

MYCOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF BARLEY GRAIN AND ITS PRODUCTS

Summary

The aim of the study was to perform the analysis of trichothecenes and zearalenone content in barley grain and food commodities such as grits, flour and flakes, coming from organic and conventional farms. The analysed material included 53 samples, with 31 from organic and 22 from conventional farms. The food products had been purchased in local shops in kujawsko-pomorskie province. Raw materials also came from the same region. Each sample was analysed in 3 replicates. Eight mycotoxins were determined using HPLC-MS/MS method: nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol (3ADON), monoacetoxyscirpenol (MAS), diacetoxyscirpenol (DAS), T-2 and HT-2 toxins and zearalenone (ZEN). Sample preparation was made using Bond Elut® Mycotoxin columns (Varian) and internal standards (IS) ^{13}C -DON, ^{13}C -T-2, ^{13}C -HT-2, ZAN. HT-2 toxin and NIV dominated in the analysed grains and food products (30% and 28% respectively), while 3ADON was not detected in a single sample. Among the 8 analysed mycotoxins it was NIV that dominated and its highest concentration was 85.6 ppb in the raw material from an organic farm. The highest number of mycotoxins was found in the grain from a conventional farm, with HT-2 and T-2 toxins prevailing (80% and 70% samples, respectively). Their concentration was also the highest in this group (13.8 ppb and 23.8 ppb, respectively). The third highest concentration turned out to be of DON (65.1 ppb). ZEN was most commonly present in food products coming from conventional farms - 42% samples. The contamination of organic and conventional products was comparable. Mean concentration of the analysed mycotoxins was much lower in food products than in raw material. None of the analysed products contained 3ADON or DAS. Moreover, neither DON was detected in any of the organic products nor MAS in the conventional ones. No tested sample exceeded the maximum acceptable levels of mycotoxins (Commission Regulation 1881/2006 EC).

Key words: barley, barley products, mycotoxins, organic farming, conventional farming

MIKOTOKSYKOLOGICZNA OCENA ZIARNA JĘCZMIENIA I JEGO PRODUKTÓW

Streszczenie

Celem badań była analiza zawartości trichotecenów oraz zearalenonu w ziarnie jęczmienia oraz jego produktach pochodzących z ekologicznych i konwencjonalnych systemów uprawy, z województwa kujawsko-pomorskiego. Materiał badawczy stanowiły 53 próbki: 31 z ekologicznego i 22 z konwencjonalnego systemu gospodarowania. Badany materiał pochodził z lat 2009-2011. Przy użyciu metody HPLC-MS/MS oznaczono osiem mikotoksyn: niwalenol (NIV), deoksyniwalenol (DON), 3-acetylodeoksyniwalenol (3ADON), monoacetoksyscirpenol (MAS), diacetoksyscirpenol (DAS), toksyny T-2, HT-2 oraz zearalenon (ZEN). Wszystkie oznaczenia powtórzono trzykrotnie. Próby przygotowano wykorzystując kolumnienki Bond Elut® Mycotoxin (Varian) oraz wzorce wewnętrzne (IS) ^{13}C -DON, ^{13}C -T-2, ^{13}C -HT-2, ZAN. W badanym ziarnie oraz produktach spożywczych dominowała toksyna HT-2 (30% próbek badanych) oraz NIV (28% próbek badanych). Natomiast w żadnej z próbek nie stwierdzono obecności 3ADON. Spośród ośmiu oznaczanych mikotoksyn w najwyższym stężeniu występował NIV. Jego maksymalną zawartość 85.6 ppb odnotowano dla surowca ekologicznego. Najwięcej mikotoksyn stwierdzono w ziarnie pochodzącym z konwencjonalnego systemu upraw. Dominowała tutaj toksyna HT-2, oznaczona aż w 80% próbek oraz toksyna T-2, której obecność stwierdzono w 70% próbek. W grupie tej odnotowano również najwyższe stężenia tych mikotoksyn, wynoszące odpowiednio 13.8 ppb (HT-2) i 23.8 ppb (T-2) oraz największe stężenie DON (65.1 ppb). ZEN był najczęściej oznaczaną mikotoksyną w produktach konwencjonalnych, gdzie wystąpił w 42% próbek. Zanieczyszczenie produktów ekologicznych i konwencjonalnych było porównywalne. Średnie stężenia oznaczonych mikotoksyn w produktach spożywczych były wielokrotnie niższe niż w przypadku surowców. W żadnej z badanych próbek zawartość mikotoksyn nie przekroczyła dopuszczalnych wartości (Rozporządzenie 1881/2006 WE).

Słowa kluczowe: jęczmień, produkty jęczmienne, mikotoksyny, rolnictwo ekologiczne, rolnictwo konwencjonalne

1. Wstęp

Jęczmień (*Hordeum* L.), obok kukurydzy i pszenicy, należy do najczęściej wykorzystywanych roślin uprawnych. Stanowi 5% światowej i 20% europejskiej produkcji zbóż [9]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania tym zbożem, co wiąże się przede wszystkim z rozwojem technologii produkcji piwa i etanolu paliwowego z surowca jęczmiennego, a także z wykorzystaniem jęczmienia jako paszy do skarmiania zwierząt oraz jako surowca do produkcji środków spożywczych – mąki, płatków, czy ka-

szy [4]. Szerokie wykorzystanie ziarna jęczmienia, niesie konieczność chronienia go przed porażeniem grzybami pleśniewymi oraz regularnej kontroli zawartości mikotoksyn, które w sprzyjających warunkach mogą być wytwarzane przez grzyby pleśniowe w ziarnie zbóż. W przypadku jęczmienia częstym patogenem są grzyby z rodzaju *Fusarium*, wywołujące fuzariozę kłosów i wytwarzające mikotoksyny z grupy trichotecenów oraz zearalenon [3, 4]. W rolnictwie konwencjonalnym porażenie roślin przez grzyby ogranicza się stosując fungicydy. W rolnictwie ekologicznym stosowanie syntetycznych pestycydów jest zabronione,

a występowanie grzybów ogranicza się poprzez zmianowanie, dobór odpowiednich odmian i sposobu nawożenia oraz zachowywanie właściwego terminu siewu [8].

Obecność mikotoksyn w żywności pozyskiwanej z rolnictwa ekologicznego, które w opinii publicznej uważane jest za zdrowsze, budzi szczególne kontrowersje. Jednak występowanie mikotoksyn zawsze będzie wysoce niepożądane, gdyż mikotoksyny stanowią zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt.

Celem badań było określenie zawartości trichotecenów oraz zearalenonu w ziarnie jęczmienia oraz jego produktach pochodzących z ekologicznych i konwencjonalnych systemów uprawy, z województwa kujawsko-pomorskiego.

2. Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiły 53 próbki, w tym 31 z ekologicznego systemu uprawy (15 próbek nieprzetworzonego ziarna, 16 próbek produktów) i 22 z konwencjonalnego systemu gospodarowania (10 próbek nieprzetworzonego ziarna, 12 próbek produktów). Próbki pochodziły z lat 2009-2011. Ziarno jęczmienia pobrano z gospodarstw rolnych znajdujących się na terenie województwa kujawsko-pomorskiego, natomiast produkty jęczmienne (kaszę, mąkę, płatki) zakupiono w lokalnych sklepach tego samego województwa. Przy użyciu metody HPLC - MS/MS oznaczono osiem mikotoksyn: niwalenol (NIV), deoksyniwalenol (DON), 3-acetylodeoksyniwalenol (3ADON), monoacetoksyscirpenol (MAS), diacetoksyscirpenol (DAS), toksyny T-2,

HT-2 oraz zearalenon (ZEN). Próbki do analizy toksykologicznej rozdrobniono w młyńcu ultraodśrodkowym ZM 200 (Retsch), następnie poddano ekstrakcji i oczyszczeniu wykorzystując kolumny Bond Elut® Mycotoxin (Varian) oraz wzorce wewnętrzne (IS) ¹³C-DON, ¹³C-T-2, ¹³C-HT-2, ZAN. Po oczyszczeniu ekstraktów, przystąpiono do analizy przy użyciu chromatografu cieczowego (Agilent 1200) z detektorem spektrometrii mas: HPLC – MS/MS (3200 QTRAP). Wszystkie oznaczenia powtórzone trzykrotnie.

3. Wyniki i dyskusja

Zawartość oznaczonych mikotoksyn w jęczmieniu i produktach spożywczych przedstawiono w tab. 1 oraz na rys. 1.

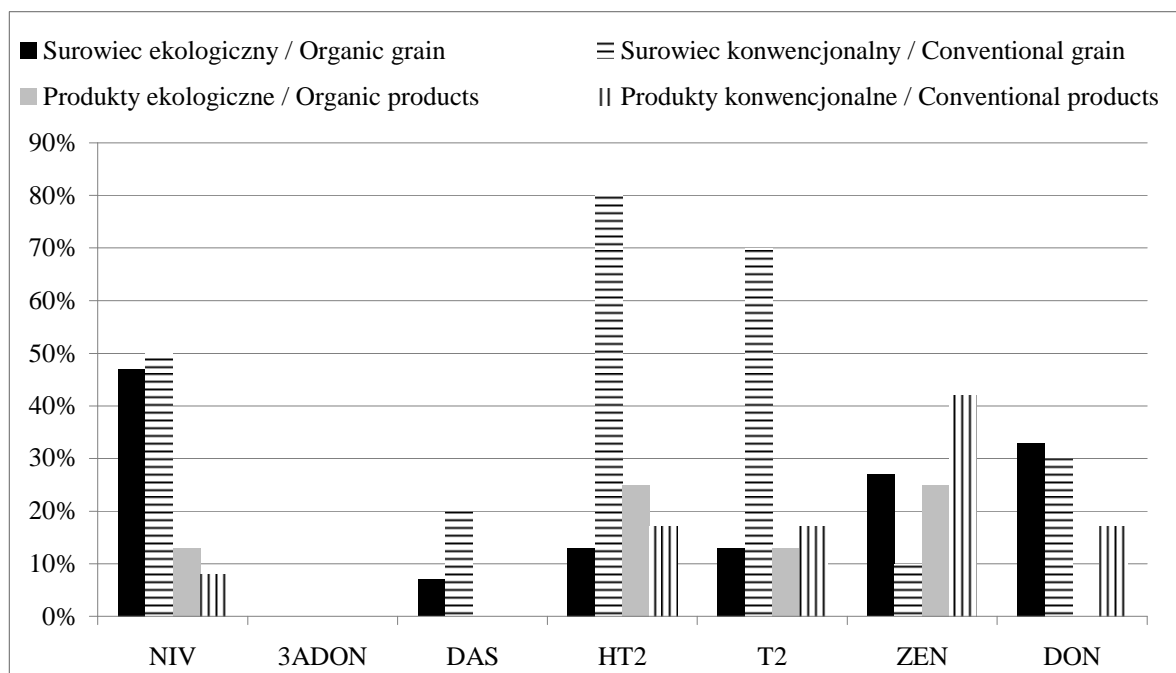
Spośród ośmiu oznaczonych mikotoksyn w analizowanym materiale badawczym najczęściej występowała toksyna HT-2 (30% badanych próbek) oraz NIV (28% badanych próbek). Średnie stężenia NIV w ziarnie ekologicznym i konwencjonalnym wynosiło <20 ppb, a maksymalne stężenie tej mikotoksyny (85.6 ppb), oznaczono w próbce ziarna ekologicznego (tab. 1). DON częściej występował w jęczmieniu ekologicznym (33% próbek skażonych), przy czym jego maksymalna zawartość (65.1 ppb) była wyższa w surowcu konwencjonalnym. Toksyny 3ADON nie wykryto w żadnej z badanych próbek. Obecność HT-2, T-2, MAS i DAS stwierdzano z większą częstotliwością w jęczmieniu konwencjonalnym, odpowiednio w 80%, 70%, 60% i 20% próbek. Maksymalną wartość stężenia (4.58 ppb)

Tab. 1. Zakres stężeń oznaczanych mikotoksyn w ziarnie i produktach jęczmiennych pochodzących z ekologicznego i konwencjonalnego systemu gospodarowania [ppb]

Table 1. Range content of mycotoxins in barley grain and its products from organic and conventional farms [ppb]

Mikotoksyna <i>Mycotoxin</i>	Wartość <i>value</i>	Ziarno ekologiczne / <i>Organic grain</i>	Ziarno konwencjonalne / <i>Conventional grain</i>	Produkty ekologiczne / <i>Organic products</i>	Produkty konwencjonalne <i>Conventional products</i>
NIV	minimum / <i>minimum</i>	nw	nw	nw	nw
	maksimum / <i>maximum</i>	85.6	51.6	<20	<20
DON	minimum / <i>minimum</i>	nw	nw	nw	nw
	maksimum / <i>maximum</i>	28.8	65.1	nw	<15
MAS	minimum / <i>minimum</i>	nw	nw	nw	nw
	maksimum / <i>maximum</i>	6.20	6.07	<3.0	nw
DAS	minimum / <i>minimum</i>	nw	nw	nw	nw
	maksimum / <i>maximum</i>	<3.0	<3.0	nw	nw
HT-2	minimum / <i>minimum</i>	nw	nw	nw	nw
	maksimum / <i>maximum</i>	7.42	13.8	<6.0	<6.0
T-2	minimum / <i>minimum</i>	nw	nw	nw	nw
	maksimum / <i>maximum</i>	11.9	23.8	<2.0	<2.0
ZEN	minimum / <i>minimum</i>	nw	nw	nw	nw
	maksimum / <i>maximum</i>	4.58	0.61	<0.6	0.83

nw – nie wykryto: <LOD – poniżej granicy wykrywalności



Rys. 1. Odsetek skażonych próbek jęczmienia i jego produktów z ekologicznego i konwencjonalnego systemu upraw
 Fig. 1. Percentage of infected samples of barley and its products from organic and conventional farming

i najwyższą średnią (0.65 ppb) ZEN stwierdzono w ziarnie ekologicznym. Produkty spożywcze były zanieczyszczone w mniejszym stopniu niż ziarno jęczmienia. Nie wykryto w nich toksyny 3ADON i DAS. Ponadto w produktach ekologicznych nie oznaczono DON, a w konwencjonalnych MAS. Największy odsetek artykułów spożywczych skażony był ZEN, który występował w 42% konwencjonalnych i w 25% ekologicznych produktów. Przy czym w artykułach z alternatywnego sposobu gospodarowania na poziomie 25% wystąpiła także toksyna HT-2. Najwyższą wartość maksymalną (<20 ppb) stwierdzono dla NIV w obu grupach produktów. Analizując poszczególne artykuły spożywcze zaobserwowano, iż najbardziej zanieczyszczona była mąka ekologiczna. Zawierała ona cztery spośród ośmiu badanych mikotoksyn, których średnie stężenia określono na poziomie: <20 ppb – NIV; <3.0 ppb – MAS; <6.0 ppb – HT-2; <2.0 ppb – T-2. W grupie produktów, którą stanowiły mąki ekologiczne najczęściej wykrywano toksynę HT-2. Natomiast w kaszy i płatkach największa liczba próbek skażona była ZEN (50% płatków, 37.5% kaszy konwencjonalnej i 25% kaszy ekologicznej) i DON (50% płatków konwencjonalnych). W żadnej z badanych próbek zawartość mikotoksyn nie przekroczyła dopuszczalnych wartości [5]. W 2003 roku SCOOP [6] opublikował raport przedstawiający poziom zanieczyszczenia jęczmienia przez mikotoksyny fuzaryjne w poszczególnych państwach UE. Z danych tych wynika, że w większości państw europejskich w badanym ziarnie przeważał DON, występując we wszystkich próbkach ocenianych we Francji, w 59.7% próbek z Finlandii, 30% próbek z Norwegii, 17% próbek z Wielkiej Brytanii i w 12.5% próbek z Holandii. W badaniach własnych największa ilość próbek ziarna konwencjonalnego skażona była toksyną HT-2 (80%) i T-2 (70%). W odniesieniu do pozostałych państw UE, uwzględnionych w raporcie [6], tak częste występowanie toksyny HT-2 i T-2 w ziarnie konwencjonalnym stwierdzono jedynie w Holandii, gdzie wszystkie badane próbki skażone były tymi mikotoksynami. Porównując średnie stężenia próbek pozytyw-

nych, zarówno w badaniach własnych, jak i w innych państwach UE, najwyższy poziom zanotowano dla DON. Wynosił on w badaniach własnych 36.1 ppb, a w Holandii gdzie zanotowano najwyższe stężenie DON – 299 ppb. Bernhoft i in. [1] zbadali występowanie mikotoksyn w zbożach z upraw konwencjonalnych i ekologicznych, pochodzących z różnych regionów Norwegii. Ziarno jęczmienia stanowiło 108 próbek z lat 2002 – 2004. Mikotoksyny (DON, HT-2, NIV) oznaczono przy użyciu chromatografii gazowej z detektorem spektrometrii mas GC-MS. Wyniki badań pokrywały się z wynikami badań własnych. Bardziej zanieczyszczone okazało się ziarno konwencjonalne, dla którego średnie stężenia oznaczonych mikotoksyn były wyższe niż w jęczmieniu ekologicznym. W badanym jęczmieniu dominował DON, który w próbkach konwencjonalnych osiągnął średnie stężenie 29 ppb (w roku 2002), 41 ppb (w roku 2003) i 62 ppb (w roku 2004), natomiast w próbkach ekologicznych 21 ppb (w roku 2002), 33 ppb (w roku 2003) i 71 ppb (w roku 2004). Średnia z uzyskanych wyników, z poszczególnych lat, była zbliżona dla jęczmienia ekologicznego i konwencjonalnego i wynosiła około 44 ppb (DON), co prawie trzykrotnie przewyższa wynik uzyskany w badaniach własnych. Średnie stężenie HT-2 w surowcu konwencjonalnym wynosiło 21 ppb, natomiast w jęczmieniu ekologicznym było poniżej granicy oznaczalności (<20 ppb). NIV zarówno w ziarnie ekologicznym, jak i konwencjonalnym osiągnął średnie stężenie również poniżej granicy oznaczalności (<30 ppb).

W badaniach własnych wartości tego parametru dla NIV były zbliżone w obu grupach ziarna i klasyfikowały się na tym samym poziomie, natomiast dla toksyny HT-2 uzyskane wyniki były kilkakrotnie niższe niż w ziarnie jęczmienia badanego na obszarze Norwegii. Mazurkiewicz i in. [3] badali występowanie trichotecenów w jęczmieniu jarym z systemów produkcji ekologicznej i konwencjonalnej. Materiał badawczy, 24 próbki jęczmienia, analizowano przy pomocy chromatografii gazowej z detektorem ECD. W przeciwieństwie do badań własnych, wyniki uzyskane przez autorów,

wskazywały na większe zanieczyszczenie ziarna ekologicznego. W najwyższym stopniu jęczmień skażony był DON, który występował we wszystkich próbkach. Wysokie stężenia DON stwierdzono w surowcu ekologicznym i wynosiły one od 1470 do 9390 ppb w zależności od zastosowanego przedplonu. Drugą, przeważającą mikotoksyną był 3ADON. Wykryty w 66% próbek ekologicznych i 32% próbek konwencjonalnych, podczas gdy w badaniach własnych nie stwierdzono obecności tej toksyny. Pozostałe mikotoksyny wykryto w nieznacznych ilościach. Natomiast w ogóle nie stwierdzono w analizowanym materiale obecności toksyny T-2, która w badaniach własnych była dominująca, a w ziarnie konwencjonalnym skażała aż 70% próbek. Warto również zauważyć, iż średnie stężenia mikotoksyn w ziarnie badanym przez Mazurkiewicz i in. [3] były wielokrotnie wyższe od uzyskanych w badaniach własnych. Na przykład, średnie stężenie DON w jęczmieniu ekologicznym wynosiło ponad 7000 ppb, podczas gdy w badaniach własnych średnia dla tej grupy materiału była poniżej granicy oznaczalności (<15 ppb). Mankevicien [2] analizował zawartość mikotoksyn w zbożach i produktach zbożowych na terenie Litwy, posługując się testem ELISA. Spośród 178 próbek jęczmienia jarego aż 175 zawierało DON, którego średnie stężenie określono na poziomie 153 ppb. Drugim najczęściej wykrywanym związkiem była toksyna T-2 (84.9% próbek), natomiast ZEN stwierdzono w 67.5% badanych próbek jęczmienia. W badaniach własnych, mikotoksyny te skażały odpowiednio 33%, 13% i 27% próbek jęczmienia konwencjonalnego, a ich maksymalne stężenia wynosiły 65.1 ppb dla DON, 23.8 ppb dla toksyny T-2 oraz 0.61 ppb dla ZEN. Wyniki te były wielokrotnie niższe od uzyskanych w badaniach omawianego autora, odpowiednio: 375 ppb (DON), 316 ppb (T-2) i 193.4 ppb (ZEN) [2]. Solarska i in. [7] analizowali jakość zbóż ekologicznych i ich produktów pod kątem zawartości mikotoksyn. Wśród badanych próbek znalazło się ziarno jęczmienia, kasza pęczak, kasza jęczmienna oraz płatki (zawierające w swoim składzie jęczmień i inne zboża). Dominującą mikotoksyną w ziarnie był DON, którego średnie stężenie wynosiło 47.6 ppb. Jego wysoką zawartość stwierdzono również w kaszy pęczak (44.4 ppb) oraz w kaszy jęczmiennej (41.7 ppb). W badaniach własnych maksymalna odnotowana zawartość tej mikotoksyny była znacznie niższa i wynosiła 28.8 ppb w ziarnie, a w produktach jęczmiennych nie wykryto jej wcale. Obok DON na wyższym poziomie występowała również toksyna T-2, która w ziarnie osiągnęła wartość 17.5 ppb, w kaszy 13.7 ppb, a w płatkach była jedyną wykrytą mikotoksyną, z maksymalnym stężeniem na poziomie 11.7 ppb. Na uwagę zasługuje fakt, że poziom T-2 w ziarnie oraz produktach był zbliżony. Zależność tą stwierdzono również w przypadku ZEN. Związek ten wykryto w jednej z analizowanych próbek ziarna na niskim poziomie (2.6 ppb), natomiast w poszczególnych produktach jęczmiennych zawartość ZEN wynosiła od 1.8 ppb (w kaszy pęczak) do 2.7 ppb (w kaszy jęczmiennej). W badaniach własnych ZEN w produktach ekologicznych osiągnął maksymalną wartość <0.6 ppb (w kaszy, płatkach i mące), natomiast toksyna T-2 <2 ppb (w mące), a w innych produktach toksyny te nie zostały wykryte. Warto zaznaczyć, iż w badaniach Solarskiej [7], jęczmień i jego produkty okazały się najmniej skażoną grupą spośród badanego materiału.

4. Wnioski

1. Jęczmień oraz produkty jęczmienne z ekologicznego i konwencjonalnego systemu uprawy zawierały większość analizowanych metabolitów *Fusarium*.
2. Zarówno w ziarnie ekologicznym, jak i konwencjonalnym, stwierdzono obecność NIV, DON, MAS, DAS, HT-2, T-2 oraz ZEN. W produktach ekologicznych wykryto NIV, MAS, HT-2, T-2 i ZEN, a w produktach konwencjonalnych NIV, DON, HT-2, T-2 i ZEN.
3. Najczęściej wykrywaną mikotoksyną w ziarnie konwencjonalnym była toksyna HT-2 i T-2, a w ziarnie ekologicznym NIV.
4. Najwyższą wartość maksymalną w ziarnie ekologicznym określono dla NIV, a w ziarnie konwencjonalnym dla DON.
5. W grupie produktów konwencjonalnych największy odsetek próbek skażony był ZEN, natomiast w produktach ekologicznych najczęściej wykrywano ZEN i toksynę HT-2.
6. Najbardziej zanieczyszczoną grupą produktów były mąki ekologiczne.
7. W żadnej z próbek nie doszło do przekroczenia dopuszczalnych wartości stężeń mikotoksyn według Rozporządzenia 1881/2006 WE. W żadnym przypadku nie przekroczono też zalecanej maksymalnej wartości sumy toksyn T-2 i HT-2 (wg Zalecenia Komisji z dnia 27 marca 2013 r.).

5. Bibliografia

- [1] Bernhoft A., Clasen P. E., Kristoffersen A. B., Torp M. Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food Additives & Contamination*, 2010, 27 (6): 842-852.
- [2] Mankevicien A. Mycotoxins in Lithuanian Cereals and Grain Products. *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*, 2010, s. 147-162.
- [3] Mazurkiewicz J., Solarska E., Muszyńska M., Kuzdraliński A. Występowanie trichotecenów fuzaryjnych w jęczmieniu jarym z systemów produkcji ekologicznej i konwencjonalnej. *Progress in Plant Protection* 2008, 48 (2): 426-429.
- [4] Newton A. C., Flavell A. J., George T. S., Leat P., Mullholland M., Ramsay L., Revored- Giha C., Russell J., Steffenson B. J., Swanston J. S., Thomas W. T. B., Waugh R., White P. J., Bingham I. J. Crops that feed the world 4. Barley: a resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. *Food Security*, 2011, 3: 141-178.
- [5] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. *Dz. Urz. UE L 364/ 17- 18*, 20. 12. 2006.
- [6] Scientific Cooperation (SCOOP) Raport. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. 2003. http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/index_en.html (styczeń, 2013)
- [7] Solarska E., Kuzdraliński A., Potocka E. Określenie jakości zbóż ekologicznych i ich produktów pod kątem zawartości mikotoksyn. Wyniki badań z zakresu rolnictwa ekologicznego w 2010 roku. MRiRW, Warszawa, 2011, s. 65-74.
- [8] Wysmulek A. Produkcja roślinna w rolnictwie ekologicznym. W: Gawrońska- Kulesza A. (red.). *Produkcja roślinna. Część 3*. Wyd. REA, Warszawa, 2010, s.139-148.
- [9] FAO Statistic Division 2013, www.faostat.fao.org (styczeń, 2013).

Podziękowania. Autorzy dziękują mgr Robertowi Kosickiemu oraz mgr Ewelinie Sibiorowskiej za pomoc w wykonaniu badań.

Badania wykonano w ramach projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt nr: 305 122136