

# Grikių grūdų užterštumas mikroskopiniais grybais ir mikotoksinais

Ilona Kerienė,

Audronė Mankevičienė,

Rūta Česnulevičienė,

Eugenija Bakšienė

Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras,  
Instituto al. 1,  
LT-58344 Akademija, Kėdainių r.  
El. paštas: ilona.keriene@gmail.com;  
audre@lzi.lt; perloja@perloja.lzi.lt;  
eugenija.baksiene@voke.lzi.lt

2011–2013 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centre (LAMMC) atlikti tyrimai, kurių tikslas – nustatyti grikių grūdų užterštumą mikroskopiniais grybais ir jų sintetinais mikotoksinais. Mėginiai analizėms surinkti iš LAMMC Vokės filialo bei Perlojos bandymų stoties ekologiškai ir įprastai augintų grikių pasėlių. Mikotoksinais grūduose buvo nustatyti imunofermentiniu (ELISA) ir efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodais. Rezultatai parodė, kad grikių grūdų užterštumas *Fusarium* genties grybais skirtingais tyrimų metais siekė 11–58,5 %. Didžiausią dalį sudarė *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. semitectum*, *F. graminearum* ir kt. *Fusarium* spp. rūšių sudėtis bei analizuotų mikotoksinų koncentracijos skirtingais tyrimų metais buvo nevienodos.

Po 7 mėnesių sandėliavimo ant grikių grūdų buvo aptikti *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* genčių grybai. Tai rodo, kad šiais grybais grikių grūdai galėjo užsiteršti sandėliuojant. Nevalytuose grikių grūduose aflatoksinu B<sub>1</sub> (AFL B<sub>1</sub>) padidėjo dvigubai, ochratoksino A (OCH A) – 22 %. Nustatyta didžiausia grikių mikotoksikologinė tarša 2011 m., nes 78 % grikių mėginių buvo užteršti trimis toksinais – deoksinivalenoliu (DON), AFL B<sub>1</sub> ir OCH A bei 22 % mėginių keturiais toksinais – DON, AFL B<sub>1</sub>, OCH A ir zearalenonu (ZEA).

**Raktažodžiai:** gričiai, mikotoksinais, užterštumas, mikroskopiniai grybai

## ĮVADAS

Gričiai (*Fagopyrum esculentum* Moench) pasaulinėje sveikų maisto produktų rinkoje vertinami kaip dietinis produktas, nes juose gausu maistingųjų medžiagų, mineralų, vitaminų bei biologiškai aktyvių junginių: 55 % krakmolo, 12 % baltymų, 4 % riebalų, 2 % tirpių karbohidratų, 7 % ląstelių sienos, 18 % sudaro kiti komponentai – organinės rūgštys, fenoliniai junginiai, taninai ir kt. (Amarowicz, Fornal, 1987; Krkošková, Mrázova, 2004; Vojtíšková et al., 2012). Palyginti su javais, mūsų šalyje mažai auginama grikių, daugiausia Pietrytinėje Lietuvoje, tačiau Žemės ūkio informacijos ir verslo duomenimis (2013), pastaraisiais metais grikių plotai didėja, 2013 m. užsėta daugiau nei 30 tūkst. hektarų. Lietuvoje auginami gričiai, kurių veislės išvestos Ukrainoje, Baltarusijoje, pastaruoju metu populiarėja lietuviška ankstyva, žemūgė veislė ‘VB Vokiai’.

Gričiai unikalūs tuo, kad jų šaknų masė 2,5–15 kartų mažesnė nei miglinių augalų, tačiau vis tiek pralenkia siurbiamąją galia – išskirdami skruzdžių, acto, limoneno rūgštį, geba pasisavinti dirvoje sunkiai tirpstančius fosforo rūgšties junginius, todėl gričiai priskiriami prie mažai reiklių dirvai, bet reiklių šilumai ir drėgmei augalų (Zakarackas, 1999). Grikiuose gausu bioaktyvių junginių, pasižymičių antimikrobinu ir antigrybiniu poveikiu (Čabarkapa, 2008; Mošovska, 2012). Nors gričiai rečiau nei kiti augalai nukenčia nuo ligų, tačiau tyrimai rodo, kad gali būti pažeidžiami mikroskopinių grybų ir jų sintetinių mikotoksinų (Llewellyn et al., 1988; Brindzova et al., 2009; Mošovská, Bírošová, 2012). Jau ankstyvosios brandos metu ant sėklų pasirodo pirmieji *Fusarium* spp. bei kitų grybų (*Cladosporium* spp., *Botrytis* spp., *Alternaria* spp.) taršos židiniai, kurie patenka iš dirvožemio bei nuo augalinių liekanų. Po derliaus nuėmimo bei sandėliuojant mikroskopinių grybų sudėtis keičiasi, grikių maistinę

vertę taip pat mažina *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* genčių grybai (Shapira, 2004; Lugauskas, 2006; Krysińska-Traczyk et al., 2007; Pszczółkowska et al., 2011).

Potencialūs toksinių metabolitų gamintojai yra *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* genčių grybai. Lietuvoje ypač kreipiamas dėmesys į *Fusarium* genties mikroskopinius grybus – šviežiai nukultame derliuje fuzariozės pažeistų grikių kiekis neturi viršyti 1 % (Juodeikienė, 2012). Jų produkuojami termiškai atsparūs, stabilūs rūgštinėje ir neutralioje terpėje mikotoksinais – zearlanonas (ZEA), deoksinivalenolis (DON), T2/HT2 toksinas, fumonizinas (FUM) ir kt. sukelia hormoninius, reprodukcinius, kraujo apytakos, virškinamojo trakto, genetinius pakitimus bei mirtinas žmonėms ir gyvūnams mikotoksikozes (Diaz, 2005; Pateson, Lima, 2010). Kontroluoti mikotoksinių sintezę yra sunku, nes keletas mikroskopinių grybų gali sintetinti tuos pačius bei skirtingus mikotoksinius, priklausomai nuo aplinkos sąlygų. Optimalios sąlygos užteršti produkciją iš karto keliais mikotoksinais yra palankios, kai temperatūra svyruoja tarp 15 ir 30 °C, o santykinis oro drėgnis – apie 80 % (Shapira, 2004). *Penicillium* spp. ir *Aspergillus* spp. sintetinami ochratoksinais pasižymi neuropatologiniu poveikiu, slopina baltymų sintezę, žmonėms sukelia „Balkanų endeminę nefropatiją“ – mirtiną lėtinę inkstų ligą (BEN). Maisto kontrolės institucijos skiria didelį dėmesį ochratoksino A (OCH A) kontrolei. Yra nustatytos didžiausios leidžiamos koncentracijos (DLK) pašaruose ir maisto produktuose: nepadirbtuose grūduose – 5,0 µg kg<sup>-1</sup>, maistiniuose grūduose – 3,0 µg kg<sup>-1</sup>, produktams, skirtiems kūdikių ir vaikų mitybai, nustatytos griežtesnės normos – 0,5 µg kg<sup>-1</sup>. 2008–2009 m. Europos Sąjungoje daugiausia problemų kėlė iš trečiųjų šalių importuojami maisto produktai (Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1881/2006). Toksiškiausiais laikomi *Aspergillus* genties grybų sintetinami aflatoksinais B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub>, kurie veikia visus pagrindinius žmonių ir gyvūnų fiziologinius procesus. Europos Komisijos reglamentas numato įvairias prevencines priemones bei reglamentuoja šių mikotoksinių kiekius augalinėse žaliavose, ypač kūdikiams ir mažiems vaikams skirtuose grūdiniuose produktuose. Grikių žaliavai ir iš jų pagamintiems maisto produktams privaloma tik aflatoksino (AFL) kontrolė, kurio bendras kiekis neturi viršyti 4 µg kg<sup>-1</sup>,

o AFL B<sub>1</sub> didžiausia leistina koncentracija apribota iki 2 µg kg<sup>-1</sup>. Kūdikiams ir mažiems vaikams skirtuose produktuose minėto mikotoksino koncentracija neturi viršyti 0,1 µg kg<sup>-1</sup>. Kadangi DON koncentracijos kūdikių ir vaikų maiste negali būti didesnės nei 200 µg kg<sup>-1</sup>, ZEA – 20 µg kg<sup>-1</sup>, FUM – 200 µg kg<sup>-1</sup>, OCH A – 0,5 µg kg<sup>-1</sup>, o juos produkuojančių grybų pasitaiko gana dažnai (Matić et al., 2009; Pszczolkowska et al., 2011), šių mikotoksinių kontrolė yra labai svarbi. Kol kas diskusijos vyksta dėl T2 ir HT2 toksinų ribinių verčių įteisinimo (Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1881/2006).

Fragmentinės informacijos apie grikių grūdų užteršimą mikroskopiniais grybais ir mikotoksinais yra, tačiau nepakankamai, kad padėtų mokliškai įvertinti riziką, todėl šio eksperimento tikslas – nustatyti 2011–2013 m. derliaus grikių grūdų užterštumą mikroskopiniais grybais ir jų sintetinais mikotoksinais.

## TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

Sėjamųjų grikių grūdų mėginiai 2011–2013 m. surinkti po derliaus nuėmimo iš LAMMC Vokės filialo bei Perlojos bandymų stoties ekologiškai ir įprastai augintų grikių pasėlių. Įprastai augintų grikių pasėliai pavasarį buvo patręšti NPK trąšomis. Derlius nukultas, kai subrendo daugiau nei 80 % grūdų. Atliktos ‘VB Vokiai’, ‘Smuglianka’ ir ‘Vlada’ veislių analizės. Grikių grūdai (12 % drėgnio) laikyti 7 mėnesius nuo aplinkos sąlygų priklausančiame sandėlyje. Taip pat atliktos išvalytų ir neišvalytų grikių grūdų mėginių ochratoksino A (OCH A) bei aflatoksino B<sub>1</sub> (AFL B<sub>1</sub>) analizės.

Mikotoksinių plitimo priežastims įvertinti atlikti grūdų užterštumo *Fusarium* ir kt. grybais tyrimai. Vidinių grūdo audinių pažeidimas mikroskopiniais grybais nustatytas agarizuotų mitybinių terpių metodu (Mathur, Kongsdal, 2003). Sterili bulvių dekstrozės agaru (BDA) terpė su Tritono-X priedu (0,8 ml) buvo išpilstyta į sterilias Petri lėkšteles. Grūdai 5 min. dezinfekuoti 1 % natrio hipochlorito (NaOCl) tirpalu, nuskalauti steriliame vandenyje, nusausti ant sterilaus filtrinio popieriaus ir išdėlioti Petri lėkštelėse (po 10 grūdų kiekvienoje) ant terpės paviršiaus. Tirta 400 grūdų iš kiekvieno tyrimo varianto. Grybai identifikuoti po 7–14 parų laikant 22 ± 2 °C temperatūroje. Mikroskopinių grybų pažeistų grūdų skaičius įvertintas

procentais nuo bendro tirtų grūdų kiekio. Kolonijos, suformavusios rūšiai būdingus požymius, buvo identifikuotos remiantis P. E. Nelson ir kt., (1983) bei J. F. Leslie, B. A. Summerell (2006) apibūdinimais.

Mikroskopinių grybų, sudarančių kolonijas, skaičius ( $K_{sv} g^{-1}$ ) viename grame sėklų nustatytas pagal LST EN ISO 7218:2007. Grybų gentys identifikuotos remiantis P. E. Nelson ir kt., (1983), J. F. Leslie, B. A. Summerell, (2006), D. Satton ir kt. (2001) mokslininkų apibūdinimais.

Mikotoksinai grūduose nustatyti imunofermentiniu (ELISA) ir efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodais. ELISA metodu nustatant toksinus naudoti skirtingi diagnostiniai testai: Veratox® for DON 5/5 – 8331NE, Veratox® for zearalenone – 8110 ir Veratox® for T2/HT2 – 8210, pagaminti Neogen corporation, Food Safety Diagnostics, Ayr, (UK), įvertinti ochratoksiną A (OCH A), o aflatoksiną B<sub>1</sub> (AFL B<sub>1</sub>) taikyti Ridascreeen® (R-Biopharm AG, Vokietija) diagnostiniai nustatymo testai. Mėginių paruošimas kiekvienam mikotoksiniui atliktas remiantis gamintojų rekomenduojamomis metodikomis (Neogen corporation, Food Safety Diagnostics, Ayr, UK). Nuskaityti rezultatus naudotas fotometras *Multiskan MS* su 650 nm ir 450 šviesos filtrais, rezultatai apdoroti – kompiuterinė programa *Ascent Software*.

ESChM taikytas nustatyti DON grikių grūduose (LST EN 15891:2010), mėginio grynimui naudojant imuninio giminingumo kolonėlę (NeoColumn for DON, Neogen Europe Ltd. Ayr, UK) bei ultravioletinės šviesos detektorių. Kalibracinė kreivė sudaryta iš septynių standartinių DON tirpalų (koncentracijų intervalas 0,092–5,86  $\mu g ml^{-1}$ ,  $R^2 = 0,9999$ ).

**Rezultatų statistinė analizė.** Duomenų kiekybinis vertinimas atliktas taikant statistinių duomenų apdorojimo paketą SELEKCIJA, naudojant vieno veiksnio dispersinės analizės ANOVA, STAT ENG programos metodą bei multifunkcinį Duncano kriterijų, kai  $p < 0,05$  (Tarakanovas, Raudonius, 2003). Taip pat taikyta Microsoft Office *Excel* duomenų apdorojimo programa.

**Meteorologinės sąlygos.** 2011 m. meteorologinės sąlygos grikiams augti buvo vidutiniškai palankios. Birželio mėn. I pusėje vyravo aukšta temperatūra – 28–30 °C, naktimis siekė iki 20 °C. Liepos mėn. kai kuriomis dienomis oro temperatūra pakildavo iki 28 °C, vidutinė temperatūra buvo apie 18 °C (vidutinė daugiametė – 16,7 °C). Lijo dažnai,

kritulių mėnesio norma siekė 63–75 mm. Susiklostė labai palankios sąlygos plisti grybinėms ligoms. Rugsėjūtį oro temperatūra buvo artima vidutinei daugiametei.

2012 m. pavasaris buvo drėgnas. Sėti grikius ir jiems dygti sąlygos buvo palankios. Birželio, liepos mėn. buvo drėgni ir šilti, rugsėjūtis – taip pat drėgnas, o rugsėjis – palyginti sausas. Grikių derliaus nuėmimas užsitęsė, nes rugsėjo mėn. po drėgno rugsėjūtį buvo dar kuliama kiti javai.

2013 m. pavasaris labai vėlavo. Atšilo tik įpusėjus gegužės mėn. Mėnesio pradžia buvo sausa, stipriai palijo tik paskutinėmis jo dienomis, dėl drėgnų dirvų kelias dienas vėlavo grikių sėja. Grikių žydėjimo tarpsniu buvo sausa, augalai dienos metu vyto, atsi-gaudavo tik naktį. Grikiai subrendo vienodai ir palyginti anksti, rugsėjo mėn. viduryje buvo nuimtas jų derlius.

## TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Nustatyta, kad **2011 m. grikių grūdai** po derliaus nuėmimo buvo užteršti *Cladosporium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Fusarium* ir kt. genčių grybais (1 lentelė).

Po 7 mėnesius trukusio sandėliavimo dominuojanti grybų rūšinė sudėtis nekito, tačiau atsirado grūdų, užterštų *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* genčių grybais, padidėjo užterštumas *Penicillium* spp. grybais. Tikėtina, kad šie grybai pateko iš sandėliavimo aplinkos. Sandėliuotų grikių grūdų užterštumas mikroskopiniais grybais buvo 23 % didesnis nei po derliaus nuėmimo.

2011 m. grikių grūdų mėginiuose po derliaus nuėmimo atlikus DON analizes nustatyta, kad visi mėginiai buvo užteršti 100 % (2 lentelė). Vidutinė DON koncentracija grikių grūduose siekė  $486 \pm 238 \mu g kg^{-1}$ , tačiau pasitaikė mėginių, kurių koncentracijos varijavo nuo 240,0  $\mu g kg^{-1}$  iki 1 010,2  $\mu g kg^{-1}$ . Pažymėtina, kad visi tirti DON mėginiai viršijo kūdikių ir vaikų mitybai skirtų perdirbti grūdinių produktų ( $200 \mu g kg^{-1}$ ) leistinas koncentracijas, o 1 010,2  $\mu g kg^{-1}$  DON kiekis viršijo Europos komisijos reglamento (EB) Nr. 1881/2006 leidžiamas koncentracijas grūduose, skirtuose tiesiogiai vartoti žmonėms ( $750 \mu g kg^{-1}$ ).

ZEA buvo užteršti 25 % tirtų mėginių, tačiau nustatytos koncentracijos siekė net  $150 \mu g kg^{-1}$  (2 lentelė). Šie rezultatai keletą kartų viršijo Europos komisijos reglamento (EB) Nr. 1881/2006

1 lentelė. Grikių grūdų užterštumas mikroskopiniais grybais 2011 m.

Table 1. Buckwheat grain contamination with fungi in 2011

Ekperimentas Experiment	Grūdų užterštumas Contamination of grain $\text{Ksv g}^{-1} \times 10^4$	Dominuojančios grybų gentys Dominant fungal genera
Po derliaus nuėmimo After harvesting	$25,5 \pm 2,42$	<i>Cladosporium</i> spp., <i>Colletotrichum</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Mycelia sterilia</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Acremonium</i> spp., <i>Botrytis</i> spp.
Po 7 mėnesių sandėliavimo After 7-month storage	$31,5 \pm 2,35$	<i>Cladosporium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Mycelia sterilia</i> ., <i>Fusarium</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.

2 lentelė. 2011 m. grikių grūdų užterštumas mikotoksinais

Table 2. Mycotoxin contamination in buckwheat grains in 2011

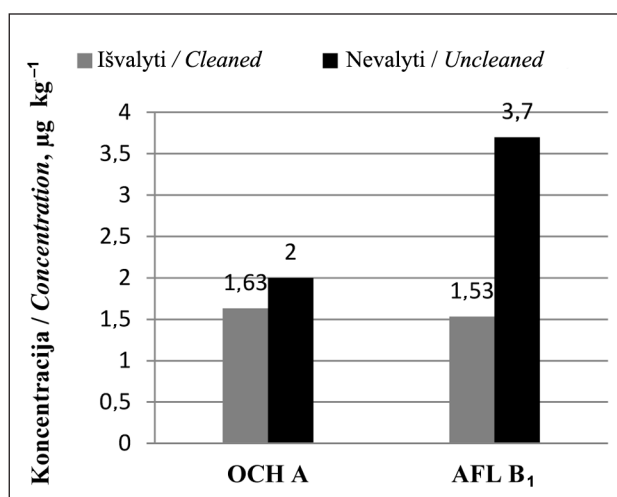
Užterštumo lygis ir koncentracijos / Level of contamination and concentrations	Po derliaus nuėmimo After harvesting	Po 7 mėnesių laikymo After 7-month storage		
	Mikotoksinais / Mycotoxin			
	DON	ZEA	OCH A	AFL B <sub>1</sub>
Ištirtų mėginių skaičius / Number of samples	12	12	12	12
Mėginių užterštumas / Sample contamination, %	100	25	100	100
Koncentracijų vidurkis Average concentrations of the samples, $\mu\text{g kg}^{-1}$	469,7	24,4	1,55	1,62
Didžiausia vertė / Maximum value, $\mu\text{g kg}^{-1}$	1 010,2	150,5	1,9	2,3
Mažiausia vertė / Minimum value, $\mu\text{g kg}^{-1}$	240,0	0	1,2	1,0
Standartinė paklaida / Standard error, $\mu\text{g kg}^{-1}$	204,38	51,92	0,23	0,49
Variacijos koeficientas / Variation coefficient, %	43,51	213,15	15,07	30,17

kūdikiams ir vaikams leistinas ribas ( $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) ir du kartus suaugusių žmonių sveikatai pavojingas ribas ( $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

AFL B<sub>1</sub> vidutinė koncentracija grikių grūduose nustatyta  $1,6 \pm 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  ir varijavo nuo  $1,08 \pm 0,02 \mu\text{g kg}^{-1}$  iki  $2,3 \pm 0,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ , tai 10 ir daugiau kartų viršijo kūdikiams ir vaikams leistinas koncentracijas ( $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), o pusė mėginių buvo artimi arba viršijo suaugusių žmonių tiesiogiai vartoti leistinas ribas ( $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). AFL B<sub>1</sub> buvo užteršti visi tirti grikių mėginiai.

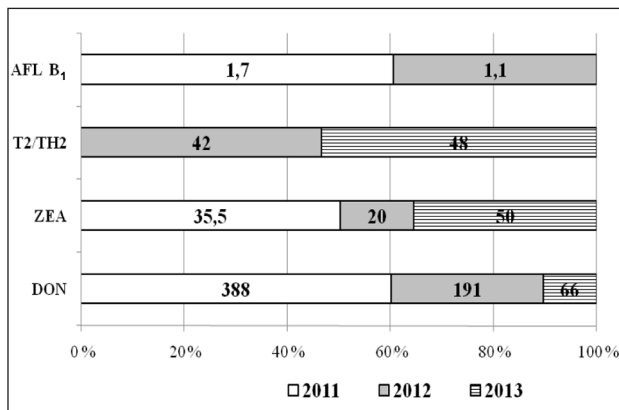
OCH A koncentracijos grikių grūduose buvo nedidelės, tačiau visi mėginiai (100 %) buvo užteršti šiuo mikotoksinu (2 lentelė).

1 pav. pateikti duomenys rodo, kad nevalytuose grikių grūduose mikotoksinų rizika didėja. Neišvalytuose grikių grūduose AFL B<sub>1</sub> koncentracijos padidėjo beveik dvigubai, o OCH A – 22 %.

1 pav. AFL B<sub>1</sub> ir OCH A koncentracijų kitimas išvalytuose ir nevalytuose grikių grūduose 2011–2012 m.Fig. 1. Variation of AFL B<sub>1</sub> and OCH A concentrations in cleaned and uncleaned buckwheat grain in 2011–2012

Reikšminga, kad 2011 m. tirti grikių mėginiai buvo užteršti ne vienu, o keliais mikotoksinais. Mikotoksinų sudėties analizė atskleidė, kad 78 % grikių mėginių buvo užteršti trimis toksinais – DON, AFL B<sub>1</sub> ir OCH A ir 22 % – visais keturiais tirtais mikotoksinais (2 pav.). Šie tyrimai rodo, kad grikių, kaip ir miglinių javų grūdų, tyrimai mikotoksinų atžvilgiu yra aktualūs ir verti didesnio dėmesio, nes grikių grūduose privalomos tik AFL B<sub>1</sub> analizės.

**2012–2013 tyrimų metais** didesnis dėmesys buvo kreipiamas į grikių grūdų užterštumą *Fusarium* spp. genties grybais, nes 2011 m. nustatytos didesnės DON, ZEA, T2/HT toksinų koncentracijos grikių grūduose. Nors 2011 m. ant grikių grūdų



**2 pav.** Mikotoksinų kiekiai, artimi arba viršijantys EK reglamento Nr. 1881/2006 didžiausias leistinas koncentracijas ekologiškai augintuose grikių grūduose 2011–2013 m.

**Fig. 2.** Mycotoxin concentrations in buckwheat grain exceeding maximum mycotoxin concentrations allowable for organically produced buckwheat grain according to EC Regulation No. 1881/2006

*Fusarium* spp. infekcija nebuvo didelė (3 lentelė), tačiau vyraujančios *Fusarium* rūšys lėmė jų produkuojamų mikotoksinų koncentracijas (Pszczółkowska et al., 2011).

Rezultatai parodė, kad griokiai šiais mikroskopiniais grybais mažiausiai buvo užteršti 2011 m. (11 %). Įvertinus jų rūšinę sudėtį, nustatyta, kad didžiausią dalį sudarė *F. equiseti* (~6 %), *F. sporotrichioides* (~4 %) *F. avenaceum*, ir *F. semitectum* (1 %). 2012 m. po derliaus nuėmimo užterštumas *Fusarium* grybais buvo apie 3 kartus didesnis (37 %), palyginti su 2011 m. Didžiausią dalį sudarė *F. avenaceum* rūšies grybai – 38 %, *F. sporotrichioides* – 8 % ir *F. equiseti* – 2,2 %.

**2013 m. grikių derlius** buvo gausiai užterštas *Fusarium* genties grybais, tačiau DON ir ZEA gaminančių rūšių (*F. graminearum*, *F. culmorum*) pasitaikė pavieniai atvejai.

Tyrimo laikotarpiu gauti mikroskopinių grybų analizės rezultatai artimi A. Pszczółkowska ir kt. (2011) bei E. Krysińska-Traczyk ir kt. (2007) atliktiems tyrimams, kurie rodo, kad grikių grūdus daugiausia kolonizuoja *Alternaria alternata* rūšies, taip pat *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. grybai.

*Fusarium* genties grybais buvo užteršta daugiau nei 20 % bendro izoliatų kiekio, tačiau mikotoksinus produkuojančių grybų rasti tik pavieniai atvejai. Tikėtina, kad mikroskopiniams grybams plisti palankias sąlygas sudarė 2012–2013 m. vasaros metu trumpi, bet gausiai lietingi periodai, be to, grikių grūdų kokybei svarbus tinkamas žemės dirbimas ir piktžolių naikinimas iki sėjos. Anksčiau sudygusios ir sutankėjusios piktžolės laimi konkurencinę kovą prieš grikius, sulaiko drėgmę dirvoje, todėl sudaro

3 lentelė. 2011–2013 m. derliaus grikių grūdų užterštumas *Fusarium* spp. grybais

Table 3. *Fusarium* spp. contamination in buckwheat grain harvested in 2011–2013

Metai Year	Mėginių užterštumas <i>Fusarium</i> spp. grybais Sample contamination by <i>Fusarium</i> spp. fungi, %	Ant grikių sėklų aptiktos <i>Fusarium</i> rūšys <i>Fusarium</i> species detected on buckwheat seeds
2011	11,0 ± 6,3	<i>F. equiseti</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. graminearum</i> ir kt. <i>Fusarium</i> spp.
2012	37,0 ± 29,7	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. poae</i> ir kt. <i>Fusarium</i> spp.
2013	56,5 ± 12,0	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i> ir kt. <i>Fusa-</i> <i>rium</i> spp.

palankias sąlygas vystyti *Fusarium* genties ir kitiems mikroskopiniams grybams bei mikotoksinų sintezei (Zakarackas, 1999; Bernhoft et al., 2012).

Kadangi 2012 m. derliaus grikių grūdai buvo gausiau užteršti *Fusarium* spp. grybais nei 2011 m. (3 lentelė), analizei buvo pasirinkti DON, ZEA ir T-2/TH2 toksinai bei sandėliuotuose grūduose plitusių *Aspergillus* spp. sintetinamas AFL B<sub>1</sub>. Įvertinus mikotoksikologinę taršą, nustatyta, kad gautos koncentracijos buvo ženkliai mažesnės negu 2011 m. derliaus (4 lentelė). Nors DON ir ZEA kiekiai didžiausių leistinų koncentracijų neviršija, tačiau grikių grūdų užterštumas artimas ribinėms toksinėms normoms, tokių grūdų kūdikių ir vaikų mitybai naudoti nerekomenduojama. Kadangi tirtuose mėginiuose viena iš vyraujančių rūšių buvo *F. sporotrichioides*, 2012 m. ištyrėme T2/TH2 toksino koncentraciją, nes ši *Fusarium* rūšis yra viena iš minėto mikotoksino produkuotojų (Pa-

terson, Lima, 2010). Tyrimai parodė, kad grikių mėginiai užteršti T2/TH2 toksinais. Nustatytos koncentracijos buvo nedidelės, tačiau jų aptikta visuose tirtuose mėginiuose. Šio toksino didžiausia leistina koncentracija dar nėra reglamentuota, tačiau saugi rekomenduotina norma neturėtų viršyti 100 µg kg<sup>-1</sup> (Eriksen, Aleksander, 1998). Atlikus AFL B<sub>1</sub> tyrimus po 7 mėnesių sandėliavimo, visuose tirtuose grikių mėginiuose aptikta šio mikotoksino pėdsakų (0,9–1,5 µg kg<sup>-1</sup>). Reikšminga, kad visuose 2012 m. derliaus grikių grūduose aptikta visų keturių analizuotų mikotoksinų pėdsakų, tokia grikių grūdų maistinė vertė kelia grėsmę kūdikių ir vaikų sveikatai (EB Nr. 1881/2006).

Atlikti 2013 m. derliaus grikių grūdų DON, ZEA ir T2/TH2 tyrimai. Jie parodė, kad, kaip ir 2012 m. mėginiuose, nustatyta visų trijų mikotoksinų pėdsakai (5 lentelė). Atliktos DON koncentracijos labai nedidelės, tačiau kai kuriuose

#### 4 lentelė. 2012 m. grikių grūdų užterštumas mikotoksinais

Table 4. *Mycotoxin contamination in buckwheat grain samples in 2012*

Užterštumo lygis ir koncentracijos <i>Level of contamination and concentrations</i>	Mikotoksinais / <i>Mycotoxins</i>			
	DON	ZEA	T2/HT2	AFL B <sub>1</sub> *
Ištirtų mėginių skaičius / <i>Number of samples</i>	6	6	6	6
Mėginių užterštumas / <i>Sample contamination, %</i>	100	100	100	100
Koncentracijų vidurkis <i>Average concentrations of the samples, µg kg<sup>-1</sup></i>	173,3	19,4	29,7	1,1
Didžiausia vertė / <i>Maximum value, µg kg<sup>-1</sup></i>	191,5	20,2	41,9	1,5
Mažiausia vertė / <i>Minimum value, µg kg<sup>-1</sup></i>	160,7	18,0	22,6	0,9
Standartinė paklaida / <i>Standard error, µg kg<sup>-1</sup></i>	13,5	0,65	9,00	0,25
Variacijos koeficientas / <i>Variation coefficient, %</i>	7,79	3,35	30,28	22,94

\* po 7 mėnesių sandėliavimo / *after 7-month storage*

#### 5 lentelė. 2013 m. grikių grūdų užterštumas mikotoksinais po derliaus nuėmimo

Table 5. *Mycotoxins contamination of buckwheat grain after harvest in 2013*

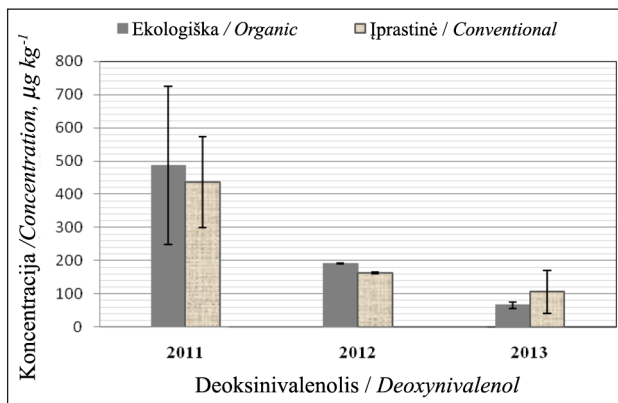
Užterštumo lygis ir koncentracijos <i>Level of contamination and concentration</i>	Mikotoksinais / <i>Mycotoxins</i>		
	DON	ZEA	T2/HT2
Ištirtų mėginių skaičius / <i>Number of samples</i>	6	6	6
Mėginių užterštumas / <i>Sample contamination, %</i>	100	100	100
Koncentracijų vidurkis / <i>Average concentrations of the samples, µg kg<sup>-1</sup></i>	42,2	49,1	32,2
Didžiausia vertė / <i>Maximum value, µg kg<sup>-1</sup></i>	109,3	61,0	50,2
Mažiausia vertė / <i>Minimum value, µg kg<sup>-1</sup></i>	24,0	29,1	<LOD*
Standartinė paklaida / <i>Standard error, µg kg<sup>-1</sup></i>	33,07	14,89	16,95
Variacijos koeficientas / <i>Variation coefficient, %</i>	78,36	30,36	52,68

\* nustatymo riba / *limit of detection*

mėginiuose ZEA koncentracijos ( $61,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) beveik du kartus didesnės negu rekomenduotinos normos kūdikių ir vaikų sveikatai (EB Nr. 1881/2006).

Ekologiškomis žemdirbystės sąlygomis išaugintuose grikių grūduose atliktos DON, ZEA, T2/HT2 ir AFL B<sub>1</sub> analizės. Nustatyta, kad griekiai užteršti dviem ar daugiau toksinų, kurių koncentracijos buvo artimos ar viršijo Europos komisijos reglamento (EB) Nr. 1881/2006 leistinas arba rekomenduojamas vertes kūdikių ir vaikų mitybai skirtiems grūdiniams produktams (2 pav.).

Chromatografiniai DON tyrimai parodė, kad šiuo toksinu labiausiai užteršti 2011 m. derliaus grikių grūdų mėginiai (3 pav.). 2012 ir 2013 m. DON koncentracijos grikių grūduose buvo daugiau nei 50 % bei nustatyta, kad 2011–2012 m. ekologiškai auginti grikių grūdai buvo labiau užteršti DON negu auginti įprastai.



**3 pav.** DON koncentracijos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) grikių grūduose, augintuose ekologiškomis ir įprastinėmis žemdirbystės sąlygomis 2011–2013 m.

**Fig. 3.** DON concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in buckwheat grain from organic and conventional farms in 2011–2013

Mūsų atlikti eksperimentai didžiąja dalimi sutampa su kitų mokslininkų, dirbančių toje pačioje srityje, duomenimis. E. Krysińska-Traczyk (2007) tyrimai rodo, kad grikių grūdai užteršti 33,3 % DON ir 50 % OCH A, tačiau ribinių verčių nustatyti kiekiai neviršijo. G. C. Llewellyn ir kt. (1988) rezultatai rodo, kad 7 % grikių lukštų buvo užteršti *Aspergillus flavus* ir nustatytos AFL B<sub>1</sub> bei AFL G<sub>1</sub> koncentracijos atitinkamai 13,8 ir 19,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Taip pat aptiktas T-2 toksinas, kurio koncentracija siekė 18,9  $\mu\text{g g}^{-1}$ . J. J. Matić ir kt. (2009) ištyrė 26 įvai-

rių grūdų mėginius ir nustatė, kad grikių mėginyje DON ir OCH kiekis viršijo reglamentuotas EK normas, ir visi tirti mėginiai buvo užteršti daugiau negu vienu toksinu.

Pastebėta tendencija, kad ekologiškai auginti javai (avižos, miežiai, kviečiai) mažiau užteršti mikotoksinais negu auginti įprastai. Viena iš priežasčių, kad ant augintų įprastai javų grūdų neidentifikuota mikotoksinus sintetinančių grybų rūšių (Bernhoft et al., 2010). I. Giménez ir kt. (2012) teigia, kad didesnes mikotoksinų koncentracijas ekologiškuose, palyginti su augintuose įprastai, javuose lemia pasėlių žydėjimo metu užsitęsęs lietingas periodas (>100 mm), o E. Edesi ir kt. (2012) nustatė, kad ekologiški pasėliai labiau piktžolėti negu auginti įprastai. Tad tikėtina, kad 2011–2012 m. eksperimento metu lietingi periodai sudarė palankias sąlygas mikroskopiniams grybams plisti, o dėl didesnio piktžolėtumo ekologiškuose grikių pasėliuose ilgiau susilaikiusi drėgmė lėmė didesnes mikotoksinų koncentracijas. Kadangi mokslininkai plačiai nagrinėja mikotoksikologinę taršą įvairių javų grūduose, bet mažai atlikta tyrimų apie ekologiškai ir įprastai augintų grikių grūdų užterštumą mikotoksinais, tikslinga ir toliau tęsti šios srities tyrimus.

## IŠVADOS

1. 2011–2013 m. grikių grūdai buvo pažeisti *Fusarium* genties grybais, kurių užterštumas skirtingais tyrimų metais siekė 11–58,5 %. Įvertinus rūšinę sudėtį, didžiausią dalį sudarė *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. semitectum*, *F. graminearum* ir kt. *Fusarium* spp. rūšių sudėtis skirtingais tyrimų metais, kaip ir analizuotų mikotoksinų koncentracijos, skyrėsi.

2. Po 7 mėnesių sandėliavimo atliktos analizės parodė, kad atsirado grūdų, užterštų *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, padidėjo užterštumas *Penicillium* genčių grybais. Akivaizdu, kad šie grybai pateko iš sandėliavimo aplinkos, nes po derliaus nuėmimo jų nebuvo nustatyta. Nevalytuose grikių grūduose AFL B<sub>1</sub> rizika padidėjo dvigubai, o OCH A – 22 %.

3. Trijų tyrimų metų duomenimis nustatyta, kad grikių, augintų ekologiškai ir įprastai, didžiausia mikotoksikologinė tarša buvo 2011 m.: 78 % grikių mėginių buvo užteršti trimis toksinais – DON, AFL B<sub>1</sub> ir OCH A bei 22 % mėginių

keturiais toksinais – DON, AFL B<sub>1</sub>, OCH A ir ZEA. Daugeliu atvejų DON, ZEA ir AFL B<sub>1</sub> kiekiai viršijo Europos komisijos reglamento (EB) Nr. 1881/2006 reglamentuotas kūdikių ir vaikų mitybai skirtų perdirbti grūdinių produktų leidžiamas koncentracijas.

## PADĖKA

Straipsnyje pateikti tyrimų rezultatai, gauti vykstant LMT projektą (sutarties Nr. SVE-04/2014) „Sveikų produktų gamybai aktualių augalų saugos ir kokybės gerinimas auginant ir perdirbant“ pagal nacionalinę mokslo programą „Saugus ir sveikas maistas“.

Gauta 2014 04 18  
Priimta 2014 06 26

## LITERATŪRA

1. Amarowicz R., Fornal L. 1987. Characteristics of buckwheat grain mineral components and dietary fiber. *Fagopyrum*. Vol. 7. P. 3–6.
2. Bernhoft A., Torp M., Clasen P-E., Løes A. K., Kristoffersen A. B. 2012. Influence of agronomic and climatic factors on *Fusarium* infestation and mycotoxins contamination of cereals in Norway. *Food Additives and Contamination*. Vol. 29. P. 1129–1140.
3. Brindzová L., Mikulášová M., Takácsová M., Mošovská S., Opattová A. 2009. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of extracts from oat, buckwheat and wheat bran in the *Salmonella* / microsome assay. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 22. P. 87–90.
4. Čabarkapa I. S., Sedej I. J., Sakač M. B., Šarić L. Č., Plavšić D. V. 2008. Antimicrobial activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls extract. *Food Processing, Quality and Safety*. Vol. 4. P. 159–163.
5. Diaz D. E. 2005. *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press. 349 p.
6. Edesi E., Järvan M., Adamson A., Lauringson E., Kuht J. 2012. Weed species diversity and community composition in conventional and organic farming: a five-year experiment. *Zemdirbyste-Agriculture*. Vol. 99. No. 4. P. 339–346.
7. Eriksen G. S., Alexander J. 1998. *Fusarium Toxins in Cereals – a Risk Assessment*. TemaNord Report 502. Nordic Council of Ministers, Copenhagen. 115 p.
8. *Europos Sąjungos oficialusis leidinys L 364/5*. 2006. *Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1881/2006*.
9. Giménez I., Escobar J., Ferruz E., Loran S., Herrera M., Juan T., Herrera A., Arino A. 2012. The effect of weather and agronomic practice on mycotoxin in durum wheat. *Journal of Life Sciences*. Vol. 6. P. 513–517.
10. Juodeikienė G., Bašinskienė L. 2012. *Grūdų laikymo, kokybės nustatymo ir apskaitos vadovas*. Lietuvos grūdų perdirbėjų asociacija. 298 p.
11. Krysińska-Traczyk E., Perkowski J., Dutkiewicz J. 2007. Levels of fungi mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereals crops in Eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. Vol. 14. P. 159–167.
12. Krkoškova B., Mrázova Z. 2005. Prophylactic components of buckwheat. *Food Research International*. Vol. 38. P. 561–568.
13. Leslie J. F., Summerell B. A. *The Fusarium Laboratory Manual*. 2006. Iowa. USA: Blackwell Publishing. 388 p.
14. Llewellyn G. C., Sherertz P. C., Armstrong C. W., Miller G. B., Reynolds J. D., Kimbrough T. D., Bean G. A., Hagler W. M., Haney C. A., Trempus C. S., O'Rear C. E., Dashek W. V. 1988. Mycotoxigenic isolates and toxin production on buckwheat and rice hulls used as bedding materials. *Journal of Industrial Microbiology*. Vol. 3. P. 351–356.
15. LST EN 15891:2010. *Maisto produktai. Deoksinivalenolio nustatymas grūduose, jų produktuose ir kūdikiams bei mažiems vaikams skirtuose grūdiniuose maisto produktuose. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodas, taikant gryninimą imuninio giminiškumo kolonėlėje ir ultravioletinį aptikimą*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2010.
16. LST EN ISO 7218:2007. *Maisto ir pašarų mikrobiologija. Mikrobiologinių tyrimų bendrieji reikalavimai ir rekomendacijos* (tapatus ISO 7218:2007). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2008.
17. Lugauskas A. Mikotoksinų kaupimosi maiste dėsniumai ir prevencinių saugos priemonių paieška. 2006. *Maisto chemija ir technologija*. Nr. 2. P. 16–27.
18. Mathur S. B., Kongsdal O. 2003. *Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi*. Copenhagen. 425 p.
19. Matić J. J., Mastiloviã J., Čabarkapa I. S., Mandiã A. I. Mycotoxins as a risk in the grain food. 2009. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Proc. Nat. Sci, Matice Srpska Novi Sad*. No. 117. P. 79–86.
20. Mošovská S., Bírošová L. 2012. Antimycotic and antifungal activities of amaranth and buckwheat extracts. *Asian Journal of Plant Sciences*. Vol. 3. P. 160–162.
21. Nelson P. E., Toussoun T. A., Marasas W. F. O. 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. London. 193 p.
22. Paterson R. M., Lima N. 2010. Toxicology of mycotoxins. *Toxicology*. Vol. 2. P. 31–59.



23. Pczczółkowska A., Fordónski G., Olszewski J., Okorski A. 2011. The effect of fungicide treatment on the productivity and health of buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Polish Journal of Natural Sciences*. Vol. 26. No. 1. P. 14–26.
24. Satton D., Fotergill A., Rimaldi M. 2001. *Opredelitel patogennykh i uslovno patogennykh gribov*. Moskva. 451 s.
25. Shapira R. 2004. Control of mycotoxins in storage and techniques for their decontamination. In: *Mycotoxins in Food – Detection and Control*. Cambridge, England. P. 190–223.
26. Tarakanovas P., Raudonius S. 2003. *Agrominių tyrimų duomenų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, SPLIT-PLOT iš paketo SELEKCIJA ir IRRISTAT*. Akademija. P. 57.
27. Vojtíšková P., Kmentová K., Kubáň V., Kráčmar S. 2012. Chemical composition of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) and selected buckwheat product. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. Vol. 1. P. 1011–1019.
28. Zakarackas R. 1999. *Grikliai*. Lietuvos žemdirbystės institutas, Perlojos bandymų stotis. 30 p.
29. *Žemės ūkio informavimo ir kaimo verslo centras*. Informacija apie 2013 m. Lietuvoje deklaruotas žemės ūkio naudmenas, miškus ir kitus plotus [žiūrėta 2014-03-06]. Prieiga per internetą: <https://www.vic.lt/uploads/file/Pasel2013-galutinis%283%29.pdf>

**Ilona Kerienė, Audronė Mankevičienė,  
Rūta Česnulevičienė, Eugenija Bakšienė**

**BUCKWHEAT GRAIN CONTAMINATION WITH  
MICROSCOPIC FUNGI AND MYCOTOXINS**

*S u m m a r y*

Buckwheat grain contamination with microscopic fungi and mycotoxins was investigated at the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry (LRCAF) during 2011–2013. The aim of the research was to determine microscopic fungi and mycotoxin contamination in buckwheat grain harvested in 2011–2013. Test grain samples were collected from the fields of organically and conventionally produced buckwheat of the LRCAF Vokė Branch and the Perloja Experimental Station. Mycotoxins in grain were detected by immunoenzyme (ELISA) and high performance liquid chromatography (HPLC) methods. The test showed that the grains were infested with the fungi of *Fusarium* genus and the grain contamination level ranged from 11–58.5% in different years. Analysis of the species composition indicated *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. semitectum*, *F. graminearum* to account for the largest share. *Fusarium* spp. composition differed between experimental years, likewise the concentrations of the assayed mycotoxins.

Analyses done after 7 months of storage showed the fungus of *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* to be present on the stored grain. This suggests that these fungi were present in the storage environment since no presence of them was detected shortly after harvesting. In uncleaned grain, the risk of AFL B<sub>1</sub> doubled and that of OCH A increased by 22%. The greatest mycotoxicological contamination on buckwheat grain was identified in 2011, when 78% of buckwheat samples were co-contaminated with three toxins – DON, AFL B<sub>1</sub> and OCH A, and 22% of samples were co-contaminated with four toxins – DON, AFL B<sub>1</sub>, OCH A and ZEA.

**Key words:** buckwheat, mycotoxins, contamination, microscopic fungi