

The risk of winter oilseed rape contamination by ochratoxin A, depending on their storage conditions

Ryzyko skażenia nasion rzepaku ozimego ochratoksyną A w zależności od warunków ich przechowywania

Grzegorz Wickiel, Romuald Gwiazdowski, Katarzyna Marcinkowska

Summary

Storage conditions are an important factor in colonization of agricultural goods by pathogenic fungi and contamination by mycotoxins. The aim of this study was to determine the effect of the winter oilseed rape storage conditions on the grain contamination by ochratoxin A. The study was conducted at the Department of Plant Protection Research Institute of Plant Protection – National Research Institute in Poznan. Mycological analysis of the examined seeds of the oilseed rape showed the presence of fungi such as *Penicillium* spp., and *Aspergillus* spp. Chromatographic analysis showed very low levels of ochratoxin A in the rapeseed tested immediately after harvest, as well as in the samples of seeds stored in the conditions simulating storage (below the quantitation limit) and low levels of ochratoxin A in the samples stored in the conditions that stimulate the secretion of toxins. The highest contamination with toxins was found in a sample of seeds of the Monolith and it amounted to 0.2 µg/kg OTA (ochratoxin A).

Key words: winter oilseed rape, storage, OTA (ochratoxin A)

Streszczenie

Warunki środowiskowe, w których przechowywane są płody rolne, stanowią ważny czynnik wpływający na zasiedlenie przez grzyby patogeniczne oraz zanieczyszczenie mikotoksynami. Celem badań było określenie wpływu warunków przechowywania nasion rzepaku ozimego na kontaminację nasion ochratoksyną A. Badania prowadzono w Zakładzie Badania Środków Ochrony Roślin Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. Analiza mikologiczna nasion wykazała obecność grzybów, m.in. z rodzajów: *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. Analiza chromatograficzna wskazuje na bardzo niski poziom ochratoksyny A w nasionach rzepaku badanych bezpośrednio po zbiorze, jak również w próbkach nasion przechowywanych w warunkach symulujących magazynowe (poniżej granicy oznaczalności). Niski poziom ochratoksyny A stwierdzono także w próbkach przechowywanych w warunkach stymulujących wydzielanie toksyny. Najwyższe skażenie toksynami stwierdzono w próbce nasion odmiany Monolit i wynosiło ono 0,2 µg/kg OTA (ochratoksyna).

Słowa kluczowe: nasiona rzepaku ozimego, przechowywanie, ochratoksyna A (OTA)

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
G.Wickiel@iorpib.poznan.pl; R.Gwiazdowski@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Rzepak (*Brassica napus* L.) jest ważnym surowcem w produkcji środków spożywczych i materiałów paszowych (Kersten i wsp. 2005; Smulikowska i Pastuszewska 2005; Szostak 2005). Nasiona rzepaku narażone są podczas wegetacji na porażenie przez patogeniczne grzyby z rodzaju, np. *Alternaria* i *Phoma*, a następnie podczas składowania po zbiorze, na porażenie przez grzyby przechowalnicze, głównie z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus* (Janowicz 2005). Zasiedlenie nasion siewnych rzepaku przez grzyby pleśniowe prowadzi zazwyczaj do obniżenia plonowania, jakości i wartości technologicznej plonu, a dodatkowo może powodować zanieczyszczenie nasion wytwarzanymi przez pleśń, trującymi metabolitami wtórnymi zwanymi mikotoksynami (Korbas i wsp. 2011).

Celem badań było określenie wpływu warunków przechowywania na skażenie nasion rzepaku ochratoksyną A.

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał badawczy stanowiły nasiona pięciu odmian rzepaku ozimego, pochodzące z obiektów niechronionych, zebrane w 2011 roku w Polowej Stacji Doświadczalnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Winnej Górze.

Materiał bezpośrednio po zbiorze zbadano pod kątem mikologicznym oraz mikotoksykologicznym, a następnie podzielono na dwie części i przechowywano przez trzy miesiące w różniących się warunkach temperatury i wilgotności. Jedną połowę umieszczono w suchym, nieogrzewanym pomieszczeniu symulującym zmienne warunki magazynowe (temperatura od –1 do 20°C, wilgotność od 53 do 75%), a drugą w warunkach kontrolowanych, stymulujących rozwój grzybów przechowalniczych z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus* oraz wydzielanie przez nie ochratoksyny A (temperatura: 25°C i wilgotność: 90%).

Badania mikrobiologiczne

Nasiona nieodkażane oraz odkażane przez 2 minuty w 5% podchlorynie sodu wykładano w czterech powtórzeniach, w ilości po 100 sztuk na płytce Petriego

(Ø – 200 mm) z pożywką ziemniaczano-dekstrozo-agarową (PDA – Potato Dextrose Agar, Difco™). Po 7–9 dniach inkubacji w temperaturze pokojowej wykonano jakościową i ilościową analizę zasiedlenia nasion przez grzyby przy użyciu kluczy mikologicznych (Marcinkowska 2003; Matur i Kongsdal 2003; Jajor 2006).

Analizy chromatograficzne

Nasiona rozdrobniono za pomocą młynka laboratoryjnego, a następnie ekstrahowano mieszaniną metanolu z wodą w stosunku 3 do 1. Ekstrakt oczyszczano, zgodnie z załączoną instrukcją producenta, na kolumnie powinowactwa immunologicznego OchraStar firmy Romer Labs Inc. Eluat odparowano i rozpuszczono w fazie ruchomej do chromatografii. Zawartość ochratoksyny A w badanych nasionach określono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), przy zastosowaniu systemu Waters Alliance 2695 z detektorem fluorescencyjnym FLD – Waters 2475. Rozdział przeprowadzono na kolumnie Waters XBridge C18 (50 × 4,6 mm; 3,5 µm) z wykorzystaniem jako fazy mobilnej mieszaniny acetonitrylu/wody/kwasu octowego w proporcji: 54/45/1, przy przepływie 0,5 ml/min. Ochratoksynę A oznaczano przy długości fali wzbudzenia i emisji 330/460 nm (Attallah i wsp. 2008).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W rezultacie analizy mikologicznej, na badanych nasionach rzepaku ozimego stwierdzono wystąpienie zarówno grzybów pasożytniczych, jak i saprofitycznych. Najczęściej identyfikowano grzyby z rodzajów: *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Phoma* sp., *Botrytis* sp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Cladosporium* spp. i innych niezarodnikujących. Porównując zasiedlenie różnych odmian rzepaku ozimego grzybami z rodzaju *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp. (nasiona zarówno nieodkażone, jak i odkażone) nie stwierdzono istotnych różnic w średniej liczbie kultur. Analizę statystyczną wykonano testem Student-Newman-Keuls (tab. 1).

Tabela 1. Średnia liczba kultur *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp. na nasionach rzepaku
Table 1. Average number of *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp. cultures on rape seeds

Odmiana Cultivar	<i>Penicillium</i> spp.		<i>Aspergillus</i> spp.	
	nieodkażone non-disinfected	odkażone disinfected	nieodkażone non-disinfected	odkażone disinfected
Bazyl	2,8a	0,5a	3,5a	2,3a
Monolit	2,8a	1,8a	3,3a	1,0a
Lisek	4,0a	3,3a	3,0a	2,0a
Rasmus	3,3a	1,5a	4,0a	2,3a
Californium	2,0a	0,5a	1,8a	1,5a

Wartości średnie oznaczone tą samą literą istotnie się nie różnią (p = 0,05, Student-Newman-Keuls)

The mean values followed by the same letter do not differ significantly (p = 0.05, Student-Newman-Keuls)

Tabela 2. Zawartość ochratoksyny A w nasionach różnych odmian rzepaku po zbiorach i po przechowywaniu [$\mu\text{g/kg}$]
 Table 2. The content of ochratoxin A on winter rape seeds of different cultivars at harvesting and after storage [$\mu\text{g/kg}$]

Mikotoksyny Mycotoxins [$\mu\text{g/kg}$] ppb	Termin badań Date of analysis	Odmiany – Cultivars				
		Bazył	Monolit	Lisek	Rasmus	Californium
Ochratoksyna A	po zbiorze after harvest	nd	nd	nd	nd	nd
	po przechowywaniu w warunkach „stymulujących” after storage in „stimulating” conditions	0,1	0,2	0,1	nd	0,1
	po przechowywaniu w warunkach „magazynowych” after storage in „warehouse” conditions	nd	nd	nd	nd	nd

nd – nie wykryto – not detected

Przeprowadzona analiza chromatograficzna wykazała bardzo niski poziom ochratoksyny A w nasionach rzepaku badanych bezpośrednio po zbiorze, jak również w próbkach nasion przechowywanych w warunkach symulujących magazynowe (poniżej granicy oznaczalności) oraz niski poziom ochratoksyny A w próbkach przechowywanych w warunkach stymulujących wydzielanie toksyny. Najwyższe skażenie toksynami stwierdzono w próbce nasion odmiany Monolit i wynosiło ono 0,2 $\mu\text{g/kg}$ OTA (tab. 2).

W badaniach przeprowadzonych przez Madhyastha i wsp. (1993) nie wykryto obecności ochratoksyny A w nasionach rzepaku pochodzących z próbek kontrolnych, jednakże zaobserwowano, że przechowywanie próbek nasion inokulowanych gatunkiem *Aspergillus ochraceus* w warunkach stymulujących wzrost jego biomasy, powoduje jednoczesny wzrost zanieczyszczenia nasion badaną toksyną. Brazauskienė i wsp. (2006) oznaczyli w badanych bezpośrednio po zbiorze próbkach nasion niewielką ilość ochratoksyny A i zaobserwowali, że prze-

chowywanie próbek przez osiem miesięcy w temperaturze 16–18°C przy wilgotności względnej 48–50%, powoduje obniżenie ilości toksyn. Badacze zaobserwowali ponadto, że zanieczyszczenie ochratoksyną A zależy od odmiany porażonego rzepaku.

Wnioski / Conclusions

1. Analiza mikologiczna wykazała obecność w zebranych nasionach rzepaku grzybów z rodzaju *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp., przy czym porażenie nimi było niewielkie.
2. Nasiona rzepaku bezpośrednio po zbiorze wykazywały bardzo niski poziom skażenia toksynami pleśniowymi.
3. Przechowywanie w warunkach sprzyjających rozwojowi grzybów, może powodować zanieczyszczenia nasion rzepaku mikotoksynami.

Literatura / References

- Attallah E.R., Gomaa A.M., Amer M.E., Gad S.A. 2008. Validation of analytical method for determination ochratoxin A in cereals by C18 solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Food Agric. Environ. 6 (2): 130–133.
- Brazauskienė I., Petraitienė E., Mankevičienė A. 2006. Effect of genotype and environmental factors on rape seed contamination with mycotoxins and mycotoxin-producing fungi. Ekologija 3: 14–20.
- Janowicz L. 2005. Przechowywanie surowca. s. 151–158. W: „Technologia Produkcji Rzepaku” (Cz. Muśnicki, I. Bartkowiak-Broda, M. Mrówczyński, red.). Wieś Jutra, Warszawa, 203 ss.
- Jajor E. 2006. Zasiadlenie przez grzyby nasion odmian populacyjnych i mieszańcowych rzepaku pochodzącego ze zbioru 2004 roku. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 46 (2): 572–575.
- Kersten J., Rohde H.R., Nef E. 2005. Principles of Mixed Feed Production. Components. Processes. Technology. Agrimedia GmbH, Bergen/Dumme, Germany, 336 pp.
- Korbas M., Jajor E., Danielewicz J., Wickiel G. 2011. Fungi of oilseed rape seeds occurrence and importance. p. 141–154. In: „Advances in Research and Technology of Rapeseed Oil” (E. Szłyk, ed.). Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 218 pp.
- Madhyastha M.S., Marquardt R.R., Frohlich A.A. 1993. Growth and ochratoxin production of *Aspergillus alutaceus* on seed of wheat and rapeseed cultivars. Can. J. Plant Sci. 73 (1): 163–166.
- Marcinkowska J. 2003. Oznaczanie Rodzajów Grzybów Ważnych w Patologii Roślin. Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa, 328 ss.
- Matur S., Kongsdal O. 2003. Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi. International Seed Testing Association, CH-Switzerland, 425 pp.
- Smulikowska S., Pastuszewska B. 2005. Rzepak w żywieniu zwierząt. s. 26–33. W: „Technologia Produkcji Rzepaku” (Cz. Muśnicki, I. Bartkowiak-Broda, M. Mrówczyński, red.). Wieś Jutra, Warszawa, 203 ss.
- Szostak W.B. 2005. Olej rzepakowy w żywieniu człowieka. s. 22–25. W: „Technologia Produkcji Rzepaku” (Cz. Muśnicki, I. Bartkowiak-Broda, M. Mrówczyński, red.). Wieś Jutra, Warszawa, 203 ss.