

## THE OCCURRENCE OF FUSARIUM TOXINS IN WINTER WHEAT DEPENDING ON FERTILIZATION

### Summary

The aim of this work was the comparison of occurrence *Fusarium* spp. in grain of winter wheat cv Oliwin grown in 2006 and 2007 in the same conditions in the organic and conventional production systems and also the determination of produced mycotoxins by the fungi. Whole-meal flour was analysed on the presence trichothecenes: deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON), T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxyscirpenol (DAS), nivalenol (NIV), fusarenon X, by use of the gas chromatograph with ECD detector. The cleaning of samples was made with the SPE method. *Fusarium poae* and also fungi from *Penicillium* and *Alternaria* genus were isolated from grain of wheat. The chromatograph analysis of wholemeal flour from 2006 showed higher content deoxynivalenol (DON) in organic flour, and deoxyscirpenol (DAS) in conventional flour. The presence of 3-AcDON was detected only in organic flour. Total content of all determined mycotoxins was higher in wholemeal flour from organic wheat. However in both cases the norms for content of mycotoxins in cereals were not exceeded. Total content of mycotoxins in 2007 in comparison with 2006 was lower.

## WPŁYW SPOSOBU NAWOŻENIA NA WYSTĘPOWANIE TOKSYN FUSARYJNYCH W PSZENICY OZIMEJ

### Streszczenie

Celem pracy było porównanie występowania grzybów z rodzaju *Fusarium* w ziarnie pszenicy ozimej odmiany Oliwin uprawianej w latach 2006 i 2007 w systemach produkcji ekologicznej i konwencjonalnej oraz określenie wytworzonych przez te grzyby mikotoksyn. Mąkę razową otrzymaną po zmieleniu ziarna analizowano na obecność mikotoksyn trichotecenowych: deoksyniwalenolu (DON), 3-acetylodeoksyniwalenolu (3-AcDON), 15-acetylodeoksyniwalenolu (15-AcDON), T-2 toksyny, HT-2 toksyny, deokyscirpenolu (DAS), niwalenolu (NIV), fuzarenonu X, przy użyciu chromatografu gazowego z detektorem ECD. Z ziarniaków pszenicy wyosobniano *Fusarium poae*, a także grzyby z rodzajów *Penicillium* i *Alternaria*. Analiza chromatograficzna mąki razowej z 2006 roku wykazała wyższą obecność deoksyniwalenolu (DON) w pszenicy ekologicznej oraz obecność 3-AcDON tylko w pszenicy ekologicznej. Jedynie w pszenicy konwencjonalnej zaobserwowano wyższą zawartość deokyscirpenolu w 2006 roku i T-2 toksyny w 2007 roku. Ogólnie zawartość wszystkich oznaczanych mikotoksyn była znacznie wyższa w mące razowej z pszenicy z ekologicznego systemu produkcji. Jednak w obu przypadkach nie przekroczyła norm dla zawartości mikotoksyn w zbożach. W 2007 roku ogólna zawartość mikotoksyn w porównaniu do roku 2006 była niższa.

### 1. Wstęp i cel pracy

W naszym kraju pszenica zajmuje pierwszą pozycję pod względem powierzchni uprawy zbóż. Jest jednak zbożem bardzo podatnym na porażenie przez toksynotwórcze grzyby z rodzaju *Fusarium* [10]. Grzyby te wytwarzają głównie trichoteceny, które są jedną z najliczniejszych grup mikotoksyn w ziarnie zbóż [4]. Substancje te po spożyciu zanieczyszczonego nimi produktu zbożowego charakteryzują się wysoką toksycznością [3, 4].

Uważa się, że zboża uprawiane w systemie produkcji ekologicznej są bardziej narażone na zanieczyszczenia przez mikotoksyny niż w systemie produkcji konwencjonalnej z powodu nie stosowania w tym systemie chemicznych preparatów przeciwgrzybowych. Z drugiej strony liczne informacje z piśmiennictwa wskazują na mniejsze zawartości mikotoksyn w zbożach lub ich produktach pochodzących z uprawy ekologicznej w porównaniu z konwencjonalną [1, 8, 9, 13]. Słabsze porażenie zbóż przez grzyby toksynotwórcze w ekologicznym systemie produkcji jest wynikiem doboru mniej podatnych odmian na porażenie przez te grzyby oraz lepiej zaprojektowanego płodozmianu w tym systemie [2, 10].

Celem pracy było określenie wpływu zastosowanego nawożenia na rozwój i występowanie grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz tworzenie przez nie mikotoksyn w pszenicy ozimej uprawianej w systemach produkcji ekologicznej i konwencjonalnej w latach 2006 i 2007.

### 2. Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiła pszenica ozima odmiany Oliwin uprawiana w systemach produkcji ekologicznej i konwencjonalnej, w doświadczeniu agrotechnicznym założonym w Katedrze Ekologii Rolniczej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

W obu systemach uprawy zastosowano jednakowe następstwo roślin i przedplonem dla pszenicy była fasola. W systemie konwencjonalnym stosowano nawożenie mineralne w ilości 80, 100, 120 kg NPK na 1 ha. W systemie ekologicznym rośliny nawożono kompostem w dawce 15 ton na ha.

Do wyosobniania grzybów zasiedlających analizowany materiał zastosowano metodę szalkową. Wyizolowane grzyby oznaczano do gatunku posługując się kluczami i monografiami podanymi przez Solarską (1996) [11].

Analizę mikotoksyn przeprowadzono łącznie w ziarnie z 24 prób pszenicy. Mąkę razową otrzymano przez zmielenie ziarna w młynku laboratoryjnym ultraośrodkowym Retzch ZM 200 (oczko siatki 0,1 mm). Następnie pobierano 5 g mąki i analizowano na obecność mikotoksyn trichotecenowych: deoksyniwalenol (DON), 3-acetylo-deoksyniwalenol (3-AcDON), 15-acetylo-deoksyniwalenol (15-AcDON), T-2 toksyna, HT-2 toksyna, deoksycirpenol (DAS), niwalenol (NIV), fuzarenon X, za pomocą chromatografii gazowej wg procedury podanej przez Valle-Algarra i in. [12].

Do oczyszczania próbek wykorzystano kolumnienki MycoSep 225 Trich firmy Romer Laboratories, Union, MO, USA. Ekstrakt filtrowano przez złożę kolumny według instrukcji producenta. Następnie pobierano po 2 ml filtratu do fiolki i suszono pod strumieniem azotu.

Do wysuszonej próby dodano 100 µl roztworu 2 mg/l DMAP (4-dimetyloaminopirydyna) w mieszaninie toluen-acetonitryl (80:20) i 50 µl PFA. Zamknięte próbki ogrzewano przez 60 min w 60°C. Po ochłodzeniu fiolek z próbkami dodawano do nich po 1 ml 3% roztworu wodnego NaHCO<sub>3</sub> i następnie wstrząsano przez 15 sekund. W roztworze wydzielają się dwie warstwy. Materiał z górnej warstwy (organicznej) był pobierany do analizy chromatograficznej (GC-ECD). Rozdział trichotecenów przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Varian CP-3800 z detektorem ECD i kolumny VF-1ms 30Mx032,MM ID DF=0,25 firmy Varian. Temperatura komory dozownika wynosiła 250°C, a detektora 300°C.

W analizie chromatograficznej wykorzystano następujący program temperatury pieca: 90°C przez 1 min, przystop 40°C/min do 160°C, 3°C/min do 173°C, 2°C/min do 240°C, 40°C/min do 270°C, 270°C przez 1 min. Jako gazu nośnego użyto azotu przy przepływie 1 ml/min.

### 3. Wyniki badań i dyskusja

#### 3.1. Występowanie grzybów z rodzaju *Fusarium* w ziarniakach pszenicy

Ocena makroskopowa kłosów i ziarniaków pszenicy nie wykazała typowych objawów fuzariozy na kłosach, ani na ziarniakach. W wyniku analizy mikologicznej ziarniaków pszenicy uprawianych w systemie ekologicznym i konwencjonalnym wyosobniono wyłącznie *Fusarium poae* (tab. 1), przy czym w obydwu latach badań więcej izolatów tego grzyba uzyskiwano z pszenicy z systemu produkcji konwencjonalnej.

Tab. 1. Grzyby wyosobnione z pszenicy ozimej ekologicznej i konwencjonalnej w latach 2006-2007

Table 1. Fungi isolated from organic and conventional winter wheat in 2006-2007

Gatunek grzyba <i>Fungus species</i>	Pszenica / Wheat			
	Ekologiczna <i>Organic</i>		Konwencjonalna <i>Conventional</i>	
	2006	2007	2006	2007
<i>Alternaria</i> spp.	7	14	1	12
<i>Aspergillus</i> spp.	-	-	-	3
<i>Dreschlera</i> spp.	-	4	-	4
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw.	5	9	3	15
<i>Penicillium</i> spp.	-	4	-	10
Grzybnie nie zarodnikujące <i>The mycelium not sporulated</i>	13	20	15	37

Ponadto z ziarniaków pszenicy pochodzącej z obu systemów produkcji izolowano licznie grzyby z rodzaju *Alternaria*, i tylko w 2007 roku grzyby z rodzaju *Penicillium*. Większą liczbę izolatów grzybów z rodzaju *Alternaria* spp. wyosobniono z pszenicy z systemu produkcji ekologicznej.

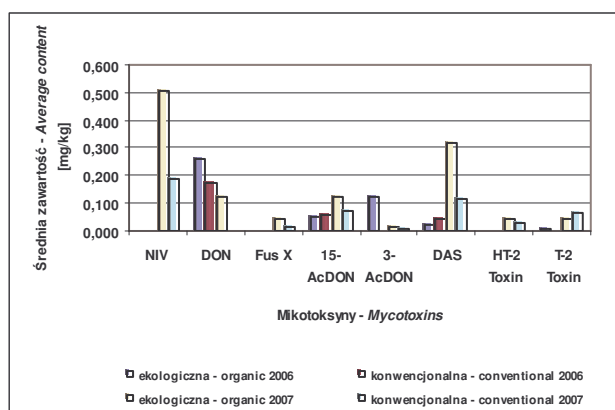
#### 3.2. Analiza jakościowa i ilościowa trichotecenów w mące razowej

Analiza chromatograficzna mąki razowej otrzymanej w roku 2006 wykazała obecność deoksyniwalenolu (DON) w pszenicy z obu systemów produkcji - ekologicznego i konwencjonalnego (rys. 1). W pszenicy z systemu produkcji ekologicznej średnia zawartość tej mikotoksyny wynosiła 0,262 mg/kg i wykrywano ją w 83% prób, przy wahaniami zawartości od 0,13 do 0,60 mg/kg. DON wykrywano był również w 83% badanych prób w pszenicy z systemu uprawy konwencjonalnej uzyskując średnią zawartość 0,173 mg/kg, przy jej wahaniami od 0,06 do 0,61 mg/kg.

Ponadto analiza chromatograficzna wykazała obecność 3-AcDON w ilości ok. 0,122 mg/kg tylko w pszenicy z systemu uprawy ekologicznej w 33% badanych próbek w ilości od 0,13 do 0,60 mg/kg, a także 15-AcDON w ilości 0,057 mg/kg w pszenicy pochodzącej z systemu uprawy konwencjonalnej (33% badanych prób) i w ilości 0,05 mg/kg w pszenicy pochodzącej z systemu uprawy ekologicznej (również 33%). W przypadku pszenicy z uprawy konwencjonalnej zaobserwowano wyższą zawartość deoksycirpenolu w 2006 roku i T-2 toksyny w 2007 roku.

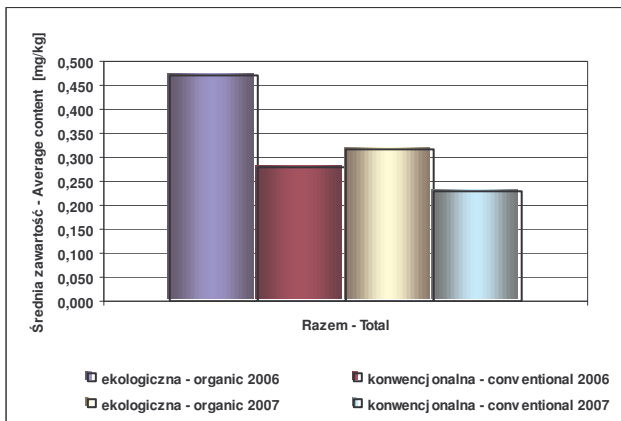
W 2007 roku w pszenicy z obu systemów produkcji stwierdzano najwięcej niwalenolu (NIV), 0,51 mg/kg w pszenicy ekologicznej i 0,18 mg/kg w konwencjonalnej. Również zawartość deoksycirpenolu (DAS) była na wysokim poziomie (0,11-0,31 mg/kg). W obu przypadkach znacznie bardziej zanieczyszczona tymi mikotoksynami była pszenica uprawiana metodami ekologicznymi.

Biorąc pod uwagę wszystkie analizowane mikotoksyny zarówno w 2006 jak i w 2007 roku bardziej zanieczyszczona nimi była pszenica z ekologicznego systemu produkcji (rys. 2). Jednak w obu przypadkach nie przekroczyła norm dla zawartości mikotoksyn w zbożach.



Rys. 1. Średnia zawartość mikotoksyn w ziarnie pszenicy uprawianej w systemie produkcji ekologicznej i konwencjonalnej w latach 2006 i 2007

Fig. 1. The average content of mycotoxins in grain of wheat grown in the the organic and conventional systems of production in 2006 and 2007



Rys. 2. Porównanie zawartości wszystkich badanych mikotoksyn w ziarnie pszenicy uprawianej w systemach produkcji ekologicznej i konwencjonalnej w latach 2006 i 2007

Fig. 2. The comparison of content of all examined mycotoxins in grain of wheat grown in the the organic and conventional systems of production from 2006 and 2007

Za główną przyczynę fuzariozy kłosów zbóż uznaje się *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* i *F. poae* [5, 6]. *F. poae* okazał się też główną przyczyną fuzariozy kłosów w niniejszych badaniach. W analizowanych ziarniakach pszenicy wykrywano deoksynivalenol, 3-AcDON, 15-AcDON, DAS, nivalenol, T-2 toksynę, HI-2 toksynę, z których niektóre mogą być metabolizowane przez *F. poae* [7]. Ekologiczny i konwencjonalny system produkcji pszenicy ozimej w przeprowadzonym doświadczeniu agrotechnicznym różnił się sposobem nawożenia. Na większą ogólną zawartość mikotoksyn w pszenicy ozimej z uprawy ekologicznej wydaje się więc mieć wpływ nawożenie kompostem. Rola tego nawozu organicznego w aspekcie podatności zbóż na porażenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium* wymaga dalszych badań.

#### 4. Wnioski

Przeprowadzone badania upoważniają do wyprowadzenia następujących wniosków:

1. Przyczyną fuzariozy kłosów pszenicy ozimej było *Fusarium poae*.
2. Ogólna zawartość wszystkich oznaczanych mikotoksyn była wyższa w mące razowej z pszenicy pochodzącej z ekologicznego systemu produkcji, jednak w obu systemach nie przekroczyła norm zawartości mikotoksyn w zbożach.
3. Nawożenie pszenicy kompostem mogło w znacznym

stopniu wpłynąć na wyższą zawartość mikotoksyn w ziarnie.

#### 5. Literatura

- [1] Cirillo T., Ritieni A., Visone M., Cocchieri R.A.: Evaluation of conventional and organic Italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B-1 and B-2. *J. Agr. Food Chem.*, 2003, 51, 8128–8131.
- [2] Doyle M. E.: *Natural and Organic Foods: Safety Considerations A Brief Review of the Literature*, Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison Madison, 2006, WI 53706 ([www.wisc.edu/fri/](http://www.wisc.edu/fri/))
- [3] Krska R., Baumgartner S., Josephs R.: The state-of-art in the analysis of the type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, 371, 285-299.
- [4] Langseth W., Rundberget T.: Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *J. Chrom., A*, 1998, 815, 103-121.
- [5] Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L.: *Fusarium ear (scab) in small grain cereals – a review*. *Plant Pathol.*, 1995, 44, 207-238.
- [6] Perkowski J., Chełkowski J.: Porównanie zawartości deoksynivalenolu i 3-acetyloksynivalenolu w naturalnie porażonej pszenicy w latach 1986-1988. *Post. Nauk Roln.*, 1993, 242, 2, 83-89.
- [7] Pronk M.E.J., Schothorst R.C., Egmond H.P.: Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes. 2002, RIVM Report 388802024/2002.
- [8] Schollenberger M i in.: Fusarium toxins In wheat flour collected in an area In southwest Germany. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, 72, 85-89.
- [9] Skaug M. A.: Analysis of Norwegian milk and infant formulas of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, 1999, 16, 75-78.
- [10] Solarska E.: Grzyby z rodzaju *Fusarium* i mikotoksyny występujące na pszenicy ozimej uprawianej w różnych systemach produkcji.. w monografii: Wybrane zagadnienia ekologiczne we współczesnym rolnictwie, PIMR, Poznań, t. 2, 2005, s.115-125.
- [11] Solarska E.: Kształtowanie się zbiorowisk grzybów i bakterii w glebie pod uprawą chmielu w zależności od zabiegów agrotechnicznych ograniczających verticiliozę (*Verticillium albo-atrum*). Rozprawa habilitacyjna, 1996. IUNG Puławy.
- [12] Valle-Algarra F. M., Medina A., Gimeno-Adelantado J.V., Llorens A., Jimenez M., Mateo R.: Comparative assessment of solid-phase extraction clean-up procedures, GC columns and perfluoroacylation reagents for determination of type B trichothecenes in wheat by GC-ECD, *Talanta*, 2005, 66, 194–201.
- [13] Woese K., Lange D., Boess C., Bogl K. W.: A comparison of organically and conventionally grown foods. Results of a review of the relevant literature. *J. Sci. Food. Agric.*, 1997, 74, 281-293.