

HELENA BIS^{1,2}, KRZYSZTOF FRĄCZEK¹, EWA MĘDRELA-KUDER^{2,3}

¹Katedra Mikrobiologii

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie

²Małopolska Wyższa Szkoła Zawodowa im. Józefa Dietla w Krakowie

³Zakład Higieny i Wychowania Zdrowotnego

Akademia Wychowania Fizycznego im. Bronisława Czecha w Krakowie

PRODUKCJA MIKOTOKSYN PRZEZ GRZYBY WYZOŁOWANE Z WARZYW OKOPOWYCH

Streszczenie. Badania mikologiczne wybranych warzyw korzeniowych (marchew) i bulwiastych (buraki, ziemniaki) prowadzono od lipca 2008 do kwietnia 2009 roku. Raz w miesiącu na placu Nowy Kleparz w Krakowie kupowano po 1 kg tych warzyw od trzech różnych producentów. Na podstawie badań stwierdzono w badanym materiale występowanie zróżnicowanych liczebności grzybów mikroskopowych (*Micromycetes*). Najwięcej ich stwierdzono w marchwi, następnie w burakach, a najmniej w ziemniakach. Oprócz analizy ilościowej wykonano także badania taksonomiczne. Na ich podstawie stwierdzono 26 gatunków grzybów, z których 11 uznano za potencjalnie toksynotwórcze. W teście biologicznym przebadano wszystkie wyizolowane szczepy (96) gatunków potencjalnie toksynotwórczych, chcąc stwierdzić, które z nich produkują metabolity zwane mikotoksynami. Na tej podstawie stwierdzono, że tylko 40% można uznać za toksyczne. Metabolity pozostałych szczepów nie wykazały właściwości toksycznych.

Słowa kluczowe: grzyby mikroskopowe, mikotoksyny, marchew, burak, ziemniak

Wstęp

Grzyby saprofityczne wspólnie z bakteriami stanowią główny czynnik biologiczny odpowiedzialny za rozkład materii organicznej, gromadzonej w środowiskach naturalnych. W życiu człowieka rola grzybów mikroskopowych (*Micromycetes*) jest bardzo ważna i wielokierunkowa, ale nie zawsze pozytywna (BOGACKA i MATKOWSKI 2001, PIERZYNOWSKA i GRZESIUK 2001). Ich negatywna działalność to rozwój w postaci pleśni na wielu artykułach spożywczych stanowiących pożywienie dla ludzi i zwierząt. Bogaty zestaw enzymów umożliwia grzybom mikroskopowym rozkład białek, lipidów, polisacharydów oraz innych składników produktów spożywczych, tym samym dyskwalifikując wiele z nich jako nadające się do spożycia. Mikroflora znajdująca się na po-

wierzchni warzyw jest zależna od ich rodzaju. Warzywa korzeniowe i bulwiaste są znacznie silniej skażone przez mikroorganizmy niż inne. Decyduje o tym ich różnorodny skład chemiczny. Zależy on głównie od odmiany, stopnia dojrzałości, warunków klimatycznych w czasie wegetacji, a także od warunków zbioru, transportu, przechowywania i przetwarzania. Grzyby strzępkowe rozwijające się na warzywach w trakcie ich przechowywania w pomieszczeniach o zróżnicowanej wilgotności wykazują zdolność produkcji toksycznych metabolitów biologicznie czynnych – mikotoksyn (PITTET 1998, DYNOWSKA 2006). Są to produkty szczepów toksynotwórczych grzybów z klasy *Deuteromycetes* o niekorzystnym działaniu na makro- i mikroorganizmy (CHEŁKOWSKI 1985, KOZAK 2003, DYNOWSKA 2006).

Morfologicznie szczepy toksynotwórcze i nietoksynotwórcze grzybów nie wykazują żadnych różnic, stąd żywność, na której stwierdza się obecność grzybów mikroskopowych, a w konsekwencji możliwość wystąpienia w niej toksyn grzybowych, nie powinna być dopuszczona do sprzedaży i konsumpcji przez ludzi (POPOWSKI 2000, WIECZOREK 2003).

Celem niniejszej pracy była ocena mikologicznego zanieczyszczenia marchwi zwyczajnej, buraków ćwikłowych i ziemniaków sprzedawanych w wolnym handlu i poznanie uzdolnień szczepów toksynotwórczych wyizolowanych z tych produktów do produkcji mikotoksyn.

Material i metody

Badania mikologiczne prowadzono od lipca 2008 do kwietnia 2009 roku. Raz w miesiącu kupowano na placu Nowy Kleparz w Krakowie po 1 kg marchwi, buraków i ziemniaków od trzech różnych producentów, stale tych samych. Oznaczono ich numerami 1, 2, 3. Analizę mikologiczną wykonywano metodą płytkową rozcieńczeń, każdorazowo do 2 h od dokonania zakupów, w trzech powtórzeniach. Grzyby hodowano na agarze brzezkowym w temperaturze 28°C przez 5 dni, a następnie izolowano czyste ich kultury i przeszczepiano na podłoża diagnostyczne zgodnie z przyjętymi wymogami (FASSATIOWA 1983, SAMSON i FRISVAD 2004). Badanie toksynotwórczości dotyczyło grzybów wyizolowanych z badanych produktów uznanych powszechnie za potencjalnie toksynotwórcze, w celu stwierdzenia ich zdolności do produkcji toksyn. Grzyby te przeszczepiano na płynne podłoże Eldrige'a. Hodowlę prowadzono przez 14 dni w temperaturze pokojowej. Zdolność produkcji toksyn oznaczano w teście biologicznym (MIRČNIK 1957), wykorzystując nasiona rośliny testowej – zielonego grochu 'Nike' ST93137(115) 24G/C. Był to groch łuskany o nasionach marszczonych. Za toksyczne uznano te szczepy grzybów, których metabolity spowodowały zahamowanie energii i zdolności kiełkowania nasion rośliny testowej powyżej 30% w stosunku do kontroli.

Wyniki i dyskusja

Mikologiczne badania wybranych do doświadczenia warzyw korzeniowych i bulwiastych wykazały duże zróżnicowanie liczebności grzybów mikroskopowych. Jak wynika z danych zebranych w tabeli 1, w ciągu całego doświadczenia największą średnią

Tabela 1. Liczebność grzybów na powierzchni badanych warzyw (jtk·g⁻¹)
 Table 1. The number of fungi on the surface of vegetables under study (cfu·g⁻¹)

Warzywo	Numer producenta	2008						2009				Średnia arytmetyczna
		VII	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	
Marchew zwyczajna	1	112	145	123	633	1 350	730	580	610	720	810	581,3
	2	85	168	800	694	930,0	1 100	937	739	690	540	670
	3	74	222	185	120	540	610	820	560	120	170	342
Burak ćwikłowy	1	115	47	78	612	590	786	630	230	375	115	358
	2	195	81	323	410	632	612	694	795	692	230	466
	3	235	47	98,0	312	442	510	490	476	531	170	331
Ziemniak	1	148	669	75	116	219	331	175	116	196	230	167
	2	127	81	63	120	176	230	147	120	173	195	143
	3	140	93	101	146	193	242	196	230	310	270	192

arytmetyczną liczebność grzybów wyhodowanych z marchwi stwierdzono w produktach pochodzących od producenta 2 – 670 jtk·g⁻¹ korzeni marchwi. Niewiele mniejszą liczebność, bo 581 jtk·g⁻¹ marchwi, stwierdzono w produktach od producenta 1, a najmniejszą – 342 jtk·g⁻¹ marchwi – w produktach od producenta oznaczonego cyfrą 3. Ta sama zależność wystąpiła w przypadku liczebności grzybów wyhodowanych z buraków. Największą średnią arytmetyczną liczebność grzybów stwierdzono w produktach od producenta 2 – 466 jtk·g⁻¹ buraków, mniejszą – w produktach od producenta 1 – 358 jtk·g⁻¹ buraków, a najmniejszą – 331 jtk·g⁻¹ buraków – w produktach od producenta 3. Z ziemniaków wyizolowano znacznie mniej grzybów niż z marchwi i buraków. Ziemniaki kupowane od producenta nr 3 charakteryzowały się największą średnią arytmetyczną liczebnością grzybów – 192 jtk·g⁻¹ ziemniaków, kupowane od producenta nr 1 nieco mniejszą – 167 jtk·g⁻¹ ziemniaków, a najmniejszą kupowane od producenta nr 2 – 143 jtk·g⁻¹ ziemniaków. Analiza statystyczna nie ujawniła ogólnie istotnego ($n \leq 0,05$) wpływu rodzaju warzyw okopowych na liczebność występujących na ich korzeniach czy bulwach grzybów.

Oprócz analizy ilościowej wykonano także badania taksonomiczne. Skład gatunkowy grzybów przedstawiono w tabeli 2. Z badanych warzyw wyizolowano 26 gatunków grzybów mikroskopowych (*Micromycetes*). Są to przedstawiciele przede wszystkim klasy *Deuteromycetes*. Wśród wyizolowanych gatunków grzybów stwierdzono obecność 11 potencjalnie toksynotwórczych (tab. 3). Z badanych warzyw wyizolowano 96 szczepów grzybów. Były one reprezentowane przez następujące potencjalnie toksynotwórcze gatunki:

- marchew – *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium macrocarpum*, *Helminthosporium velutinum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium tardum*,

Tabela 2. Skład gatunkowy grzybów mikroskopowych (*Micromycetes*) wyizolowanych z badanych warzywTable 2. Species composition of microscopic fungi (*Micromycetes*) isolated from vegetables under study

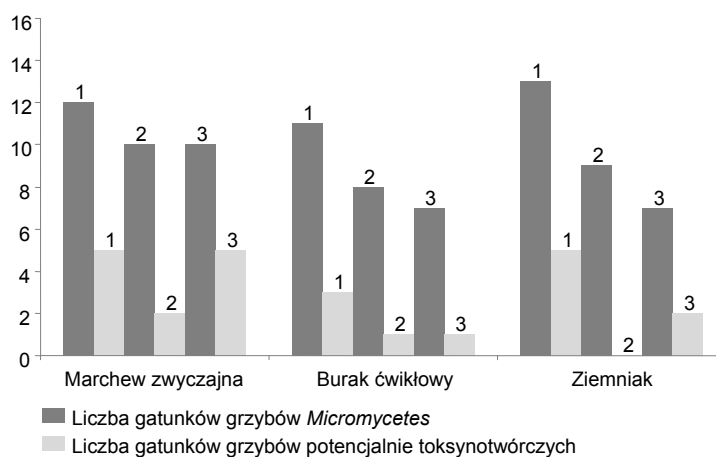
Lp.	Gatunek grzyba	Numer producenta									
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
		marchew zwyczajna			burak ćwikłowy			ziemniak			
1	<i>Absidia glauca</i>	+		+		+				+	+
2	<i>Alternaria alternata</i>								+		
3	<i>Alternaria geophila</i>		+		+					+	+
4	<i>Aspergillus fumigatus</i>		+	+					+		
5	<i>Aspergillus niger</i>	+			+	+					
6	<i>Aspergillus versicolor.</i>								+		+
7	<i>Botrytis cinerea</i>			+			+			+	
8	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+		+					+		
9	<i>Cladosporium herbarium</i>	+	+		+		+	+	+	+	
10	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	+				+					
11	<i>Fusarium graminearum</i>								+		+
12	<i>Fusarium moniliforme</i>				+						
13	<i>Glocladium roseum</i>								+	+	
14	<i>Helminthosporium velutinum</i>	+	+	+							
15	<i>Humicola grisea</i>		+						+		+
16	<i>Mortierella candelabrum</i>				+						
17	<i>Mucor globosus</i>	+				+			+	+	
18	<i>Mucor hiemalis</i>		+	+	+		+			+	+
19	<i>Penicillium citrinum</i>	+							+		
20	<i>Penicillium notatum</i>		+	+		+			+		
21	<i>Penicillium rugulosum</i>			+	+						
22	<i>Penicillium tardum</i>	+		+	+						
23	<i>Rhizopus nigricans</i>	+	+		+	+	+			+	+
24	<i>Rhodotorula glutinis</i>	+	+	+	+		+	+	+	+	
25	<i>Verticillium cellulosae</i>				+				+		
26	<i>Zygorrhynchus moelleri</i>	+	+			+	+		+		

- buraki – *Cladosporium macrocarpum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium tardum*,
- ziemniaki – *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium citrinum*.

Tabela 3. Gatunki grzybów potencjalnie toksynotwórczych stwierdzone w badanych warzywach
 Table 3. Species of fungi potentially toxin-producing obtained in vegetables under study

Lp.	Gatunek grzyba	Numer producenta								
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
		marchew zwyczajna			burak ćwikłowy			ziemniak		
1	<i>Alternaria alternata</i>							+		
2	<i>Aspergillus fumigatus</i>		+	+				+		
3	<i>Aspergillus versicolor</i>							+		+
4	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+		+				+		
5	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	+				+				
6	<i>Fusarium graminearum</i>						+			+
7	<i>Fusarium moniliforme</i>				+					
8	<i>Helminthosporium velutinum</i>	+	+	+						
9	<i>Penicillium citrinum</i>	+						+		
10	<i>Penicillium rugulosum</i>			+	+					
11	<i>Penicillium tardum</i>	+		+	+					

Porównanie liczby gatunków grzybów wyizolowanych z powierzchni warzyw pochodzących od poszczególnych producentów z liczebnością gatunków grzybów potencjalnie toksynotwórczych przedstawiono na rysunku 1.



Rys 1. Liczba gatunków grzybów *Micromycetes* i liczba gatunków grzybów potencjalnie toksynotwórczych wyizolowanych z badanych warzyw; 1 – producent nr 1, 2 – producent nr 2, 3 – producent nr 3

Fig. 1. The number of species of fungi *Micromycetes* and the number of species of potentially toxin-producing fungi isolated from vegetables under study; 1 – producer No. 1, 2 – producer No. 2, 3 – producer No. 3.

Wszystkie szczepy potencjalnie toksynotwórczych gatunków grzybów przebadano w teście biologicznym. Tylko 40% z nich można uznać za toksyczne. Hamowały one energię kiełkowania nasion rośliny testowej w granicach od 38 do 82%, a zdolność kiełkowania – w granicach od 45 do 96% w stosunku do kontroli. Metabolity pozostałych szczepów nie wykazały właściwości toksycznych. Najsilniejszym działaniem fitotoksycznym odznaczały się metabolity następujących szczepów:

- *Alternaria alternata*, oznaczony symbolem Z1 (wyizolowany z ziemniaków pochodzących od producenta nr 1), hamował energię kiełkowania nasion w 65%, a zdolność kiełkowania nasion – w 93% w stosunku do kontroli,
- *Aspergillus versicolor*, oznaczony symbolem Z14 (wyizolowany z ziemniaków pochodzących od producenta nr 3), hamował energię kiełkowania nasion w 78%, a zdolność kiełkowania nasion – w 85% w stosunku do kontroli,
- *Fusarium graminearum*, oznaczony symbolem B4 (wyizolowany z buraków pochodzących od producenta nr 3), hamował energię kiełkowania nasion w 53%, a zdolność kiełkowania nasion – w 82% w stosunku do kontroli,
- *Penicillium citrinum*, oznaczony symbolem M14 (wyizolowany od producenta nr 1), hamował energię kiełkowania nasion w 82%, a zdolność kiełkowania nasion – w 96% w stosunku do kontroli.

Najsłabsze okazały się metabolity szczepów: *Cladosporium cladosporioides*, oznaczony symbolem M36 (wyizolowany z marchwi pochodzącej od producenta nr 3), i *Helminthosporium velutinum*, oznaczony symbolem M40 (wyizolowany z marchwi pochodzącej od tego samego producenta). Hamowały one energię kiełkowania nasion w 37% i 40%, a zdolność kiełkowania nasion – w 51% i 64% w stosunku do kontroli. Metabolity pozostałych przebadanych szczepów grzybów potencjalnie toksynotwórczych wyizolowanych z badanych warzyw okazały się średnio toksyczne.

Produkowane przez badane szczepy grzybów mikotoksyny są substancjami odznaczającymi się silną aktywnością biochemiczną (CHEŁKOWSKI 1985, KOZAK 2003, DYNOWSKA 2006). W szczególności rodzaje: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* mają zdolność syntezy znacznej liczby mikotoksyn. Mogą one być tworzone albo przez pierwotnie fitopatogeniczne gatunki grzybów (np. *Fusarium graminearum*) już na roślinach w trakcie ich wegetacji jeszcze na polu, albo też podczas magazynowania środków spożywczych, surowców i pasz, w sprzyjających ich rozwojowi warunkach (np. *Penicillium* sp.) (MICHALCZYK i MACURA 2008). Mikotoksyny są przyjmowane przede wszystkim drogą pokarmową lub przez inhalację. W przypadku drogi pokarmowej zagrożenie dla człowieka jest spowodowane możliwością spożycia skażonych środków spożywczych (WIŚNIEWSKA-DMYTROW i KOZAK 1996, KOZAK 2003, GRAJEWSKI 2006).

Mikotoksyny, które dostały się do organizmu ludzkiego lub zwierzęcego, mogą wywoływać albo natychmiastowe skutki w postaci ciężkich uszkodzeń narządów wewnętrznych, albo, jeśli zostały pobrane w subtoksycznych dawkach, mogą się w nim kumulować, prowadząc do zmian nowotworowych lub chronicznych wieloobjawowych chorób. Ten drugi rodzaj działania jest szczególnie niebezpieczny i trudny do wykrycia, ponieważ wskutek znacznej odległości czasowej pomiędzy spożyciem zanieczyszczonej żywności a wystąpieniem objawów chorobowych trudno skojarzyć te dwa fakty. W ten sposób producent żywności (warzyw) może uniknąć odpowiedzialności za wypuszczenie na rynek produktów zawierających mikotoksyny, niezależnie od tego, czy jest to podyktowane niewiedzą, czy chęcią uniknięcia strat (POPOWSKI 2000).

Do chwili obecnej nie ma w Polsce norm, które określałyby dopuszczalny stopień zakażenia mikotoksynami świeżych warzyw przeznaczonych do bezpośredniej konsumpcji lub przetwórstwa. Weryfikacja jakości tych surowców rolnych polega na wizualnej ocenie ich świeżości, wyglądu i ewentualnie stopnia zanieczyszczenia (OBIEDZIŃSKI i BARTNIKOWSKI 2000, MICHALCZYK i MACURA 2008).

Wnioski

1. Na powierzchni korzeni marchwi zwyczajnej i buraka ćwikłowego oraz bulw ziemniaka stwierdzono występowanie grzybów mikroskopowych (*Micromycetes*) o zróżnicowanej liczebności i składzie gatunkowym.

2. W trakcie badań wyizolowano 26 gatunków grzybów należących przede wszystkim do klasy *Deuteromycetes*, z których 11 należało do gatunków potencjalnie toksynotwórczych: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium macrocarpum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium velutinum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium tardum*.

3. Z przebadanych w teście biologicznym szczepów gatunków potencjalnie toksynotwórczych 40% okazało się szczepami toksycznymi. Ich metabolity hamowały energię kiełkowania nasion rośliny testowej w granicach od 38 do 82%, a zdolność kiełkowania nasion – w granicach od 45 do 96% w stosunku do kontroli.

4. Najsilniejszym działaniem fitotoksycznym odznaczały się szczepy: *Alternaria alternata* Z1, *Aspergillus versicolor* Z14 (obydwa wyizolowane z ziemniaków), *Fusarium graminearum* B4 (wyizolowany z buraków) i *Penicillium citrinum* M14 (wyizolowany z marchwi).

5. Najsłabszym działaniem fitotoksycznym odznaczały się szczepy *Cladosporium cladosporioides* M36 i *Helminthosporium velutinum* M40 (wyizolowane z ziemniaków).

Literatura

- BOGACKA E., MATKOWSKI K., 2001. Wpływ grzybów na zdrowie ludzi. *Mikol. Lek.* 8, 3-4: 175-178.
- CHEŁKOWSKI J., 1985. Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby i mikotoksykozy. Wyd. SGGW, Warszawa.
- DASZEK W., LIEWELLYN G., 1982. Aflatoxins and plants. *Post. Mikrobiol.* 21, 1-2: 65-81.
- DYNOWSKA M., 2006. Kliniczne aspekty zakażeń grzybami pleśniowymi. W: Mikotoksyny i grzyby pleśniowe – zagrożenia dla człowieka i zwierząt. Red. J. Grajewski. Wyd. UKW, Bydgoszcz: 67-81.
- FASSATIOWA O., 1983. Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej. WN-T, Warszawa.
- GRAJEWSKI J., 2006. Mikotoksyny i mikotoksykozy zagrożeniem dla człowieka i zwierząt. W: Mikotoksyny i grzyby pleśniowe – zagrożenia dla człowieka i zwierząt. Red. J. Grajewski. Wyd. UKW, Bydgoszcz: 117-147.
- KOZAK K., 2003. Mikotoksyny – nadal groźne. Oddział Higieny Żywności, Żywnienia i Przedmiotów Użytku, Warszawa.
- MICHALCZYK M., MACURA R., 2008. Wpływ warunków przechowywania na jakość wybranych, dostępnych w obrocie handlowym, mało przetworzonych produktów warzywnych. *Żywn. Wyd. Nauk. PTTŻ* 3: 96-107.

- MIRČNIK T.G., 1957. O gribach obuslovlivajušičih toksičnost' dernowo-podzolistoj počvy različnoj stepeni okul'turenosti. *Mikrobiologija* 26: 78-86.
- OBIEDZIŃSKI M., BARTNIKOWSKI E., 2000. Skażenia żywności pochodzenia zwierzęcego dioksynami a zagrożenie konsumenta. *Przem. Spoż.* 1: 44-47.
- PIERZYŃNOWSKA J., GRZEŚIUK E., 2001. Czy należy obawiać się grzybów pleśniowych? *Przeł. Hod.* 2: 45-49.
- PITTET A., 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updates review. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)* 149, 6: 479-492.
- POPOWSKI J., 2000. Pleśnie i ich toksyny a bezpieczeństwo żywności. *Żywn. Żyw. Prawo Zdr.* 1: 109-114.
- SAMSON R., FRISVAD J., 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium*; new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Stud. Mycol.* 49.
- WIECZOREK C., 2003. Mikologiczne skażenia żywności. *Żywn. Wyd. Nauk. PTTŻ* 3: 119-128.
- WIŚNIEWSKA-DMYTROW H., KOZAK A., 1996. Skażenia surowców i pasz przemysłowych mikotoksynami na podstawie badań własnych w latach 1990-1995. W: *Mycotoxins in food, raw materials and industrial foolders*. Red. J. Grajewski. WSP, Bydgoszcz: 48-49.

MYCOTOXINS PRODUCTION BY FUNGI ISOLATED FROM UNDERGROUND AND ROOT VEGETABLES

Summary. Mycological tests of selected root vegetables (carrot) and tuber vegetables (beetroots, potatoes) were carried out between July 2008 and April 2009. Once a month, 1 kg of each of these vegetables was bought from three different suppliers at Nowy Kleparz square in Cracow. The tests revealed different counts of microscopic fungi (*Micromycetes*) present in the tested material. The highest concentration of fungi was shown in carrots and beetroots, and the lowest – in potatoes. Apart from the qualitative analysis, taxonomic tests were carried out. They revealed the presence of 26 species of fungi, of which 11 were potentially able to produce toxins. All isolated strains (96) of potentially toxin-producing species were examined in biological tests in order to determine which strains produce specific metabolites – mycotoxins. It was established that only 40% of the tested metabolites can be considered toxic. The metabolites of remaining strains showed no toxic properties.

Key words: microscopic fungi, mycotoxins, carrot, beetroot, potato

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Helena Bis, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, Poland

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

18.10.2010

Do cytowania – For citation:

*Bis H., Frączek K., Mędreła-Kuder E., 2010. Produkcja mikotoksyn przez grzyby wyizolowane z warzyw okopowych. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #69.*