

MYCOTOXINS IN CEREALS FROM ORGANIC CULTIVATION

Summary

This work presents two-year monitoring of the contamination of organic wheat and spelt by the most important trichothecenes and zearalenone and also ochratoxins A and aflatoxins. Content of mycotoxins was defined by enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. Occurrence of Fusarium mycotoxins was similar in both cereals, but different in studied years. Any of the trichothecenes and zearalenone did not exceed maximal levels determined in EU for mycotoxins in cereals. The aflatoxins and ochratoxin A were not found in examined cereal grain.

Key words: wheat; spelt; cultivation; ecological system; mycotoxins; experimentation

MIKOTOKSYNY W ZBOŻACH Z UPRAW EKOLOGICZNYCH

Streszczenie

W pracy przedstawiono dwuletni monitoring zanieczyszczeń zbóż, pszenicy i orkisz z upraw metodami ekologicznymi przez najważniejsze trichoteceny i zearalenon oraz ochratoksynę A i aflatoksyny. Zawartość mikotoksyn określano za pomocą immunoenzymatycznej metody ELISA. Występowanie mikotoksyn fuzaryjnych było zbliżone w obydwu gatunkach zbóż, ale różne w latach badań. Żaden z trichotecenów oraz zearalenon nie przekroczył maksymalnych poziomów ustalonych w UE dla mikotoksyn w zbożach. W ziarnie badanych zbóż nie stwierdzono występowania ochratoksyny A i aflatoksyny.

Key words: pszenica; orkisz; uprawa; system ekologiczny; mikotoksyny; badania

1. Wstęp

Toksynotwórcze gatunki z rodzaju *Fusarium* są groźnymi patogenami zbóż i produkują liczne mikotoksyny, z których najważniejszymi są trichoteceny i zearalenon. Spośród trichotecenów najbardziej niebezpieczne są toksyny T-2 i HT-2, których poziom w ziarnie zbóż w ostatnich latach systematycznie wzrasta [1, 4]. Podczas niewłaściwego przechowywania zbóż ochratoksyna A i aflatoksyny są produkowane w ziarnie przez grzyby z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* [5]. Toksyczny wpływ wybranych trichotecenów na zwierzęta objawia się zahamowaniem wzrostu, zaburzeniami układu rozrodczego, immunologicznego i pokarmowego [1-4, 6, 8, 10]. Najczęściej występująca w zbożach w strefie klimatu umiarkowanego ochratoksyna A jest potencjalnie kancerogenna dla ludzi, natomiast rzadziej występujące w tym klimacie aflatoksyny są rakotwórcze [5, 7].

Celem niniejszej pracy było określenie występowania mikotoksyn fuzaryjnych oraz przechowalniczych w ziarnie orkisz i pszenicy zwyczajnej uprawianych metodami ekologicznymi.

2. Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły ziarniaki pszenicy zwyczajnej i orkisz uprawiane metodami ekologicznymi. Przeanalizowano 9 prób orkisz, 7 prób pszenicy ozimej i 5 prób pszenicy jarej ze zbiorów z 2008 r. oraz 6 prób orkisz i 5 prób pszenicy ozimej pochodzących ze zbiorów w 2010 r. z upraw ekologicznych z województwa lubelskiego. Badanymi odmianami pszenicy ozimej były Tona-cja i Litewka, pszenicy jarej Cytra i Bryza, a orkisz Fran-kencorn i Schwabencorn.

W ziarnie badanych zbóż określono zawartość aflatoksyny, ochratoksyny A, deoksyniwalenolu, toksyny T-2 oraz

zearalenonu z wykorzystaniem bezpośrednich, kompety-cyjnych testów ELISA, AgraQuant firmy Romer Labs zgodnie z zaleceniami producenta. Testy te umożliwiają ilościowy pomiar stężenia mikotoksyn w zakresie: 0,25-5,0 mg·kg⁻¹ dla deoksyniwalenolu, 75-500 µg·kg⁻¹ dla toksyny T-2, 40-1000 µg/kg dla zearalenonu, 1-20 µg·kg⁻¹ dla aflatoksyny, 2-40 µg·kg⁻¹ dla ochratoksyny. Próbkę analizowano spektrofotometrycznie za pomocą czytnika Sunrise firmy Tecan przy długości fali λ = 450 nm. Pomiar absorbancji analizowano za pomocą oprogramowania Magellan firmy Tecan. Koncentrację mikotoksyn obliczano z krzywej standardowej wyznaczonej na podstawie absorbancji standardów.

3. Wyniki

W badanych zbożach z upraw ekologicznych w obydwu latach badań nie stwierdzono występowania aflatoksyn i ochratoksyny A (rys. 1, 2). Tylko w jednej próbie orkisz ze zbiorów w 2008 r. wykryto toksynę T-2 w ilości poniżej 75 µg/kg, natomiast DON wykryto w trzech próbach tego zboża w ilościach od 280 do 300 µg/kg (tab. 1). Badane próby pszenicy zwyczajnej z 2008 roku w większości były zanieczyszczone deoksyniwalenolem w ilościach od 250 do 500 µg/kg. Tylko w dwóch próbach pszenicy ozimej z tego roku nie stwierdzono toksyny T-2. Wszystkie próby badanych zbóż ze zbiorów w 2010 r. były zanieczyszczone deoksyniwalenolem i toksyną T-2. Zearalenon stwierdzono w trzech próbach pszenicy zwyczajnej i w pięciu próbach orkisz z 2010 r. (rys. 2-4).

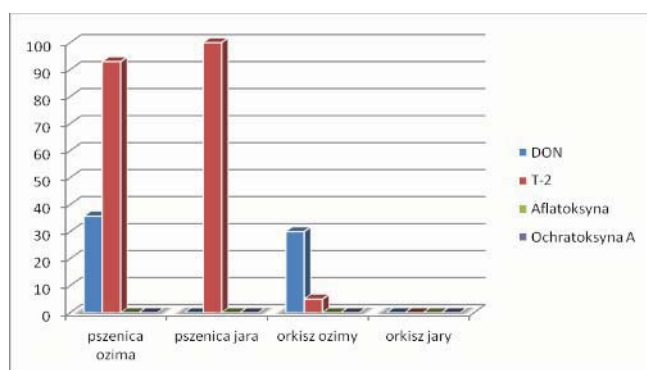
4. Dyskusja

Uzyskane wyniki wskazały na powszechne występowanie w zbożach z upraw ekologicznych mikotoksyn fuzaryjnych takich jak: deoksyniwalenol, toksyna T-2 i zearalenon.

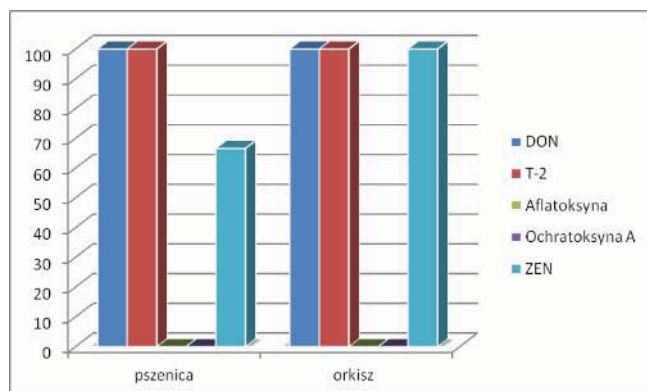
Tab. 1. Zawartości mikotoksyn w badanych zbożach
 Table 1. Content of mycotoxins in examined cereals

Rok zbioru <i>Year of harvest</i>	Zboże <i>Cereal</i>	Mikotoksyny / <i>Mycotoxins</i> [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		
		DON	Toksyna T-2 <i>Toxin T-2</i>	ZEN
2008	Pszenica ozima / <i>Winter wheat</i>	0 - 500	0 - 94,91	-
	Pszenica jara / <i>Spring wheat</i>	-	poniżej / <i>below</i> 75	-
	Orkisz ozimy / <i>Winter spelt</i>	0 - 300	poniżej / <i>below</i> 75	-
	Orkisz jary / <i>Spring spelt</i>	-	-	-
2010	Pszenica ozima / <i>Winter wheat</i>	79,3 - 380,7	5,7 - 19,9	0 - 36,8
	Orkisz ozimy / <i>Winter spelt</i>	18,6 - 168,4	8,6 - 20	2,0 - 2,7

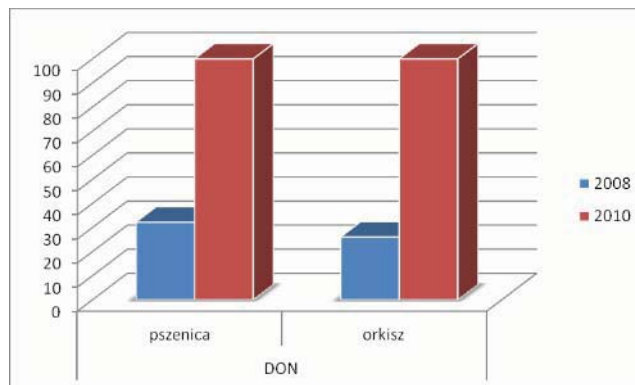
W żadnej próbie nie stwierdzono obecności mikotoksyn tworzonych podczas przechowywania, tj. aflatoksyn i ochratoksyny A. W większości przypadków zawartości deoksyniwalenolu i zearalenonu w zbożach i produktach z nich były małe, natomiast zanotowano duże ilości toksyny T-2, szczególnie w 2010 r. We wszystkich badanych zbożach nie obserwowano przekroczenia maksymalnych dopuszczalnych zawartości deoksyniwalenolu i zearalenonu. Maksymalna dopuszczalna zawartość deoksyniwalenolu w ziarnie zbóż wynosi $1250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, natomiast w przypadku zearalenonu wartość ta wynosi $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [6, 10]. Nie zostały do tej pory ustalone maksymalne dopuszczalne zawartości toksyny T-2 w zbożach, natomiast ustalono tolerowane dzienne pobranie tej mikotoksyny i wynosi ono $60 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ masy ciała [4].



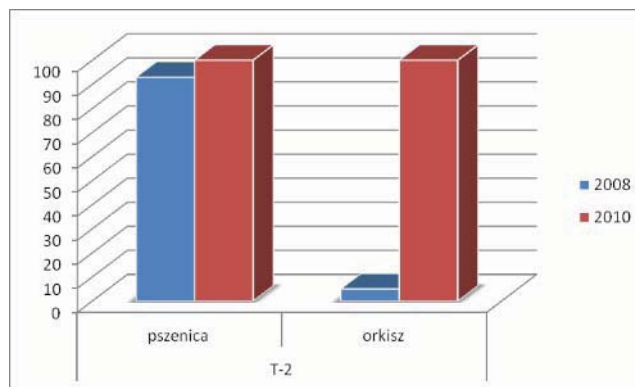
Rys. 1. Procentowy udział prób pszenicy zanieczyszczonej przez mikotoksyny, zbiór 2008
 Fig. 1. Percentage of wheat contaminated by mycotoxins, harvest 2008



Rys. 2. Procentowy udział prób pszenicy zanieczyszczonej przez mikotoksyny, zbiór 2010
 Fig. 2. Percentage of wheat contaminated by mycotoxins, harvest 2010



Rys. 3. Procentowy udział zbóż zanieczyszczonej przez DON w zależności od roku zbioru
 Fig. 3. Percentage of cereals contaminated by DON depending on harvest year



Rys. 4. Procentowy udział prób zbóż zanieczyszczonej przez toksynę T-2 w zależności od roku zbioru
 Fig. 4. Percentage of cereals contaminated by toxin T-2 depending on harvest year

Tolerowane dzienne pobranie deoksyniwalenolu wynosi $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ masy ciała, dla zearalenonu $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ masy ciała. Najmniej szkodliwą z wymienionych mikotoksyn jest deoksyniwalenol, który w dużych koncentracjach może działać immunosupresyjnie i powodować wymioty [6]. Toksyna T-2 powoduje podrażnienia skóry, wymioty i jest immunosupresyjna. Szacunkowe spożycie toksyn T-2 i HT-2, przekracza w większości przypadków t-TDI ($0,06 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ masy ciała/dzień) [4]. Mikotoksyna T-2 jest znacznie bardziej toksyczna niż deoksyniwalenol. Toksyna T-2 zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* jest inhibitorem syntezy białka. Pierwszym celem T-2 jest system immunologiczny. Opisane w literaturze działanie wykazuje: zmniejszenie liczby limfocytów, spowolnienie odpowiedzi immunologicznej, nadmierną utratę prekursorowych komórek krwi, zmniejszenie

produkcji przeciwciał, odrzucanie alloprzeszczepów i zmianę odpowiedzi blastogenu na lektyny. Ostra toksyczność tej mikotoksyny przejawia się mdłościami, wymiotami, podrażnieniem gardła, ogólnym bólem i rozdęciem, biegunką, skrzepami krwi w kale, ogólną dezorientacją oraz dreszczami. Ostry przebieg choroby wywołanej przez toksynę T-2 w większości przypadków był śmiertelny. Toksyna T-2 jest produkowana przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, takie jak: *Fusarium poae* i *Fusarium sporotrichioides* [1, 4]. Grzyby te powszechnie występują na ziarniakach zbóż w naszym kraju [9]. W niniejszych badaniach stężenie toksyny T-2 w obydwu badanych zbożach było na podobnym poziomie, przy czym w 2010 r. mikotoksyna ta występowała powszechnie w ziarnie pszenicy i orkisz. Wzrost występowania toksyny T-2 w zbożach obserwuje w swych badaniach wielu autorów [1, 4].

Zearalenon jest syntetyzowany przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, wśród których *F. graminearum* i *F. culmorum* należą do najważniejszych producentów tej mikotoksyny [11]. Do akumulacji zearalenonu może dochodzić przed zbiorami, w porażonym przez *Fusarium* spp. zbożu rosnącym na polu. Wyniki wielu badań wskazują jednak, że uważane za naturalne wysokie stężenie toksyny, które wykrywa się w niektórych próbkach pasz dla zwierząt, jest skutkiem nieprawidłowego przechowywania [11]. Zearalenon, nazywany też toksyną F-2, wykazuje małą toksyczność ostrą. Mimo to, obecność zearalenonu w paszy, przez dłuższy okres może powodować pogorszenie zdrowotności świń i owiec. Zearalenon wykazuje działanie mutagenne i estrogeniczne [11]. Obecność zearalenonu w pożywieniu może być przyczyną hiperestrogenizmu u ssaków, a więc także i u ludzi. Syndrom estrogenny u zwierząt jest skutkiem dawki w diecie rzędu 1,5-3 mg ZEA na kg masy ciała na dzień. Metabolizm zearalenonu zachodzi w wątrobie, gdzie wytwarzany jest alfa- i beta-zearalenon. Typowymi objawami mikotoksykozy zearalenowej są: zmniejszenie płodności, zwiększenie letalnej resorpcji embrionów, zmniejszenie wielkości jelit, zmiana wagi gruczołów nadnerczy, tarczycy i przysadki oraz zmiany stężeń progesteronu i estradiolu we krwi. Typowe kliniczne symptomy działania toksyny F-2 u loch i macior to powiększenie gruczołów mlecznych, wypadanie odbytu, stany zapalne sromu i pochwy, wymioty, utrata apetytu oraz niestrawność pokarmowa. Karmienie próżnych macior paszą zanieczyszczoną zearalenonem powodowało zatrzymywanie ciała luteinizującego. Najcięższe objawy działania ZEA związane z rozmnażaniem świń obejmowały: przedwczesne dojrzewanie loszek, powiększenie sromu, brak cyklu rujowego, występowanie pseudociaży, zmniejszenie miotu oraz wagi i żywotności nowonarodzonych prosiąt. U knurów skarmianie paszy skażonej ZEA wywoływało stany zapalne, zmniejszenie ilości testosteronu, zmiany w obrębie napletka, pomniejszenie jąder, zmianę wagi gruczołów pęcherzykowych, zaburzenie spermatogenezy, indukcję feminizacji i spadek libido. Krowy narażone na działanie zearalenonu wykazywały bezpłodność i redukcję produkcji mleka. Ostra toksyczność zearalenonu przejawia się generalnie w wątrobie i nerkach. Stwierdzono, iż ZEA i jego pochodne powodowały gruczolaką wątroby, jak również raka przysadki. Obecność wysokich dawek zearalenonu *in vivo* powodowała zmiany

w parametrach immunologicznych, hamowanie sterowanej mitogenem proliferacji limfocytów 1 oraz zwiększenie produkcji interleukin. Spożywanie żywności zanieczyszczonej zearalenonem może wpływać na proces dojrzewania kobiet, wywoływać raka macicy, a także raka przetyku i jelita grubego [3, 11].

5. Bibliografia

- [1] Beyer F., Ferse I., Humpf H.U.: Large-scale production of selected type A trichothecenes: the use of HT-2 toxin and T-2 triol as precursors for synthesis of *d3*-T-2 and *d3*-TH-2 toxin. *Mycotox. Res.*, 2009, 25: 41–52.
- [2] Bin-Umer M.A., McLaughlin J.E., Basu D., McCormick S., Tumer N.E.: Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation-implication for the mechanism of toxicity. *Toxins*, 2011, 3(12), 1484-1501.
- [3] D'Mello J.P.F., Placinta C.M., MacDonald A.M.C.: Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, 1999, 80:183-205.
- [4] Edwards S., Barrier-Guillot B., Clasen P.E., Hietaniemi V., Pettersson H.: Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. *World Mycotoxin Journal*, 2009, 2, 173-179.
- [5] Elmholt S., Rasmussen P.H.: *Penicillium verrucosum* occurrence and ochratoxin A contents in organically cultivated grain with special reference to ancient wheat types and drying practice. *Mycopathologia*, 2005, 159, 3: 421–432.
- [6] Pestka J.J.: Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 137:283-298.
- [7] Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R.A.: An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin a carcinogenicity. *Chemical Research Toxicology*, 2012, 25(2), 252-262.
- [8] Rocha O., Ansari K., Doohan F.M.: Effects of trichothecene mycotoxins in eukaryotic cells: a review. *Food Additive Contamination*, 2005, 22(4), 369-378.
- [9] Solarska E., Kuzdrański A.: Ioxigenic fungi and mycotoxins in organic spring barley protected with chitosan-based bio-preparations. *Phytopathologia*, 2011, 60: 57–63.
- [10] Sherif O., Salama Emad E., Abdel-Wahhab Mosaad A.: Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. *Environmental Health*, 2008, Vol. 112: 347-368.
- [11] Zinedine A., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J.: Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and chemical toxicology*, 2007, Volume 45, Issue 1, p. 1-18.
- [12] Meister U.: *Fusarium* toxins in bread cereals of the land Brandenburg in the years 2000 to 2004 — Comparison of integrated and ecological cultivation. *Mycotoxin Research*, 2005, Volume 21, Number 4, 231-236.
- [13] Miedaner T., Reinbrecht C., Lauber U., Schollenberger M., Geiger H.H.: Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breeding*, 2001, 120: 97-105.
- [14] Olsen M.: Mycotoxins in organic and conventional foods and effects of the environment. In: ©CAB International 2008. *Health benefits of organic food: Effects of the environment*. Edited by Givens et al., 2008: 145-159.