłu Piekarniczego, Bydgoszcz). Po umieszczeniu

w kolbkach stożkowych o pojemności 200 ml próbki poddano ekstrakcji za pomocą 100ml mieszaniny acetonitryl – woda 82:18 (v/v) wytrząsając 15 min, a następnie pozostawiając próby przez noc i ponownie wytrząsając 15 min. Otrzymane ekstrakty filtrowano przez sączi celulozowe Whatman numer 5 na lejkach Büchnera pod zmniejszonym ciśnieniem. Ekstrakty oczyszczano metodą ekstrakcji do fazy stałej przy użyciu kolumniek wypełnionych 5ml mieszaniny składającej się z: węgla aktywnego (Darco G 60, 100 mesh), celitu (Celite 545) i obojętnego tlenku glinu (70-230 mesh) zmieszanych w stosunku wagowym 1:1:1. Kolumniki przygotowano w następujący sposób: w polipropylenowej kolumnie o pojemności 6ml umieszczono kolejno: watę szklaną, 0,25g celitu, 3 g mieszaniny węgla aktywnego, celitu i obojętnego tlenku glinu oraz ponownie watę szklaną. Tak przygotowane kolumniki aktywowano przemywając pod zmniejszonym ciśnieniem 15 ml mieszaniny acetonitryl – woda (82:18 v/v) przy przepływie 1ml/min. Po opróżnieniu kolby do kolumniek wprowadzono przefiltrowane ekstrakty, a następnie przemywano kolumniki 30 ml mieszaniny acetonitryl – woda (82:18 v/v). Oba połączone przesącze zbierano i odparowywano do sucha przy użyciu wyparki próżniowej (Büchi R-205). Pozostałość przenoszono ilościowo za pomocą octanu etylu (2,5 ml) oraz 2 porcjami po 2,5 ml mieszaniny chloroform – acetonitryl (4:1 v/v) do fiolek o pojemności 8ml odparowując na bieżąco do sucha w strumieniu azotu. Trichoteceny grupy A analizowano jako pochodne trifluoroacetylowe z użyciem wzorca wewnętrznego, natomiast trichoteceny grupy B jako pochodne trimetylosililowe z użyciem wzorca zewnętrznego. W celu otrzymania pochodnych trifluoroacetylowych (grupa A) do fiolek o pojemności 2ml dodawano 10 µg Mirexu jako standardu wewnętrznego, odparowywano go do sucha i następnie dodawano 100 µl bezwodnika kwasu trifluorooctowego. Po szczelnym zamknięciu prowadzono reakcję w temperaturze pokojowej przez okres 20 minut. Reakcję przerywano poprzez odparowanie nadmiaru bezwodnika w strumieniu azotu. Bezpośrednio przed analizą próbki przeprowadzone w pochodne acylowe rozpuszczano w 0,5 ml izooktanu. Natomiast pochodne trimetylosililowe otrzymywano w reakcji z mieszaniną trimetylosililimidazolu i trimetylochlorosilanu (100:1 v/v, 100 µl) prowadzonej w fiolce o pojemności 8ml w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Reakcję przerywano poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej 3 ml wody destylowanej, a następnie dodawano 0,5 ml izooktanu, wytrząsano za pomocą wytrząsarki i prze-

noszono warstwę izooktanową do szczelnie zamkniętej fiołki. Rozdział chromatograficzny oraz analizę trichotecenów grup A i B prowadzono oddzielnie za pomocą chromatografu gazowego (Hewlett Packard 6890) sprzężonego z detektorem masowym (Hewlett Packard 5972 A). Aparat wyposażony był w autosampler (HP 18593B) oraz kolumnę kapilarną (HP-5MS, 0,25 mm x 30 m). Próbkę nastrzykiwano w objętości 1 µl do komory nastrzykowej o temperaturze 280°C bez dzielenia strumienia, temperatura separatora wynosiła 280°C. Przy oznaczaniu trichotecenów grupy A początkowa temperatura pieca wynosiła 80°C i była utrzymywana przez 1 min. Po czym temperatura wzrastała o 10°C/min do temperatury 280°C i utrzymywana była przez okres 4 minut. Czas analizy wynosił 25 minut. Analiza wykonywana była w trybie szukania wybranych jonów (SIM). Dla trichotecenów grupy A były to: STO 456 i 555; T-2 tetraol 455 i 568; T-2 triol 455 i 569; DAS 402 i 374; HT-2 455 i 327; T-2 327 i 401 oraz Mirex 332 i 509. Czas retencji dla tych toksyn wynosił odpowiednio: 14,71; 15,18; 18,23; 18,62; 19,54; 21,56 i 21,32 minut. Do oznaczania trichotecenów grupy B początkowa temperatura pieca wynosiła 80°C i utrzymywana była przez 1 minutę. Następnie temperatura wzrastała o 15°C/min do 200°C i utrzymywana była przez 6 minut. Po tym czasie temperatura wzrastała o 10°C/min do 280°C i utrzymywana była na tym poziomie przez 5 minut. Całkowity czas analizy wyniósł 28 minut. Do oznaczania trichotecenów grupy B również wykonana była analiza wybranych jonów (SIM). Były to dla DON 103 i 512; 3-AcDON 117 i 482; 15-AcDON 193 i 482; Fus-X 103 i 570; NIV 191 i 600. Czas retencji dla tych toksyn wynosił odpowiednio: 19,53; 20,88; 21,07; 21,01; 21,25 minut. Szybkość przepływu helu wynosiła 0,7 cm³/min. Celem potwierdzenia obecności w próbce oznaczanych toksyn wykonana została analiza w pełnym zakresie mas (od 100–700 amu) dostarczająca widmo masowe, które porównywano z analogicznie otrzymanym widmem dla standardu. Widmo to wraz z porównywaniem czasów retencji analizowanego związku ze standardem jest podstawą do identyfikacji toksyn. Obok analizy jakościowej oznaczano stężenie badanych toksyn poprzez porównanie względnych wysokości wybranych jonów. Otrzymane wyniki poddane były obróbce w programie Chem Station. Odzysk dla analizowanych toksyn wynosił: T-2 86±3,8%; T-2 tetraol 88±4,0%; HT-2 91±3,3%; DAS 84± 4,6%; DON 84±3,8%; 3AcDON 78±4,8%; 15 AcDON 74±2,2%; NIV 81±3,8%. Natomiast limit detekcji dla analizowanych toksyn wynosił 0,001mg/kg [15].

2.3. Analiza zawartości ergosterolu (ERG)

Do analizy ERG pobierano próby o masie 10 g. Próby mielono za pomocą młynka laboratoryjnego (WŻ-1). Masa próby do analizy wynosiła 0,10 g. Próby umieszczano w zakręczanych probówkach do kultur o pojemności 17 ml, gdzie przeprowadzono ekstrakcję ergosterolu z jednoczesnym zmydleniem. Procesy te zachodziły pod wpływem promieniowania mikrofalowego. W tym celu do próbek dodawano 2 ml metanolu oraz 1 ml 0,5-molowego roztworu wodorotlenku sodu. Szczelnie zamknięte próbki dla bezpieczeństwa umieszczano w plastikowych butelkach, które z kolei umieszczono w kuchence mikrofalowej (Whirlpool model AVM 401/1/WH, 2450 MHz, 900 W).

Próby zostały poddawane wpływowi promieniowania mikrofalowego o mocy 350W dwukrotnie przez okres 20 sekund. Po schłodzeniu (około 15 minut) próbki poddano neutralizacji za pomocą 1-molowego wodnego roztworu kwasu solnego. Po dodaniu 2 ml metanolu ekstrahowano ergosterol za pomocą 12 ml pentanu (3 x 4 ml). Uzyskane ekstrakty pentanowe na bieżąco przenoszono do fiołki o pojemności 8 ml, po czym odparowano do sucha w strumieniu azotu. Przed rozpoczęciem analizy próby rozpuszczano w 1 ml metanolu. Analizę przeprowadzono za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczowego (Waters SDS 501) z detektorem absorbcyjometrycznym (Waters 486 Tunable Absorbance Detector). Rozdział chromatograficzny odbywał się na kolumnie Nova Pack C18, (150x3,9 mm), jako fazę wymywającą stosowano mieszaninę metanol: acetonitryl 90:10 (v/v). Pomiar stężenia ergosterolu następował przy użyciu wzorca zewnętrznego przy długości fali λ=282 nm. Identyfikacja związku odbywała się na podstawie porównania czasu retencji badanego pliku z czasem retencji standardu oraz poprzez dodanie do badanej próbki określonej ilości standardu i powtórnej analizę. Odzysk ERG wynosił 97%, natomiast poziom wykrywalności 0,01 mg/kg [16].

2.4. Płytkowa metoda zalewowa z rozcieńczeń dziesiętnych

Ocenę liczby grzybów mikroskopowych w przeliczeniu na 1 g ziarna wykonano standardową metodą płytkową zgodnie z procedurą PN-ISO 21527-2: 2009. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni. Część 2: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody niższej lub równej 0,95 [9]. 10 g rozdrobnionego materiału badanego (w trzech powtórzeniach) zawieszano w 90 ml 0,1% wody peptonowej. Po czasie 30 min. próby wytrząsano przez 2,5 min.

Następnie z przygotowanej zawiesiny wykonano rozcieńczenia dziesięciokrotne w 0,1% roztworze wody peptonowej. W tym celu jałową pipetą przenoszono 1 ml zawiesiny z trzech wykonanych rozcieńczeń na sterylne płytki Petriego (po dwie dla każdego rozcieńczenia). W kolejnym etapie płytki zalewano pożywką agarową z Różem Bengalskim i chloramfenikolem (15 ml) o temperaturze 45°C. Płytki inkubowano warunkach tlenowych, ustawione płasko w cieplarni w temperaturze 25±1°C przez 5-7 dni. Po inkubacji liczono kolonie na wybranych płytkach (pozwalających na uzyskanie od 15 do 150 kolonii na płytce) i w oparciu o liczbę policzonych kolonii obliczono liczbę jednostek tworzących ko-

lonie grzybów mikroskopowych (JTK) w 1 g materiału badanego (jtk/g). Wynik był średnią z dwóch powtórzeń i wyrażony został w log jtk/g.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

W roku 2007 przebadano pod względem ilości ERG, stężenia mikotoksyn z grupy trichotecenów oraz liczby JTK 75 prób ziarna należących do pięciu rodzajów zbóż (pszenżyto, żyto, owies, pszenica i jęczmień). Wśród analizowanych gatunków zbóż owies i żyto charakteryzowały się najwyższym stężeniem ERG wynoszącym odpowiednio 9,79 oraz 9,69 mg/kg (Tab. 1A). Natomiast najniższe stężenie tego metabolitu

Tabela 1. Zakres oraz średnie stężenie sumy toksyn, ergosterolu oraz wartość log jtk/g (A), średnie stężenie trichotecenów grupy A i B (B) w ziarnie 5 rodzajów zboża zebranego w 2007 roku oraz korelacje pomiędzy analizowanymi cechami (C)

A Zboże	Ilość prób	Średnie stężenie ERG (mg/kg)		Średnie stężenie sumy toksyn (mg/kg)		Log jtk/g	
		zakres	średnia	zakres	średnia	zakres	średnia
Pszenżyto	15	1,13-7,88	3,13 ^a	0,010-0,047	0,031 ^a	1,05-2,66	1,44 ^a
Pszenica	15	0,41-4,25	1,90 ^b	0,004-0,026	0,018 ^b	1,28-2,67	1,26 ^b
Jęczmień	15	2,05-9,20	7,28 ^c	0,008-0,069	0,052 ^b	1,35-2,67	1,81 ^c
Żyto	15	4,52-13,26	9,69 ^d	0,027-0,083	0,074 ^c	1,24-2,78	2,97 ^d
Owies	15	5,71-11,05	9,79 ^d	0,044-0,124	0,081 ^d	2,59-4,55	3,16 ^d
Wszystkie zboża	75	0,41-13,26	6,36	0,004-0,124	0,047	1,05-4,55	2,04

Takie same litery w wierszach – brak istniejących różnic na poziomie istotności $\alpha=0,05$

B Zboże	Ilość prób	Stężenie trichotecenów grupy A (mg/kg)					Stężenie trichotecenów grupy B (mg/kg)				
		STO	T-2 Tetraol	T-2 Triol	DAS	HT-2	DON	Fus-X	3-AcDON	15-AcDON	NIV
Pszenżyto	15	<LOD	0,002	0,003	0,001	0,001	0,017	0,004	0,004	0,003	0,003
Pszenica	15	0,004	<LOD	0,001	<LOD	0,001	0,013	<LOD	<LOD	0,004	0,012
Jęczmień	15	0,004	0,006	0,004	0,001	0,001	0,024	0,002	0,002	0,011	0,007
Żyto	15	<LOD	0,001	0,001	0,008	<LOD	0,053	0,001	0,006	0,002	0,026
Owies	15	0,002	0,004	0,005	0,004	0,004	0,025	<LOD	0,002	0,001	0,009
Wszystkie zboża	75	0,004	0,005	0,003	0,007	0,002	0,029	0,001	0,002	0,007	0,016

C Zboże	Współczynnik korelacji		
	ERG/stężenie sumy toksyn	ERG/log jtk/g	Stężenie sumy toksyn/log jtk/g
Pszenżyto	0,8605***	0,6158**	0,5237**
Pszenica	0,8032***	0,7115**	0,4284*
Jęczmień	0,6489**	0,7019**	0,5654**
Żyto	0,7527***	0,6326**	0,3661
Owies	0,8106***	0,6568**	0,7205**
Wszystkie zboża	0,8248***	0,6726**	0,6895**

wynoszące 1,90 mg/kg oznaczono w ziarnie pszenicy. Uzyskane wyniki stężenia ERG, będącego wskaźnikiem ilości zarówno żywej, jak i martwej mikoflory porównano z aktualnymi danymi, biorąc pod uwagę fakt, iż nie ma do tej pory uregulowań prawnych w tej kwestii. Pierwotnie jako bezpieczną zawartość mikoflory w zdrowym ziarnie przyjęto stężenie ERG wynoszące 3 mg/kg [17]. Schnörer i Johnson [18] zaproponowali natomiast zakres stężeń tego metabolitu wynoszący 1-9 mg/kg jako bezpieczną wartość graniczną dla ziarna konsumpcyjnego. Wyznaczone średnie wartości stężenia ERG dla wszystkich badanych zbóż nie przekraczały wskazywanej w literaturze wartości granicznej. Między poszczególnymi badanymi rodzajami zboża występowały jednak istotne różnice w średnim stężeniu ERG. Podobne różnice między zawartością mikoflory dla poszczególnych zbóż zaobserwowali Perkowski i in [16]. Autorzy ci najwyższe stężenie tego metabolitu, 8,69 mg/kg oznaczyli w ziarnie owsa, niższe w ziarnie jęczmienia 2,39 mg/kg, a najniższe natomiast w ziarnie pszenicy 1,26 mg/kg. Stuper i in. [9] zaobserwowali również, iż wśród analizowanych zbóż pszenica odznaczała się najniższym średnim stężeniem ERG wynoszącym 2,87 mg/kg, natomiast pozostałe badane zboża zawierały odpowiednio więcej tego metabolitu w następującej kolejności pszenżyto 4,67 mg/kg, żyto 9,97 mg/kg, jęczmień 11,38 mg/kg oraz owies 14,98 mg/kg.

Zawartość grzybów mikroskopowych mierzonych za pomocą liczby jednostek tworzących kolonie była w przypadku wszystkich zbóż niska i utrzymywała się na poziomie od 10^1 jtk/g do ponad 10^3 jtk/g (Tab. 1A). Największą liczbą JTK wyznaczono w ziarnie jęczmienia. Schnurer i Jonsson [18] podają, iż zanieczyszczenie mikologiczne zbóż na poziomie 10^3 - 10^4 jtk/g przyjmuje się jako naturalne porażenie. Podobne do prezentowanych w ramach niniejszej pracy wyniki dotyczące poziomu JTK w ziarnie jęczmienia przedstawili Gawrysiak-Witulska i in. [11], którzy w ziarnie pszenicy bezpośrednio po zbiorze oznaczyli ok. 10^4 jtk/g. Neagu i Tofan [19] badali próby pszenicy, owsa i jęczmienia pochodzące z centralnej Rumunii, stwierdzając niską zawartość grzybów mikroskopowych na poziomie: 12 jtk/g dla pszenicy, 4 jtk/g dla jęczmienia oraz 6 jtk/g dla owsa. Krysińska-Traczyk i in. [20] podają natomiast, iż w ziarnie pszenicy zebranym na terenie wschodniej Polski zanieczyszczenie grzybami mikroskopowymi wynosiło od 0 do $227,5 \times 10^3$ jtk/g. Obok zawartości mikoflory w próbach zbóż analizowano również stężenie mikotoksyn. Poziom stężenia trichotecenów grupy A i B był niski, a stężenie DON w żadnej z badanych prób nie przekraczało wartości

1250 μ g/kg wyznaczonej przez Unię Europejską jako bezpieczna dla ziarna przeznaczonego do konsumpcji (Tab. 1A). Podobnie jednak, jak w przypadku stężenia ERG oraz ilości JTK zawartość tych toksycznych metabolitów różniła się istotnie w poszczególnych gatunkach zbóż. W czasie badań przeprowadzonych na Litwie istotne różnice między gatunkami zbóż w zawartości DON oraz innych trichotecenów z grupy B zaobserwowali również Mankevičiene i in. [21]. W pracy tej autorzy oznaczyli najwyższe stężenie DON w próbach ziarna żyta wynoszące 691 μ g/kg, niższe stężenie oznaczono w ziarnie jęczmienia 198 μ g/kg, a najniższe natomiast w ziarnie pszenżyta 168 μ g/kg oraz owsa 122 μ g/kg. Šliková i in. [22] w latach 2004-2006 zaobserwowali istotne różnice między stężeniem DON w badanych próbach pszenicy. W analogicznym okresie do prowadzonych przez nas badań w Europie odnotowano jedynie 7 przypadków przekroczenia w zbożach i produktach piekarniczych dozwolonego stężenia DON (Raport RASFF, 2007).

W naszych badaniach stężenie sumy toksyn w analizowanych próbach zbóż wynoszące 0,081 mg/kg było najwyższe w próbach ziarna owsa, a najniższe natomiast (0,018 mg/kg) w próbach ziarna pszenicy. Podobne tendencje jak poziom mikotoksyn oraz ERG zaobserwowano co do liczby JTK, a mianowicie ziarno owsa charakteryzowało się największą ilością grzybów mikroskopowych (3,16 log jtk/g), natomiast ziarno pszenicy najmniejszą (1,26 log jtk/g). Spośród analizowany toksyn prawie 90% analizowanych prób zawierało DON i NIV, a ok. 65% T-2 Triol (Tab. 1B). Ziarno żyta cechowało się najwyższymi stężeniami zarówno DON (0,053 mg/kg) i NIV (0,026 mg/kg). Ziarno pszenicy charakteryzowało się stężeniem DON wynoszącym 0,013 mg/kg. W ziarnie pszenżyta wykryto natomiast najmniejszą ilość NIV, która wynosiła 0,003 mg/kg.

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej wyznaczono współczynniki korelacji między analizowanymi cechami zbóż (Tab. 1C). Dla uzyskanych wyników obliczono korelacje między ilością mikoflory oraz badanymi metabolitami dla każdego zboża z osobna oraz dla wszystkich badanych rodzajów zboża. W prawie 90% rozpatrywanych przypadków korelacje były istotne. Współczynnik korelacji na poziomie ufności $P=0,001$ sumarycznie dla wszystkich gatunków zbóż wynosił odpowiednio dla zależności ERG/stężenie sumy toksyn 0,8248, ERG/log jtk/g 0,6726, natomiast dla stężenia sumy toksyn/log jtk/g 0,6895. Podobne wyniki współczynników korelacji dotyczących przedstawionych powyżej cech uzyskali także inni autorzy [23]. Wiśniewska i Buśko [24] podają natomiast

w swej pracy współczynnik korelacji pomiędzy ERG/DON wynoszący 0,91 na poziomie istotności $P=0,01$. Saxena i in. [25] oraz Gawrysiak-Witulska i in. [11] podają również istotne korelacje między stężeniem ERG i ilością jtk/g na poziomie od 0,70 do 0,90.

Na podstawie przedstawionych powyżej badań analizowanych metabolitów grzybowych w ziarnie oraz różnic między ich zawartością w różnych zbożach można stwierdzić, iż na proces kumulacji trichotecenów oraz ERG ma wpływ szereg czynników [26]. Wśród czynników podawanych przez innych autorów wyróżnić należy: gatunek zboża [26], budowę rośliny, jej odporność na warunki pogodowe w okresie kwitnienia i dojrzewania ziarniaków [22].

4. WNIOSKI

Przedstawione w niniejszej części pracy wyniki badań zawartości mikoflory oraz trichotecenów w ziarnie pięciu gatunków zbóż wskazują na niski poziom

zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi oraz toksynami zbóż przeznaczonych do konsumpcji na terenie Wielkopolski. W żadnej z przebadanych prób nie stwierdzono przekroczenia dopuszczalnego przez Rozporządzenie Unii Europejskiej z 2006 roku stężenia mikotoksyn w zbożach nieprzetworzonych.

Stężenie mikotoksyn oraz zawartość biomasy grzybowej w ziarnie jest uzależniona od gatunku zboża, przy czym najwyższą ich ilość zaobserwowano dla ziarna owsa i żyta, najniższą natomiast dla ziarna pszenicy.

Pomiędzy badanymi cechami opisywanymi stężeniem badanych metabolitów grzybowych można znaleźć istotne korelacje, przy czym najistotniejszą zależność znaleziono dla korelacji ERG/suma toksyn.

LITERATURA

- [1] Chełkowski J.: Cereal Grain: Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage (Developments in Food Science) , Elsevier Science, ISBN-10: 0444885544, 219-437, 1991.
- [2] Perkowski J., Plattner R. D., Goliński P., Vesonder R. F., Chełkowski J.: Natural occurrence of deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, nivalenol, 4,7-dideoxynivalenol and zearalenone in Polish wheat, Mycotoxin Research, 6, 40371, 1990.
- [3] Jackowiak H., Packa D., Wiwart M., Perkowski J.: Scanning electron microscopy of *Fusarium* damaged kernels of spring wheat, International Journal of Food Microbiology, 98(2), 113-223, 2005.
- [4] Veisz O., Szunics L., Szunics L.: Fusarium infection of oat varieties, Cereal Research Communications, 25, 829-831, 1997.
- [5] Lešnic M., Cencič A., Vajs S., Simončič A.: Milling and bread baking techniques significantly affect the mycotoxin (deoxynivalenol and nivalenol) level in bread, Acta Alimentaria, 37, 471-483, 2008.
- [6] Perkowski J.: Tworzenie mikotoksyn w zbożach przez grzyby rodzaju *Fusarium*, Postępy Nauk Rolniczych, 242, 67-82, 1993.
- [7] Langseth W., Bernhoft A., Rundberget T., Kosiak B., Gareis M.: Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals, Mycopathology, 144, 103-113, 1999.
- [8] Stuper K., Perkowski J.: Zawartość ergosterolu w zbożowych produktach spożywczych, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 5(60), 71-77, 2008.
- [9] Stuper K., Buško M., Perkowski J.: Rozwój chemicznych metod oznaczania zawartości mikrofory grzybowej w produktach zbożowych, Aparatura Badawcza i Dydaktyczna, 4, 68-74, 2008.
- [10] Windels K.: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2000, 2002.
- [11] Gawrysiak-Witulska M., Wawrzyniak J., Ryniecki A., Perkowski J.: Relationship of ergosterol content and fungal contamination and assessment of technological quality of malting barley preserved in a metal silo using the near-ambient method, Journal of Stored Products Research, 44, 360-365, 2008.
- [12] Chełkowski J.: Mikotoksyny, grzyby toksyno twórcze i miko toksykozy, Instytut Genetyki Roślin, PAN, Poznań, ISBN: 978-83-85583-24-0, 2010.
- [13] Sweeney M. J., Dobson A. D. W.: Molecular biology of mycotoxin biosynthesis, FEMS Microbiology Letters, 175, 149-163, 1999.
- [14] Tekauz A.: Fusarium head blight of oat in western Canada – preliminary studies on the Fusarium species involved and levels of mycotoxin(s) in grain, Journal of Applied Genetics, 43A, 197-206, 2002.

- [15] Perkowski J., Wiwart M., Buśko M., Laskowska M., Berthiller A., Kandler S., Krska R.: Fusarium toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from north-eastern Poland in 2003, *Food Additives and Contaminants*, 24(11), 1292-1298, 2007.
- [16] Perkowski J., Buśko M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Szwajkowska-Michałek L.: Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals, *Biologia*, 63(4), 542-547, 2008.
- [17] Maupetit P., Gatel F., Cahagnier B., Botorel G., Charlier M., Collet B., Dauvillier P., Laffiteau J., Roux G.: Quantitative estimation of fungal infestation of feedstuffs by determining ergosterol content, 44Th Annual meeting of EAAP Aarhus, Denmark, 16-19 August, Commission of animal nutrition, 16, 20, 1993.
- [18] Schnürer J., Jonsson A.: Ergosterol levels and mould colony forming units in Swedish grain of food and feed grade, *Acta Agriculturae Scandinavica*, 42, 240-245, 1992.
- [19] Neagu C., Tofan C.: Cereal contamination with toxinogenic moulds, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 14, 237-24, 2008.
- [20] Krysińska-Traczyk E., Kiecana I., Perkowski J., Dutkiewicz J.: Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and grain dust collected on farms in eastern Poland, *Annals of Agricultural And Environmental Medicine*, 8, 269-274, 2001.
- [21] Mankevičienė A., Butkutė B., Dabkevičius Z., Supronienė S.: *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian cereals from the 2004-2005 harvests, *Annals of Agricultural And Environmental Medicine*, 14, 103-107, 2007.
- [22] Šliková S., Šudyová V., Gregová E.: Deoxynivalenol in wheat from the growing areas of Slovakia, *Cereal Research Communications*, 36, 279-287, 2008.
- [23] Tothill I.E., Harris D., Magan N.: The relationship between fungal growth and ergosterol content of wheat grain, *Mycological Research*, 96, 965-970, 1992.
- [24] Wiśniewska H., Buśko M.: Evaluation of spring wheat resistance to *Fusarium* seedling blight and head blight, *Biologia*, 60(3), 287-293, 2005.
- [25] Saxena, J., Munimbazi, C., and Bullerman, L. B.: Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production, *Int. International Journal of Food Microbiology*, 71, 29-34, 2001.
- [26] Foroud N.A., Eudes F.: Trichothecenes in Cereal Grains, *nt J Mol Sci.* , 10(1), 147-173, 2009.