

Efektívnosť oddeľovacieho testu na stanovenie stupňa mycetickej kontaminácie obilných zŕn

JANA GRATZLOVÁ – ZDENKA JESENSKÁ – JUDITA ŠEPITKOVÁ

Súhrn. Práca prináša výsledky overovania oddeľovacieho testu na stanovenie stupňa kontaminácie obilných zŕn kmeňmi *Aspergillus flavus* a *Fusarium* sp. pomocou nasýteného roztoku chloridu sodného. Analýza mykoflóry 37 vzoriek ukázala, že metóda nie je v našich podmienkach vhodná. Korelačné koeficienty medzi počtom vyplavených zŕn a počtom zŕn kontaminovaných kmeňmi *A. flavus*, resp. *Fusarium* sp. boli nízke a nepreukázané.

Screeningové metódy, ktoré umožňujú rýchlo rozhodnúť o osude, t.j. o využití alebo vyradení potravinárskych surovín, potravín, resp. krmovín, sú v praxi veľmi žiadané. Od týchto metód sa zvyčajne očakáva, že nenáročne, jednoducho, rýchlo, ale na príslušnej odbornej úrovni umožnia získať základné informácie o kvalite vyšetrovaného substrátu i na tých pracoviskách, ktorých zamestnanci nemajú špecializáciu v danom odbore.

Mikroskopické huby a problematika ich sekundárnych toxických metabolitov – mykotoxínov, patria k tým odborom špecializácie, ktoré sú veľmi náročné. Pritom však mikromycéty a mykotoxíny vážne ohrozujú zdravie človeka i hospodárskych zvierat [1]. V predchádzajúcich štúdiách sme hodnotili niektoré mykologické screeningové metódy. Zistili sme napríklad, že tzv. diferenciálne médium pre *Aspergillus* umožňuje pracovníkom, ktorí nie sú špecializovaní v odbore mykológie, jednoduchým postupom selektívne izolovať zo vzoriek potenciálnych producentov aflatoxínu kmene *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus* [2]. resp. pomocou tzv. APA média (aflatoxin producing medium) možno zistiť, či izolované kmene sú alebo nie sú schopné produkovať aflatoxín [3].

Ing. Jana Gratzlová, Výskumný ústav krmivárskeho priemyslu a služieb, Nádražná 1, 907 00 Ivanka pri Dunaji.

MUDr. Zdenka Jesenská, CSc., Výskumný ústav preventívneho lekárstva, Limbova 14, 833 01 Bratislava.

RNDr. Judita Šepitková, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

Mikromycéty osídľujú obilné a kukuričné zrná za vhodných podmienok vlhkosti a teploty. Toxinogénne druhy rodov *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium* nachádzajú v cereáliách optimálne prostredie pre produkciu toxických metabolitov. Zistilo sa, že medzi zdravými a mikromycétami, resp. aj mykotoxínmi kontaminovanými zrnami môžu byť určité fyzikálne diferencie, ktoré by bolo možné využiť na jednoduché oddeľovanie vhodných a menej vhodných, resp. nevhodných obilných zŕn pre účely potravinárskeho a krmovinárskeho priemyslu pomocou koncentrovaných roztokov sacharózy, prípadne chloridu sodného [4, 5].

Cieľom našej práce bolo overiť v našich podmienkach tzv. oddeľovací test, ktorý navrhli americkí odborníci [4, 5]. Tento test sme zamerali na analýzu výskytu obilných zŕn kontaminovaných kmeňmi *Fusarium* sp. a *A. flavus*.

Predovšetkým bolo potrebné zistiť, či by bolo možné zaradiť tento jednoduchý, rýchly a nenáročný test ako ďalšie kritérium do praxe, a to do normatívnych ukazovateľov kvality obilných zŕn pre potravinárske, resp. krmovinárske účely, aby sa i takto mohli uplatniť súčasné svetové vedecké poznatky o mikromycétach a mykotoxínoch v cereáliách. Týka sa to najmä určenia frekvencie výskytu zŕn kontaminovaných potenciálnymi producentmi aflatoxínu B₁, zearalenónu, resp. trichotecénových mykotoxínov.

Materiál a metodika

Použilo sa 37 vzoriek obilných zŕn, z toho 4 vzorky pšenice, 5 vzoriek raže a 28 vzoriek sladovníckeho jačmeňa z úrody z roku 1986. Žatva v SSR v uvedenom roku prebiehala za priaznivých klimatických podmienok nášho zemepisného pásma. Vzorky sa odobrali z obilných síl po 1 kg a v papierových obaloch sa do laboratória zasielali poštou.

A. Vyšetrenie mykoflóry obilných zŕn – kontrolná skupina (K). Z každej vzorky sa odobralo 100 zŕn bez výberu. Tieto zrná sa namočili do 5 % roztoku chlórnanu sodného na 5 minút a trikrát za sebou prepláchli sterilnou vodou. Potom sa zrná za sterilných podmienok kladli po desiatich na povrch Sabouraudovho agaru (Sabouraudov agar IMUNA) s 5 % NaCl do Petriho misiek priemeru 9 cm. Naočkované sústavy sme inkubovali pri laboratórnej teplote 7 až 10 dní. Identifikovali sme kmene *A. flavus* na základe ich morfológie a kmene, ktorých kultúry pripomínali rast kmeňov rodu *Fusarium* sme preočkovali na tzv. stimulačný agar podľa Nirenbergerovej [6] a identifikovali ako *Fusarium* sp. až vtedy, keď sa vytvorili charakteristické konídie.

B. Oddelovanie zŕn a vyšetrovanie mykoflóry vyplavených a sedimentovaných zŕn. Do banky s nasýteným roztokom chloridu sodného sa odsypalo z 37 vzoriek vždy odpočítané množstvo zŕn hmotnosti najmenej 20 g, najviac však 50 g. Hmotnosť zŕn sa volila podľa výsledku predbežného oddelovacieho testu. Pri malom počte vyplavených zŕn sme použili väčšie množstvo zŕn a naopak. Zrná sme v roztoku miešali 2 minúty sklenou tyčinkou. Potom sa obsah banky nechal odstáť 10 minút. Zrná, ktoré sa vyplavili (V) na povrch nasýteného roztoku, sme spočítali a porovnali s počtom zŕn, ktoré sedimentovali na dno (S). Výsledky sa vyjadrili v % vyplavených zŕn pri každej vzorke zvlášť.

Zrná, ktoré sa oddelili v nasýtenom roztoku chloridu sodného, sme opláchli vodou, povrchovo sterilizovali chlórnanom sodným, položili na živnú pôdu a mykologicky vyšetrili tak ako v kontrolnej skupine zŕn.

Výsledky

Na povrch nasýteného roztoku NaCl bolo zo vzoriek obilných zŕn vyplavených najmenej 2 %, najviac 26 % z nasýpaných zŕn. Výsledky mykologického vyšetrenia 2540 vyplavených zŕn (V), 2068 zŕn sedimentovaných na dno banky (S) a 3700 zŕn bez selekcie (K) uvádza tabuľka 1. Súbor zŕn, vyplavených na povrch nasýteného roztoku, mal priemerne 2,3 % zŕn kontaminovaných zárodkami *Fusarium* sp. a 3,0 % zŕn kontaminovaných zárodkami *A. flavus*. V súbore sedimentovaných zŕn mikromycéty *Fusarium* sp. kontaminovali priemerne 0,6 % zŕn, v kontrolnej skupine priemerne 0,8 % zŕn, kmene *A. flavus* kontaminovali pri sedimentovaných zrnách priemerne 2,2 % v kontrolnej skupine priemerne 1,3 % zŕn. Napriek tomu, že medzi niektorými hodnotami priemerov boli štatisticky významné rozdiely, koeficienty korelácie medzi počtom vyplavených zŕn a počtom zŕn kontaminovaných kmeňmi *Fusarium* sp. a *A. flavus* boli veľmi nízke, pre *Fusarium* sp. 0,06 a pre *A. flavus* 0,37.

Diskusia

Vláknité mikromycéty rodov *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium* patria k dôležitým poľným a skladiskovým kontaminantom obilných zŕn, ktoré sú dôležitou súčasťou výživy človeka a hospodárskych zvierat. Tieto mikromycéty v prirodzenom prostredí cereálií môžu vystupovať ako potenciálni producenti aflatoxínov, ochratoxínu A, trichotecénov a iných mykotoxínov [1].

T a b u l k a 1. Efektívnosť oddeľovacieho testu na stanovenie stupňa kontaminácie obilných zŕn 37 vzoriek kmeňmi *Fusarium* sp. a *A. flavus*

Table 1. Efficiency of separating test used for the determination of a contamination extent of 37 grain samples contaminated through the strains *Fusarium* sp. and *A. flavus*

[illegible]

Zrno, ktorého endokarp je prerastený vláknami mikromycét, má inú denzitu ako zrno zdravé a to by bolo možné využiť na oddeľovanie zŕn kontaminovaných mykotoxínmi. Americkí odborníci [4, 5] navrhli vykonať toto oddeľovanie pomocou vody, resp. koncentrovaných roztokov cukru alebo soli, prípadne kombináciou týchto postupov. Podľa výsledkov ich pokusov zŕn kukurice, resp. obilné zŕn, ktoré sa vyplavili na povrch použitej tekutiny, obsahovali najviac až 90 % z pôvodného množstva aflatoxínu, najviac až 96 % z pôvodného množstva deoxynivalenolu a najviac až 47 % z pôvodného množstva zearalenónu vo vzorke. Vyplavené zŕn, kontaminované napr. deoxynivalenolom, tvorili 5–10 % a vyplavené zŕn kukurice 11–13 % z celkovej hmotnosti vyšetrovaných vzoriek. V nasýtenom roztoku chloridu sodného bolo vyplavených 1,1–6,6 % kukuričných zŕn, obsahovali však až 73 % z celkového množstva aflatoxínu B₁.

Opísaná a laboratórne overená jednoduchá a rýchla metóda rozdeľovania zŕn cereálií na kontaminované a zdravé zŕn sa zdala byť pre prax pôvodne veľmi sľubná. Na základe výsledkov, ktoré sme získali pri mykologickom vyšetrovaní obilných zŕn z úrody v SSR, dochádzame k záveru, že túto metódu zatiaľ nemôžeme odporúčať ako rýchlu a orientačnú metódu pre selekciu zdravotne vyhovujúcich, resp. nevyhovujúcich obilných zŕn pre výživu človeka alebo kŕmne účely pri výkupe obilia tak, ako sme pôvodne predpokladali. Pri vyšetrovaných vzorkách bol koeficient korelácie medzi počtom vyplavených obilných zŕn a počtom zŕn kontaminovaných kmeňmi *Fusarium* sp. a *A. flavus* veľmi nízky a nepreukázaný.

Príčinou rozporu medzi našimi výsledkami a závermi amerických odborníkov [4, 5] vidíme v tom, že počas žatvy, ktorá v SSR prebieha väčšinou v klimaticky priaznivých podmienkach, býva fuzáriami kontaminovaných veľmi málo obilných zŕn [7, 8]. Ani počet zŕn kontaminovaných kmeňmi *A. flavus* nemôže byť u nás indikátorom toho, že zŕn sú kontaminované aflatoxínom B₁. Toxinogénne kmene *A. flavus* sa v našich podmienkach vyskytujú veľmi zriedkavo [9]. Autori oddeľovacieho testu [4, 5] poukazujú aj na to, že zmeny v denzite zrna môžu spôsobiť mikromycéty akéhokoľvek druhu, a preto by táto metóda mohla výhodne separovať zŕn kontaminovaná akýmkoľvek mykotoxínom. Napriek tomu, že dnes je známy veľký počet rôznych mykotoxínov, treba v súlade s našou legislatívou, stanovenou napríklad pre používatiny [10], sledovať v požívatinách z početných mykotoxínov zatiaľ iba aflatoxíny, ochratoxín A a patulín.

Zistili sme, že test oddeľovania obilných zŕn nemôže zatiaľ nahradiť prácu odborníkov špecializovaných v odbore mykológie. Denzitu obilných zŕn pravdepodobne ovplyvňujú iba mikromycéty, resp. toxinogénne mikromycéty, ale aj iné faktory. Napríklad v oddeľovacích testoch sa v našich súboroch vyskytovala vzorka, pri ktorej sa vyplavilo najviac až 26 % zŕn a ani jedno z nich

nebolo kontaminované zárodkami *Fusarium* sp. alebo *A. flavus*. Vyššie množstvá vyplavených zŕn sa v súbore vyšetrovaných vzoriek zŕn zo žatvy 1986 nevyskytovali.

Literatúra

- [1] JESENSKÁ, Z., Mikroskopické huby v požívatinách a krmivách. Bratislava, Alfa 1987, 320 s.
- [2] JESENSKÁ, Z. – POLÁKOVÁ, O., Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 167, 1978, č. 2, s. 152.
- [3] JESENSKÁ, Z. – POLSTER, M. – MATYÁŠOVÁ, J. – POLÁKOVÁ, O., Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. (B), 171, 1980, č. 4–5, s. 408.
- [4] HUFF, W. E., Cereal Chem., 57, 1980, č. 4, s. 236.
- [5] HUFF, W. E. – HAGLER, W. M., Jr., J. Food Protect., 48, 1985, č. 5, s. 416.
- [6] NIRENBERG, H., Mitt. Biol. Bundesanst. land- u. Forstwirtschaft., Berlin-Dahlem, H. 169, 1976, s. 117.
- [7] JESENSKÁ, Z. – HAVRÁNEKOVÁ, D. – ŠAJBIDOROVÁ, I., Čs. Hyg., 28, 1983, č. 1, s. 11.
- [8] ŠEPITKOVÁ, J. – JESENSKÁ, Z., Bull. PV, 25 (5), 1986, č. 2, s. 141.
- [9] JESENSKÁ, Z. – POLSTER, M., Z. Gesamte Hyt., 29, 1983, č. 9, s. 515.
- [10] Vestník MZ SSR, XXXIV, 1986, čiastka 12–13, normatívna časť 7.

Эффективность разъединяющего теста для определения степени мицетической контаминации зерна хлебных злаков

Резюме

Работа приносит результаты проверки разъединяющего теста для определения степени контаминации зерна хлебных злаков штаммом *Aspergillus flavus* и *Fusarium* sp. с помощью насыщенного раствора хлористого натрия. Анализ микофлоры 37 образцов показал, что метод не подходит в условиях Словацкой социалистической республики. Корреляционные коэффициенты между суммой выброшенных зерн и суммой зерн контаминированных штаммом *A. flavus* следовательно *Fusarium* sp. были низкие и неубедительные.

Efficiency of separating test used for the determination of an extent of mycetic grain contamination

Summary

The separating test used for the determination of mycetic grain contamination was verified in this work. Grains were contaminated through *Aspergillus flavus* and *Fusarium* sp. strains using the saturated sodium chloride solution. This method is not utilizable in our country. This fact resulted from the mycoflora analysis of 37 samples. Correlation coefficients between the quantity of washed up grains and the quantity of grains contaminated through the strains *A. flavus* or *Fusarium* sp. were low and insignificant.