



**INSTYTUT BIOTECHNOLOGII
PRZEMYSŁU ROLNO-SPOŻYWCZEGO
im. prof. Wacława Dąbrowskiego**

Sprawozdanie merytoryczne z zadania:

„Określenie wpływu ograniczenia chemicznej ochrony roślin na występowanie mykotoksyn, grzybów i alkaloidów w uprawach polowych oraz opracowanie działań zapobiegawczych powstawania takich zagrożeń w ekologicznej produkcji rolniczej”

INSTYTUT BIOTECHNOLOGII
PRZEMYSŁU ROLNO-SPOŻYWCZEGO
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36
tel. 22 606 36 00, fax 22 849 04 26
NIP 525-000-82-84, REGON 000053835

Warszawa, dnia 15.11.2018

.....
pieczęć wnioskodawcy

Minister Rolnictwa
i Rozwoju Wsi
ul. Wspólna 30
00-930 Warszawa

SPRAWOZDANIE

z zadania wykonanego w ramach badań na rzecz rolnictwa ekologicznego w 2018 r.

pt. „Określenie wpływu ograniczenia chemicznej ochrony roślin na występowanie mykotoksyn, grzybów i alkaloidów w uprawach polowych oraz opracowanie działań zapobiegawczych powstawania takich zagrożeń w ekologicznej produkcji rolniczej”

wykonanego na podstawie dotacji przedmiotowej udzielonej na podstawie § 8 ust. 6 rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. 2015 poz. 1170) Nr Hor.re. 027.I.2018 z dnia 24 kwietnia 2018.

Jednostka badawczo-rozwojowa

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Zakład Technologii Fermentacji

ul. Rakowiecka 36

02-532 Warszawa

tel.: 848 02 24, 849 50 39, 606 36 00

fax: 849 04 26 (28), e-mail: ibprs@ibprs.pl

nr konta 67 1240 1095 1111 0000 0336 5564

Bank PEKAO S.A.

Status prawny działania jednostki:

KRS nr 0000126823

GŁÓWNY KSIĘGOWY

.....*Izabela Grzyżanowska*.....

główny księgowy

PROKURENT

dr hab. inż. Marek Roszko

pieczęć i podpis wnioskodawcy

Otrzymują:

Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Departament Hodowli i Ochrony Roślin, Wydział Rolnictwa Ekologicznego

Kierownik /koordynator:

dr inż. Marta Kupryś-Caruk

IBRPS - Zakład Technologii Fermentacji

tel.: +48 22 606 38 96

e-mail: marta.kuprys@ibprs.pl

Spis autorów:

dr inż. Katarzyna Piasecka-Jóźwiak

mgr Beata Chabłowska

dr Renata Choińska

dr inż. Antoni Miecznikowski

Miejsce realizacji zadania badawczego

- Zakład Technologii Fermentacji, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego (IBPRS)
- Gospodarstwo Rolne Kamil Matuszak, Janowica 15, 21-070 Cyców
- Gospodarstwo Rolne Agnieszka i Zbigniew Chołuj, Zielonka Stara 54, 26-700 Zwolen

Załącznik: Instrukcja stosowania preparatu drożdżowego do ziarna zbóż

1. Analiza aktualnego stanu nauki i techniki

Przechowalnictwo ziarna zbóż to szereg postępujących po sobie czynności, które mają ogromne znaczenie w zapewnieniu odpowiedniej jakości ziarna po zbiorze. Przed załadunkiem do magazynu ziarno powinno być oczyszczone, podsuszone (jeśli to konieczne) do wilgotności 14-15%, a następnie schłodzone. Prawidłowe wysuszenie i schłodzenie ziarna nie wystarcza do zapewnienia długiego okresu przechowywania, bez zmian jakościowych ziarna. Po załadunku do magazynu ziarno powinno być także okresowo przewietrzane w celu ograniczenia powstawania różnicy temperatury w składowanym ziarnie. Te wszystkie zabiegi mają na celu ograniczenie aktywności biologicznej i enzymatycznej składowanego surowca, która to aktywność powoduje ubytek suchej masy ziarna, spadek zdolności kiełkowania, przegrzanie, rozkład glutenu, gnicie, rozwój szkodników, powstawanie zapachu magazynowego, aktywizację procesów fermentacyjnych oraz pleśnienie [Janowicz, 2007].

Szczególnie niebezpiecznym zjawiskiem jest porażenie ziarna zbóż przez grzyby pleśniowe. Grzyby pleśniowe rozwijają się na ziarnie podczas jego normalnej wegetacji. Duże zagrożenie stanowią grzyby z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*, nazywane magazynowymi, które rozwijające się wskutek niewłaściwie przechowywanego ziarna. Wytwarzają one niebezpieczne produkty przemiany materii, tzw. mikotoksyny (ochratoksyna A, aflatoksyny) o różnorodnym, szkodliwym działaniu na zdrowie ludzi i zwierząt. Niebezpieczne dla zdrowia są również mikotoksyny fuzaryjne (deoksyniwalenol, zearalenon, toksyna T-2/HT-2), wytwarzane przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, które często porażają zboża podczas jego wegetacji. Badania przeprowadzone w 2014 roku i dotyczące zanieczyszczenia ziarna zbóż pochodzących z różnych regionów Polski wykazały, że toksyny fuzaryjne były najczęściej wykrywanymi mikotoksynami [Bryła i in. 2016].

Ważnym czynnikiem ograniczającym rozwój grzybów pleśniowych w ziarnie i tworzenie się toksyn jest odpowiednie przechowywanie ziarna, które umożliwia utrzymanie jego wilgotności na poziomie 13-13,5% przy jednoczesnej kontroli temperatury w magazynie, która nie powinna przekraczać 15°C [Podolska 2013]. Odpowiednie warunki składowania ziarna zapewniają nowoczesne magazyny wyposażone np. w silosy BIN, przeznaczone do użytkowania w dużych gospodarstwach [Rudziński 2011]. W małych gospodarstwach, do których należą gospodarstwa zajmujące się uprawą zbóż w systemie ekologicznym, do przechowywania ziarna stosuje się różnorodne rozwiązania np. worki polietylenowe, beczki drewniane, metalowe, a powszechnie również worki typu big-bag, które nie pozwalają na aktywną wentylację ziarna (rys. 1).



Rys. 1. Worki typu big-bag do przechowywania ziarna

W gospodarstwie nie zawsze istnieje także możliwość podsuszenia ziarna po zbiorze, ponieważ suszenie jest procesem bardzo energochłonnym i kosztownym [Janowicz 2007]. Z tego względu w tych właśnie gospodarstwach istnieje największe ryzyko skażenia przechowywanego ziarna pleśniami i mikotoksynami.

Wobec ograniczeń stosowania chemicznych fungicydów w rolnictwie ekologicznym rozważane jest stosowanie metod biologicznych, wykorzystujących naturalne zdolności niektórych organizmów do ograniczania rozwoju pleśni, a także przekształcania mikotoksyn do związków nieszkodliwych [Piotrowska 2012]. W ten nurt wpisują się badania nad aktywnością antymikrobiologiczną drożdży – drobnoustrojów naturalnie występujących w środowisku roślinnym.

Już dość dawno opisane zostały pierwsze wyniki badań nad wykorzystaniem drożdży do kontrolowania wzrostu pleśni podczas przechowywania pszenicy o dużej wilgotności. Peterson i Schnürer (1995) wykazali, że gatunek *Pichia anomala* (synonim *Hansenula anomala*) ograniczył wzrost *Penicillium roquefortii*, a także innych pleśni. W zależności od liczby wprowadzonych drożdży zaobserwowano całkowite zahamowanie wzrostu pleśni lub redukcję ich liczby przynajmniej o kilka poziomów. W opisanych badaniach nieco mniejszy efekt inhibicyjny wobec pleśni wykazały drożdże *Pichia guilliermondii*, a niewielki *Saccharomyces cerevisiae*. Antagonizm drożdży wobec pleśni wykazano nie tylko w warunkach laboratoryjnych, ale także w warunkach mikrotechnicznych – imitujących przechowywanie zboża w warunkach hermetycznych.

W badaniach Rabelo de Lima i in. (2013) określano aktywność antymikrobiologiczną drożdży wyrażającą się hamowaniem wzrostu pleśni *Colletotrichum gloeosporioides*, która powoduje znaczne straty w uprawach roślin tropikalnych m.in. kakaowca i papaji. W tym

przypadku stwierdzono, że 5 spośród 580 szczepów drożdży (szczególnie z gatunku *Meyerozyma guilliermondii*) charakteryzowało się zdolnością do hamowania wzrostu grzybni i zarodnikowania *C. gloeosporioides*. Zespół pod kierunkiem Robiglio (2011) stwierdził, że możliwe będzie zastosowanie jako środka biokonserwującego drożdży *Aureobasidium pullulans* i *Rhodotorula mucilaginosa*, wyizolowanych z owoców, charakteryzujących się aktywnością wobec pleśni *Penicillium expansum*, powodujących psucie gruszek podczas przechowywania w niskich temperaturach. W badaniach Piaseckiej-Józwiak i Chabłowskiej (2017) oceniono antagonistyczną aktywność szczepów drożdży wyizolowanych z różnych siedlisk, skierowaną wobec 13 różnych szczepów pleśni w ziarnach zbóż. Pozytywny efekt hamowania wzrostu grzybni pleśniowej przez drożdże wykazano w przypadku przechowywanego ziarna pszenicy i żyta.

Wyniki badań naukowych dają podstawę do opracowania preparatów składających się ze szczepów drożdży hamujących bądź ograniczających rozwój grzybów pleśniowych w przechowywanym ziarnie zbóż. Obecnie na polskim rynku dostępnych jest 10 preparatów biologicznych do stosowania zapobiegawczo w ochronie warzyw, drzew owocowych, rzepaku czy ziemniaka przed chorobami powodowanymi przez bakterie i grzyby (<https://www.ior.poznan.pl/19,wykaz-srodkow-ochrony-roslin-do-produkcji-ekologicznej.html>, odczyt 12.11.2018 r.). Jako substancje czynne w tych preparatach wykorzystano szczepy grzybów (np. *Aerobasidium pullulans* DSM 14940, *Trichoderma harzianum* Rifai T-22, *Gliocladium catenulatum*) i bakterii (*Bacillus subtilis* QST 713, *Pseudomonas sp.* DSMZ 13134). Brak jest natomiast biologicznych preparatów składających się ze szczepów drożdży o działaniu hamującym rozwój pleśni do stosowania w uprawie zbóż, czy też do ochrony zbóż podczas magazynowania.

Z tego powodu w ramach badań prowadzonych na rzecz rolnictwa ekologicznego podjęto próbę opracowania ekologicznego sposobu biokonserwacji ziarna zbóż poprzez zastosowanie biopreparatu składającego się ze specjalnie wyselekcjonowanego szczepu drożdży o właściwościach antagonistycznych wobec grzybów pleśniowych.

2. Zakres badań

Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych w Zakładzie Technologii Fermentacji IBPRS oraz w warunkach produkcyjnych w dwóch certyfikowanych gospodarstwach rolnych zajmujących się uprawą zbóż w systemie ekologicznym, znajdujących się w województwie mazowieckim i lubelskim.

Zakres badań wykonywanych w ramach poszczególnych podzadań obejmował:

Podzadanie 1.

Ocenę stopnia zanieczyszczenia pleśniami i mikotoksynami ziarna zbóż z gospodarstw ekologicznych, pochodzącego ze zbiorów z roku 2017 (termin realizacji kwiecień-maj 2018)

Podzadanie 2.

Potwierdzenie zdolności wybranych szczepów drożdży do hamowania wzrostu wyizolowanych ze zbóż grzybów pleśniowych (termin realizacji: kwiecień-czerwiec 2018)

Podzadanie 3.

Identyfikację wytwarzanych przez drożdże związków lotnych hamujących wzrost pleśni (termin realizacji: czerwiec-październik 2018)

Podzadanie 4.

Opracowanie składu kultury drożdżowej oraz metody jej utrwalenia z zastosowaniem techniki liofilizacji (termin realizacji: czerwiec-lipiec 2018)

Podzadanie 5.

Ocenę zdolności kultury drożdżowej do hamowania wzrostu pleśni w ziarnie pszenicy (próby przechowalnicze w mini silosach w warunkach laboratoryjnych) (termin realizacji: lipiec-sierpień 2018)

Podzadanie 6.

Określenie skuteczności zastosowania wytypowanej kultury drożdżowej w procesie biokonserwacji przechowywanego ziarna pszenicy, przy powiększeniu skali doświadczenia w warunkach produkcyjnych (sierpień-listopad 2018)

Podzadanie 7.

Opracowanie wyników badań (termin realizacji: październik-listopad 2018)

3. Metody analityczne

W badaniach wykorzystano następujące metody analityczne (Tab.1):

Tabela 1. Metody analityczne stosowane podczas realizacji zadania badawczego

Oznaczenie/metoda	Norma/procedura
Wilgotność ziarna zbóż	PN-EN ISO 712:2012 Ziarno zbóż i przetwory zbożowe -- Oznaczenie wilgotności -- Metoda odwoławcza. Metoda polega na oznaczeniu ubytku wilgotności po 3 godzinnych suszeniu zmielonej próbki ziarna w temp. 120°C
Liczba drożdży i pleśni	PN-EN ISO 4833:2004+Ap1:2005 Mikrobiologia żywności i pasz. Ogólne zasady oznaczania liczby drobnoustrojów. Metoda płytkowa w 30°C. PN-ISO 21527-2:2009 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni. Część 2: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody niższej lub równej 0,95. Wykonano posiew wgłębny próbek (odpowiednich naważek ziarna) i ich dziesiętnych rozcieńczeń w soli fizjologicznej, przygotowanych poprzez wytrząsanie przez 30 min. w temp. pokojowej, stosując pożywkę YGC , odczytu wyników posiewów dokonano po 5 dniach inkubacji płytek w temp. 25°C
Zawartość mikotoksyn w ziarnie	Immunoenzymatyczna metoda Elisa z zastosowaniem komercyjnych zestawów testów firmy Romer Labs®, zgodnie z instrukcją producenta. Mikotoksyny oznaczano w ekstraktach metanolowych (zmieloną próbkę ziarna wytrząsano przez 20 min. w 70% metanolu, następnie przesączono i uregulowano pH do wartości 6-8)
Identyfikacja gatunkowa drożdży i pleśni	Izolację całkowitego DNA z pleśni i drożdży wykonano przy użyciu komercyjnego zestawu Bead-Beat Micro AX Gravity A&A Biotechnology, według procedury izolacji DNA dostarczonej razem z tym zestawem. Identyfikację molekularną wyizolowanych pleśni przeprowadzono na podstawie sekwencji regionów wewnętrznej transkrypcji ITS (wewnętrznych regionów niekodujących ang. internal transcribed spacer), która występuje w obrębie genów rRNA. Porównanie sekwencji regionu ITS jest szeroko stosowane w taksonomii i filogenezy molekularnej m.in. z powodu występowania w dużej liczbie kopii. Do przeprowadzenia reakcji PCR wykorzystano standardowe primery ITS1 i ITS4 (Gardes i Bruns 1993, Martin i Rygiewicz 2005). Sekwencjonowanie produktu PCR przeprowadzono za pomocą sekwenatora kapilarnego w firmie Genomed. Zamplifikowane fragmenty rDNA wykorzystano do określenia taksonomicznego pokrewieństwa grzybów strzępkowych i drożdży z sekwencjami zdeponowanymi w bazie Blast
Liofilizacja drożdży	Drożdże utrwalano metodą sublimacyjną prowadzoną przy użyciu liofilizatora laboratoryjnego Christ Alpha 1-4, w którym możliwe jest przeprowadzenie wszystkich trzech etapów procesu suszenia sublimacyjnego: zamrażania, głównego suszenia oraz dosuszenia; na dowolnym etapie procesu można kontrolować temperaturę produktu, temperaturę kondensatora lodu oraz wartość ciśnienia. Jako dodatki ochronne stosowano glicerol oraz odtłuszczone mleko w proszku w ilości odpowiednio 25 % i 75 % w stosunku do masy wilgotnego

	<p>materiału. Temperatura kondensatora lodu wahała się w granicach od -55 do -57 °C, a najniższa temperatura suszonego preparatu osiągała poziom -26 °C, wzrastając pod koniec etapu dosuszania do wartości -5 °C. Proces dehydratacji trwał około 24 h. Końcowa wilgotność preparatów wynosiła 2-3 %.</p>
<p>Identyfikacja lotnych metabolitów wytwarzanych przez drożdże</p>	<p>Adsorpcję związków z przestrzeni pomiędzy płytką z grzybnią pleśni a płytką z drożdżami przeprowadzono przy użyciu włókna 75 µm Carboxen-PDMS (Supelco), następnie po desorpcji związków w komorze nastrojowej chromatografu gazowego (w temp. 220°C) wykonano analizę metodą chromatografii gazowej (chromatograf firmy Varian, model 3800), po czym przeprowadzono identyfikację związków za pomocą spektrometru masowego model Saturn 2000 z analizatorem typu pułapka jonowa. Korzystano z bibliotek widm Varian i NIST.</p> <p>Parametry metody chromatograficznej:</p> <ul style="list-style-type: none"> - kolumna kapilarna DB-5 MS -temperatura dozownika 170°C - program temperaturowy: 50°C (1,8 min.), wzrost (5°C/min.) do 220°C i utrzymanie przez 1 min.

4. Wyniki

4.1. Ocena stopnia zanieczyszczenia pleśniami i mikotoksynami ziarna zbóż z gospodarstw ekologicznych, pochodzącego ze zbiorów z roku 2017.

Materiał wykorzystany w tym podzadaniu stanowiło ziarno różnych zbóż pozyskane z certyfikowanych gospodarstw ekologicznych znajdujących się w różnych województwach, pochodzące ze zbiorów w roku 2017. Przechowywane było ponad 8 miesięcy, przeważnie w big bagach. Wyniki analizy fizyko-chemicznej oraz mikrobiologicznej ziarna przedstawiono w tab. 2.

Przeanalizowano łącznie 27 próbek ziarna pięciu różnych zbóż pochodzących z jedenastu województw. Ziarno charakteryzowało się niską wilgotnością, w przedziale od 9,1 do 12,9%. Liczba drożdży i pleśni wynosiła od 3,00 do 5,38 log j.t.k. g⁻¹ (tab. 2).

W tab. 2 zaprezentowano wyniki oznaczenia pięciu różnych mikotoksyn, najczęściej pojawiających się w ziarnie zbóż. Kolorem czerwonym zaznaczono wartości wyższe niż dopuszczalne limity zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) NR 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalającym najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych.

Zawartość poszczególnych mikotoksyn była zróżnicowana w zależności od ziarna. We wszystkich analizowanych próbkach ziarna stwierdzono obecność deoksyniwalenolu (DON), ale na dopuszczalnym poziomie, który wynosi 1250 µg kg⁻¹ w przypadku nieprzetworzonych zbóż, przy czym dla owsa limit zawartości DON wynosi 1750 µg kg⁻¹. Zauważono jednakże, że w próbkach owsa zawartości DON-u były najwyższe w

porównaniu do pozostałych zbóż.

Dopuszczalna zawartość sumy aflatoksyn (AFL) była przekroczona tylko w jednej próbce żyta i wynosiła $6,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (dopuszczalna zawartość sumy aflatoksyn wynosi $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). Większą od dopuszczalnej zawartość ochratoksyny A (OTA) stwierdzono w czterech próbkach ziarna, w tym dwóch próbkach jęczmienia. Stwierdzono obecność toksyny T-2 w 9 próbkach ziarna, w tym w czterech próbkach żyta. W przypadku zearalenonu (ZEA) jego zawartość była większa od dopuszczalnej w czterech próbkach ziarna, przy czym w jednej próbce żyta nawet dwukrotnie (dopuszczany poziom zanieczyszczenia tą mikotoksyną to $100 \mu\text{g kg}^{-1}$). Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy wilgotnością przechowywanego ziarna, a zawartością mikotoksyn w badanych próbkach.

Z analizowanych próbek ziarna udało się pozyskać 28 izolatów grzybów strzępkowych (pleśni) oraz określić ich przynależność gatunkową metodą biologii molekularnej. Wyizolowane pleśnie należały do rodzajów: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Lichteimia* oraz *Trichoderma*. Szczegółowe wyniki identyfikacji zaprezentowano w tab. 3. Ponadto udało się wyizolować pleśń z gatunku *Fusarium graminearum* (rys. 2), która wytwarza mikotoksyny z grupy pochodnych trichotecenów: deoksyniwalenol oraz toksynę T-2, a także pleśń z gatunku *Fusarium sporotrichoides* (rys. 3), która odpowiedzialna jest za syntezę zearalenonu (Czerwiecki 2007; Jang i in. 2013; Da-Woon i in. 2016).

Na podstawie przeprowadzonego screeningu stwierdzono, że największe znaczenie w przypadku ziarna zbóż ma deoksyniwalenol należący do mikotoksyn fuzaryjnych, ponieważ jego obecność została stwierdzona we wszystkich analizowanych próbkach. We wszystkich zbożach stwierdza się naturalną obecność mikotoksyn fuzaryjnych w ilości 200-300 $\mu\text{g/kg}$. Jednak w warunkach sprzyjających rozwojowi pleśni (podwyższona temperatura, duża wilgotność), zanieczyszczenie mikotoksynami fuzaryjnymi może wzrosnąć do niebezpiecznego poziomu aż 2-4 mg/kg [Janowicz, 2007].

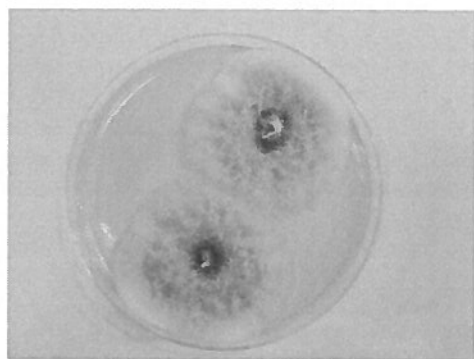
Tabela 2. Zawartość mikotoksyn, wilgotność oraz liczba drożdży i pleśni w ziarnie zbóż z gospodarstw ekologicznych ze zbioru z 2017 r.

Zboże	Województwo/powiat	Wilgotność (%)	Drożdże i pleśnie (log j.t.k. g ⁻¹)	Mikotoksyny [µg/kg]				
				OTA	AFL	DON	ZEA	T-2
pszenica jara	lubelskie/krasnostawski	12,9	4,65	n.o.	1,2	132,1	50,4	56,2
	dolnośląskie/lwówecki	11,2	4,30	n.o.	1,4	115,8	n.o.	n.o.
	lubelskie/parczewski	11,3	4,30	n.o.	1,5	132,6	n.o.	n.o.
	mazowieckie/zwoleński	11,7	4,00	n.o.	1,5	124,6	n.o.	n.o.
	warmińsko-mazurskie/działdowski	12,6	3,60	n.o.	1,4	136,6	n.o.	n.o.
	małopolskie/proszowicki	9,1	3,70	n.o.	1,7	119,7	n.o.	n.o.
	łódzkie/zduńskowolski	10,0	3,65	2,3	1,4	114,4	n.o.	n.o.
	lubelskie/łęczyński	12,0	3,00	2,0	1,6	103,6	n.o.	n.o.
	wielkopolskie/międzzychodzki	9,6	4,70	12,7	1,3	232,2	108,3	127,7
	podkarpackie/brzozowski	11,6	4,54	n.o.	2,1	180,6	n.o.	48,3
żyto	mazowieckie/zwoleński	11,2	4,54	n.o.	3,0	292,3	n.o.	43,1
	podlaskie/białostocki	10,0	4,40	n.o.	3,2	170,0	43,4	n.o.
	łódzkie/zduńskowolski	10,0	4,11	3,5	6,5	293,7	84,8	129,5
	wielkopolskie/międzzychodzki	10,8	4,48	10,9	4,1	193,9	221,2	157,1
	wielkopolskie/międzzychodzki	11,8	4,00	11,3	1,5	294,6	134,8	n.o.
	małopolskie/dąbrowski	11,3	5,04	5,8	1,6	140,0	29,6	n.o.
jęczmień	małopolskie/proszowicki	9,4	3,30	2,4	1,8	156,6	30,7	n.o.
	lubelskie/bialski	9,9	5,30	4,0	1,5	256,2	27,0	n.o.
	mazowieckie/zwoleński	11,4	4,30	n.o.	3,2	198,9	n.o.	n.o.
	kujawsko-pomorskie/mogileński	10,6	3,00	n.o.	n.o.	153,3	n.o.	56,4
orkisz	dolnośląskie/lwówecki	9,4	5,04	n.o.	n.o.	209,5	n.o.	79,7
	lubelskie/łęczyński	9,0	4,90	n.o.	2,1	200,5	109,1	22,2
	dolnośląskie/lwówecki	12,3	4,20	n.o.	n.o.	393,4	n.o.	n.o.
	zachodniopomorskie/słowiński	10,7	4,60	n.o.	n.o.	510,0	n.o.	72,6
	mazowieckie/zwoleński	9,1	5,38	n.o.	n.o.	408,0	n.o.	170,4
owies	wielkopolskie/międzzychodzki	9,5	4,48	n.o.	n.o.	532,6	n.o.	n.o.
	lubelskie/bialski	9,6	4,54	n.o.	n.o.	415,4	n.o.	n.o.

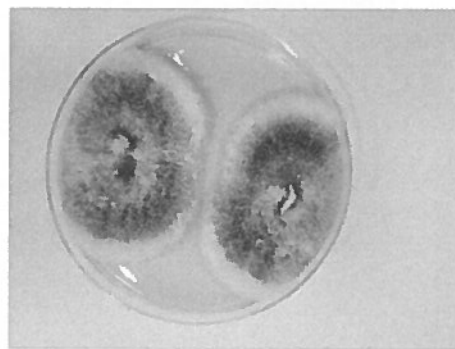
n.o.- nie oznaczono (poniżej granicy oznaczalności metody, która dla OTA wynosi 2,0; AFL: 1,0; ZEA: 25,0; T-2: 20,0 µg kg⁻¹)

Tabela 3. Gatunki grzybów strzępkowych wyizolowanych z ziaren zbóż na podstawie sekwencji ITS1-ITS4

Oznaczenie izolatu	Gatunek pleśni
M1	<i>Fusarium graminearum</i>
M3	<i>Fusarium cereals</i>
M4	<i>Fusarium cereals</i>
M5	<i>Penicillium chrysogenum</i>
M6	<i>Penicillium expansum</i>
M7	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
M8	<i>Lichteimia corymbifera</i>
M9	<i>Pennicilium commune</i>
M10	<i>Pennicilium crustosum</i>
M11	<i>Penicillium chrysogenum</i>
M12	<i>Lichteimia corymbifera</i>
M13	<i>Alternaria forlicesensis</i>
M14	<i>Penicilium chrysogenum</i>
M15	<i>Aspergillus fumigatus</i>
M16	<i>Alternaria infectoria</i>
M17	<i>Alternaria alternata</i>
M18	<i>Aspergillus oryzae</i>
M19	<i>Alternaria slovaca</i>
M20	<i>Alternaria infectoria</i>
M22	<i>Aspergillus sp.</i>
M23	<i>Asperillus niger</i>
M24	<i>Penicilium chrysogenum</i>
M25	<i>Fusarium graminearum</i>
M26	<i>Fusarium graminearum</i>
M27	<i>Lichteimia corymbifera</i>
M28	<i>Fusarium poe</i>
M29	<i>Fusarium sporotrichoides</i>



Rys. 2. *Fusarium graminearum*



Rys. 3. *Fusarium sporotrichoides*

4.2. Potwierdzenie zdolności wybranych szczepów drożdży do hamowania wzrostu wyizolowanych ze zbóż grzybów pleśniowych.

Zbadano aktywność przeciwpleśniową dwóch szczepów drożdży wyizolowanych z ziarna zbóż w trakcie realizacji podzadania 1: *Rhodotorulla graminis* (z pszenicy) oraz *Debaromyces hanseni* (z żyta). Ich aktywność porównano z aktywnością przeciwpleśniową szczepu wzorcowego, należącego do kolekcji drobnoustrojów Zakładu Technologii Fermentacji IBPRS: *Candida tropicalis*. Szczep ten został wyizolowany w ramach innych badań prowadzonych w Zakładzie i charakteryzował się wysoką aktywnością przeciwpleśniową. Pleśnie wykorzystane w tym doświadczeniu stanowiły szczepy wyizolowane z ziarna zbóż w podzadaniu 1.

Na szalki Petriego wlewano podłoże YGC z agarem, w którym rozprowadzono odpowiednią ilość komórek drożdży, namnożonych uprzednio przez 24 godziny w płynnym podłożu YGC, do liczby 10^5 lub 10^6 komórek w 1 mL podłoża. Następnie na zestalone, zaszczepione drożdżami podłoże nanoszono punktowo fragmenty grzybni pleśni wyhodowanych na stałym podłożu YGC. Kontrole stanowiły płytki z podłożem zaszczepionym tylko pleśniami. Następnie próby (wykonane w dwóch powtórzeniach) inkubowano przez 10 dni w temp. pokojowej oraz w temp. 10°C .

Wyniki wyrażono w % zahamowania wzrostu pleśni liczonych według wzoru:

$$\frac{\text{średnica grzybni próby kontrolnej} - \text{średnica grzybni próby badanej}}{\text{średnica grzybni próby kontrolnej}} \times 100\%$$

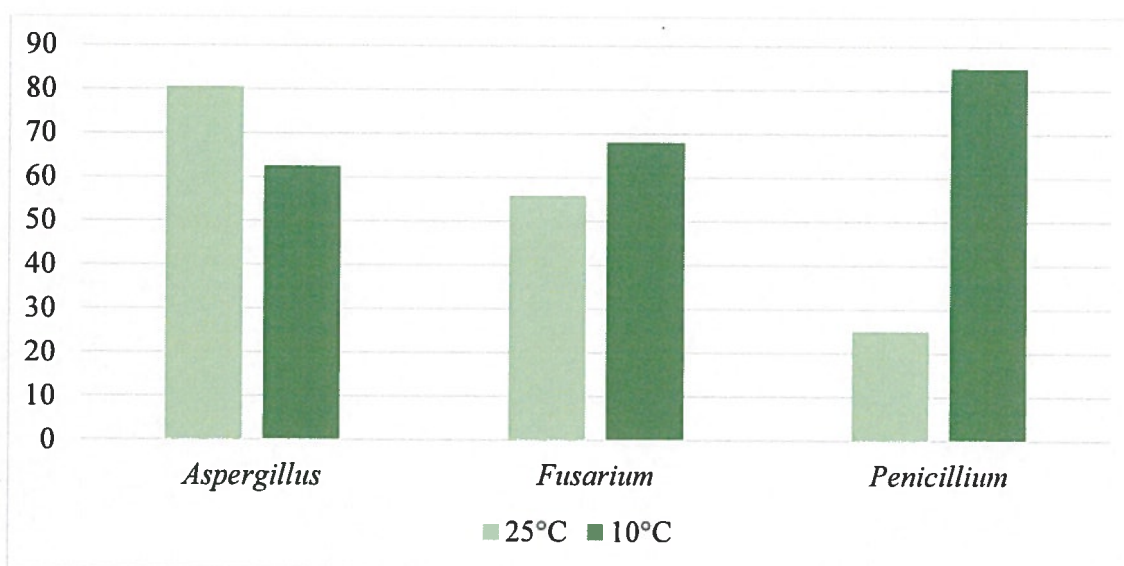
Wyniki przedstawiono w Tab. 4. oraz na Rys. 4.

Tab. 4. Zahamowanie wzrostu wybranych pleśni (%) przez szczepy drożdży w temp. 25°C

Liczba drożdży [j.t.k. mL ⁻¹]	<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>		<i>Fusarium graminearum</i>	
	10^5	10^6	10^5	10^6	10^5	10^6
<i>Candida</i>	77,8	83,3	12,5	50,0	80,8	100
<i>Rhodotorulla</i>	80,6	80,6	brak	25,0	55,8	65,4
<i>Debaromyces</i>	68,9	77,8	brak	brak	3,8	63,5

W porównaniu do szczepu wzorcowego nowowyizolowane szczepy drożdży charakteryzowały się mniejszą aktywnością antypleśniową. Większą aktywność antagonistyczną wobec wybranych pleśni oznaczono w próbach o większej liczbie komórek drożdży w pożywce. Szczep *Rhodotorulla graminis* zahamował wzrost wybranych pleśni w większym stopniu niż *Debaromyces hansenii*; najbardziej odporny na działanie wszystkich drożdży okazał się szczep *Penicillium chrysogenum*.

Na podstawie wyników tego doświadczenia do dalszych badań wytypowano szczep *Rhodotorulla graminis*, którego aktywność antypleśniową zbadano dodatkowo w temp. 10°C (Rys. 4).



Rys. 4. Zahamowanie wzrostu pleśni (%) przez szczep drożdży *Rhodotorulla graminis* w zależności od temp. inkubacji

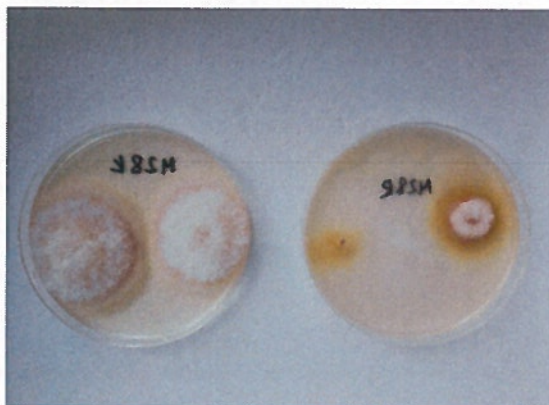
W niższej temperaturze szczep *Rh. graminis* wykazał większą zdolność hamowania wzrostu pleśni z rodzaju *Fusarium* i *Penicillium* w porównaniu do temp. 25°C. Prawdopodobnie na wynik tego doświadczenia wpłynęło również to, że niska temperatura mogła spowodować wolniejszy wzrost pleśni. Niemniej jednak tolerancja badanego szczepu drożdży na niską temperaturę oraz wykazywana w niej aktywność antypleśniowa jest wynikiem korzystnym z punktu widzenia zastosowania tego szczepu drożdży w warunkach produkcyjnych.

4.3. Identyfikacja wytwarzanych przez drożdże związków lotnych hamujących wzrost pleśni.

W kolejnym etapie badań podjęto próbę identyfikacji lotnych związków wytwarzanych przez wybrany szczep drożdży *Rhodotorulla graminis*, które mają znaczenie w hamowaniu rozwoju pleśni. W tym celu wykonano doświadczenie, w którym na denko płytki Petriego wylewano pożywkę z agarem YGC, w której rozprowadzono komórki drożdży w ilości 10^6 j.t.k./mL, a na denko drugiej płytki wylewano podłoże YGC z agarem, na które po zestaleniu nanoszono punktowo fragmenty grzybni różnych pleśni wyizolowanych ze zboża w podzadaniu 1. Następnie płytki łączono szczelnie za pomocą parafilmu tak, aby nad płytką z drożdżami znajdowała się płytka z pleśniami. Płytki inkubowano w temp. 25°C. Po 6 dniach zaobserwowano zahamowanie wzrostu pleśni w porównaniu do prób kontrolnych (rys. 4-5).



Rys. 4. Wzrost *Alternaria infectoria*
(po lewej próba kontrolna, po prawej próba w obecności drożdży)



Rys. 5. Wzrost *Fusarium poe*
(po lewej próba kontrolna, po prawej próba w obecności drożdży)

Po 6 dniach inkubacji pomiędzy dwie płytki wsuwano włókno Carboxen-PDMS, za pomocą którego przeprowadzano adsorbcję związków lotnych, po czym włókno wprowadzano do komory nastrzykowej chromatografu gazowego w celu desorpcji związków. Następnie przeprowadzono analizę chromatograficzną zdesorbowanych analitów i ich identyfikację za pomocą układu GC-MS. Próbę kontrolną stanowiły płytki z podłożem z drożdżami połączone z płytkami, na których znajdowało się samo podłoże YGC bez pleśni. Wyniki analiz przedstawiono w tab. 5 i 6.

Tabela 5. Lotne metabolity zidentyfikowane w próbie drożdży inkubowanych w obecności *Alternaria infectoria*

Czas retencji	Związek	M _w [g/mol]	Wzór sumaryczny
6.43	3,5,7-cycloheptatriene-1,3-dimethanol	152.190	C ₉ H ₁₂ O ₂ (alcohol)
6.81	Thiophene,2-methoxy-5-methyl-	128.192	C ₆ H ₈ OS
11.49	Methanethione, (2,5-dimethylphenyl)-(2,4,6-trimethylphenyl)-S- oxide	284.417	C ₁₈ H ₂₀ OS
11.92	Phenylethyl alcohol	122.164	C ₈ H ₁₀ O
13.11	Benzene,1-ethenyl-4-methoxy-	134.175	C ₉ H ₁₀ O
14.49	Ethanone,1-(3-methylenecyclopentyl)	124.180	C ₈ H ₁₂ O (keton)
24.57	9-octadecenoic acid, (2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)methylester, cis-	444.656	C ₂₈ H ₄₄ O ₄ (ester)
25.64	Propanoic acid, 2-(3-acetoxy-4,4,14-trimethylandro-8-en-17-yl)	430.629	C ₂₇ H ₄₂ O ₄
30.77	1-(4-hydroxy-3,-5-di-tert.-butylphenyl)-2-methyl-3-morpholinopropan-1-one	361.526	C ₂₂ H ₃₅ NO ₃
35.13	9,17-octadecadienal, (Z)	264.446	C ₁₈ H ₃₂ O

Tabela 6. Lotne metabolity zidentyfikowane w próbie drożdży inkubowanych w obecności *Fusarium sp.*

Czas retencji	Związek	M _w [g/mol]	Wzór sumaryczny
6.18	Benzene, (1-nitroethyl)	151.165	C ₈ H ₉ NO ₂
6.43	3,5,7-cycloheptatriene-1,-3-dimethanol	152.190	C ₉ H ₁₂ O ₂ (alcohol)
6.81	Thiophene,2-methoxy-5-methyl-	128.192	C ₆ H ₈ OS
11.92	Phenylethyl alcohol	122.164	C ₈ H ₁₀ O
15.14	Furan,3-phenyl	144.170	C ₁₀ H ₈ O
16.55	Phenol, 4-ethyl-2-methoxy (p-ethylguaiaicol)	152.190	C ₉ H ₁₂ O ₂
21.20	τ-elemene (1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis-(1-methylethenyl)cyclohexane	204.351	C ₁₅ H ₂₄ seskwiterpen (Stereoisomer of β-elemene)
21.28	7-octylidenebicyclo [4,1,0] heptane	206.373	C ₁₅ H ₂₆
21.46	2,4,4-trimethyl-3(3-oxobutyl)cyclohex-2-enone	208.297	C ₁₃ H ₂₀ O ₂ (diketon)
21.54	2,5,-cyclohexadiene -1,4-dione,2,6 bis (1,1-dimethylethyl), p-benzoquinone	220.307	C ₁₄ H ₂₀ O ₂ (diketon)
22.06	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-α-curcumene	202.335	C ₁₅ H ₂₂ (terpen)
24.57	9-octadecenoic acid, (2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)methylester,cis-	444.656	C ₂₈ H ₄₄ O ₄ (ester)
28.17	(3-methyl-1,4-diphenylbicyclo [2,2,0]hex-2-yl) methanol	278.388	C ₂₀ H ₂₂ O
29.35	2-hexadecanol	242.441	C ₁₆ H ₃₄ O
30.50	1,2-benzenedicarboxylic acid, butyl octyl ester	334.449	C ₂₀ H ₃₀ O ₄
30.77	1-(4-hydroxy-3,-5-di-tert.-butylphenyl)-2-methyl-3-morpholinopropan-1-one	361.526	C ₂₂ H ₃₅ NO ₃
35.13	9,17-octadecadienal, (Z)	264.446	C ₁₈ H ₃₂ O

W przypadku próby drożdży inkubowanych w obecności pleśni z rodzaju *Alternaria* w fazie nadpowierzchniowej zidentyfikowano szereg związków, których nie wykryto w próbie bez pleśni. Na uwagę zasługuje pochodna kwasu propanowego, który zgodnie z literaturą naukową wykazuje działanie przeciw drobnoustrojowe oraz przeciw nowotworowe (tab. 5).

W przypadku inkubacji drożdży w obecności *Fusarium poe* zidentyfikowano nieobecny

w próbie kontrolnej związek seskwiterpenowy, będący stereizomerem beta-elementu, związku występującego w ziołach, przyprawach, warzywach korzeniowych, czy oleju z jałowca o potencjalnych właściwościach przeciw drobnoustrojowym (tab. 6).

Wyniki uzyskane z identyfikacji związków w fazie nadpowierzchniowej, przy braku bezpośredniego kontaktu drożdży z pleśniami wskazują, że działanie przeciwpleśniowe badanego szczepu drożdży jest związane z działaniem syntetyzowanych metabolitów lotnych.

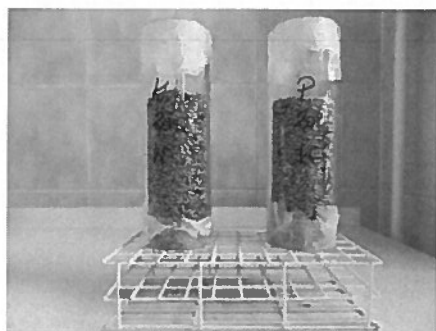
4.4. Opracowanie składu kultury drożdżowej oraz metody jej utrwalenia z zastosowaniem techniki liofilizacji.

Do doświadczeń związanych z opracowaniem preparatu drożdżowego utrwalonego techniką liofilizacji wybrano szczep *Rhodotorulla graminis*. Biomasa drożdży otrzymano w wyniku 48-godzinnej hodowli szczepu *R.graminis* w temp. 30°C, w pożywce płynnej z ekstraktem słodowym, w warunkach stałego wytrząsania. Po tym czasie biomasa odwirowano (600 obr/min, 15 min., 4°C), uzyskując 19% suchej masy w biomacie, a następnie poddano liofilizacji.

W liofilizacie oznaczono liczbę drożdży, która kształtowała się na poziomie $1,0 \times 10^9$ j.t.k. g^{-1} . Liczba ta utrzymywała się przez okres 3 miesięcy przechowywania preparatu w warunkach chłodniczych. Preparat charakteryzował się bardzo dobrą rozpuszczalnością w wodzie.

4.5. Ocena zdolności kultury drożdżowej do hamowania wzrostu pleśni w ziarnie pszenicy (próby przechowalnicze w mini silosach w warunkach laboratoryjnych)

W celu określenia sposobu stosowania nowo opracowanego biologicznego preparatu do przechowywanego ziarna zbóż, zawierającego drożdże *Rhodotorulla graminis*, wykonano testy laboratoryjne w tzw. mini silosach. W tym celu ziarno pszenicy w ilości 200 g umieszczono w szklanych tubach osłoniętych z dwóch stron parafilmem z otworami (w celu wentylacji ziarna), co obrazuje Rys. 6.



Rys. 6. Mini silosy laboratoryjne

Próby doświadczalne stanowiło ziarno w silosach, na które rozpylono preparat zawierający $1,0 \times 10^9$ j.t.k. g^{-1} , rozpuszczony w wodzie, w taki sposób aby liczba aplikowanych komórek drożdży pozostawała na poziomie $1,0 \times 10^6$ j.t.k. na 1 g ziarna. Wykonano dwa warianty doświadczeń- z mniejszym i większym dodatkiem wody. Próby kontrolne stanowiły silosy z ziarnem bez dodatku preparatu, ale z równorzędnym dodatkiem wody. Każdy wariant doświadczenia wykonano w dwóch powtórzeniach. Próby przechowywano w temperaturze 25 i 10°C. Po 5 tygodniach oznaczono wilgotność ziarna oraz liczbę drożdży i pleśni. Początkowa zawartość wilgoci w ziarnie wynosiła 9,6%. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tab. 7.

Tab. 7. Wyniki analizy ziarna pszenicy po 5 tygodniach przechowywania w mini silosach

Próba/ symbol	Temp. przechowywania [°C]	Wilgotność [%]	Liczba drobnoustrojów [Log j.t.k. g^{-1}]	
			drożdże	pleśnie
K	10	12,3	3,48	4,65
	25	10,2	3,70	4,60
P	10	12,6	5,81	4,70
	25	10,1	5,52	3,95
K/W	10	15,1	4,00	4,30
	25	12,8	4,89	4,54
P/W	10	15,0	5,60	3,66
	25	12,2	5,85	3,97

n.o. nie oznaczono (poniżej granicy oznaczalności metody)
± odchylenie standardowe

Symbole:

K – próba kontrolna, ziarno bez dodatku preparatu (dodano 0,2 mL wody)

P – ziarno z dodatkiem preparatu drożdżowego rozpuszczonego w 2 mL wody

K/W- próba kontrolna z dowlżaniem, ziarno bez dodatku preparatu (dodano 10 mL wody)

P/W-ziarno z dodatkiem preparatu drożdżowego rozpuszczonego w10 mL wody

Dodatek preparatu rozpuszczonego w większej ilości wody spowodował wzrost wilgotności ziarna do 15% w przypadku prób przechowywanych w temp. 10°C. W temp. 25°C zawartość wilgoci po 5 tygodniach przechowywania w próbach z większym dodatkiem wody wynosiła 12,2-12,8% i zwiększyła się w stosunku do wilgotności początkowej o 2,6-3,2 punktów procentowych. W próbach kontrolnych z większym dodatkiem wody liczba drożdży i pleśni była zbliżona w przypadku przechowywania silosów w temp. 10°C, w temp. 25°C liczba pleśni była mniejsza niż liczba drożdży (Tab. 7).

Próby z mniejszym dodatkiem wody po 5 tygodniach przechowywania charakteryzowały się znacznie mniejszą wilgotnością niż próby opisane powyżej (10,1-12,6%). W ziarnie z silosów kontrolnych oznaczono więcej pleśni niż drożdży niezależnie od temp. przechowywania, natomiast w próbach z dodatkiem preparatu liczba drożdży była większa niż liczba pleśni w obu wariantach temperaturowych (Tab. 7).

Wyniki tego doświadczenia wskazują na konieczność zminimalizowania dawki wody potrzebnej do rozpuszczenia preparatu tak, aby nie przekroczyć granicy 15% wilgotności, przy której może dochodzić do nadmiernego rozwoju pleśni. Zdominowanie środowiska przez drożdże daje szansę na zmniejszenie ewentualnego skażenia mikotoksynami przechowywanego ziarna.

4.6. Określenie skuteczności zastosowania wytypowanej kultury drożdżowej w procesie biokonserwacji przechowywanego ziarna pszenicy, przy powiększeniu skali doświadczenia w warunkach produkcyjnych.

W celu sprawdzenia skuteczności działania nowo opracowanego preparatu drożdżowego przeznaczonego do przechowywanego ziarna zbóż, wykonano doświadczenia w powiększonej skali w warunkach produkcyjnych w dwóch gospodarstwach rolnych zajmujących się uprawą pszenicy w systemie ekologicznym. Ziarno do doświadczeń pochodziło ze zbioru z roku 2018 i charakteryzowało się następującymi parametrami (Tab. 8):

Tab. 8. Charakterystyka ziarna pszenicy wykorzystanego do doświadczeń produkcyjnych

Gospodarstwo	Wilgotność [%]	Liczba drobnoustrojów [log j.t.k. g ⁻¹]		Mikotoksyny [µg kg ⁻¹]				
		pleśnie	drożdże	OTA	AFL	T-2	DON	ZEA
I	12,7	4,3	3,8	n.o.	n.o.	n.o.	200,8± 20,45	n.o.
II	12,7	4,6	3,5	n.o.	n.o.	n.o.	223,4± 24,6	n.o.
II	17,0	5,1	<3,0	n.o.	n.o.	n.o.	201,8± 16,17	n.o.

n.o. nie oznaczono (poniżej granicy oznaczalności metody)

± odchylenie standardowe

Ziarno po zbiorze z dwóch gospodarstw charakteryzowało się wilgotnością 12,7%. W doświadczeniu wykorzystano również ziarno o dużej wilgotności (17%), nie podsuszone, w którym liczba pleśni była większa niż w ziarnie o wilgotności 12,7%. We wszystkich próbach ziarna oznaczono większą liczbę pleśni niż drożdży, co świadczy o tym, że tego typu środowisko naturalnie zdominowane jest przez grzyby strzępkowe. Ziarno było wolne od zanieczyszczeń mikotoksynami typowo przechowalniczymi (OTA, AFL), oznaczono w nim natomiast deoksyniwalenol w dopuszczalnym stężeniu od 200,8 do 223,4 µg kg⁻¹.

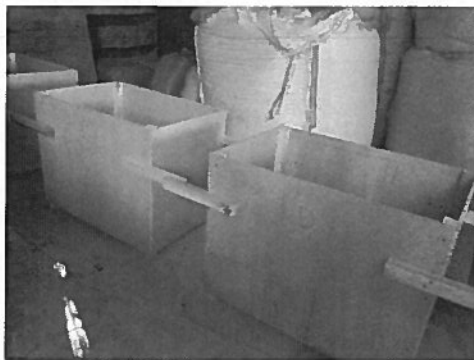
W gospodarstwie I wykonano próby przechowalnicze ziarna pszenicy. Ziarno umieszczono w trzech rodzajach pojemników: beczkach plastikowych (P), beczkach metalowych (M) oraz w drewnianych skrzyniach (D), w ilości 50 kg (w każdym rodzaju) (Rys. 7, 8, 9).



Rys. 7. Beczki plastikowe



Rys. 8. Beczki metalowe



Rys. 9. Drewniane skrzynie

Podczas załadunku do pojemników ziarno opryskiwano za pomocą opryskiwacza ręcznego dawką preparatu zawierającego drożdże *Rhodotorulla graminis* w ilości $1,0 \times 10^9$ j.t.k. g^{-1} , rozpuszczonego w wodzie wodociągowej. Wprowadzono w ten sposób $2,0 \times 10^5$ j.t.k. na gram ziarna. Wykonano także próby kontrolne wsypując ziarno do pojemników, ale bez dodatku preparatu. Wszystkie próby wykonano w trzech powtórzeniach. Pojemniki przechowywano pod zadaszeniem przez dwa miesiące. Po upływie jednego i dwóch miesięcy ze środka pojemników pobierano reprezentatywne próby przeznaczone do analiz. Wyniki oznaczeń zaprezentowano w Tab. 9.

Tab. 9. Wyniki analiz ziarna pszenicy przechowywanego w różnych rodzajach zbiorników w gospodarstwie I

Rodzaj pojemnika	Wilgotność [%]	Liczba drobnoustrojów [log j.t.k.·g ⁻¹]		Mikotoksyny [µg kg ⁻¹]					Wilgotność [%]	Liczba drobnoustrojów [log j.t.k.·g ⁻¹]		Mikotoksyny [µg kg ⁻¹]				
		drożdże	pleśnie	OTA	AFL	DON	ZEA	T-2		drożdże	pleśnie	OTA	AFL	DON	ZEA	T-2
KP	13,3	4,5*	3,8	n.o.	n.o.	191,3	n.o.	n.o.	14,8	<3,0	4,6	n.o.	n.o.	179,3*	n.o.	n.o.
P	13,7	5,4	5,0	n.o.	n.o.	219,3	n.o.	n.o.	14,9	3,5	3,5	n.o.	n.o.	145,5	n.o.	n.o.
KM	13,2	3,9*	4,1	n.o.	n.o.	229,4	n.o.	n.o.	14,6	<3,0	3,8	n.o.	n.o.	180,7	n.o.	n.o.
M	13,6	5,6	4,5	n.o.	n.o.	208,6	n.o.	n.o.	14,4	3,4	3,3	n.o.	n.o.	172,2	n.o.	n.o.
KD	13,2	4,8*	3,7	n.o.	n.o.	217,4	n.o.	n.o.	15,0	5,5*	4,5	n.o.	n.o.	161,1	n.o.	n.o.
D	13,2	5,3	3,1	n.o.	n.o.	204,7	n.o.	n.o.	14,2	4,5	4,3	n.o.	n.o.	166,6	n.o.	n.o.

n.o. nie oznaczono (poniżej granicy oznaczalności metody)

* wartości średnie danego parametru w kolumnie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Symbole:

KP – próby kontrolne w beczkach plastikowych

KM – próby kontrolne w beczkach metalowych

KD – próby kontrolne w drewnianych skrzyniach

Po pierwszym miesiącu przechowywania zaobserwowano, że prawie we wszystkich próbach (kontrolnych i z preparatem) liczba drożdży w ziarnie była wyższa od liczby pleśni. Liczba drożdży w ziarnie w pojemnikach po miesiącu przechowywania była też większa od liczby drożdży w ziarnie po zbiorze. W pojemnikach plastikowych i drewnianych liczba drożdży była istotnie większa niż w próbach kontrolnych. Po miesiącu przechowywania w ziarnie nie oznaczono mikotoksyn przechowalniczych (OTA, AFL), ani fuzaryjnych (ZEA, T-2/HT-2). Nie wzrosła istotnie zawartość DON-u w próbach w porównaniu do ziarna po zbiorze.

Po dwóch miesiącach przechowywania zmieniła się proporcja drożdży do pleśni. W próbach kontrolnych przechowywanych w beczkach plastikowych i metalowych zmniejszyła się liczba drożdży (poniżej log 3,0). W próbach kontrolnych przechowywanych w drewnianych skrzyniach drożdży było istotnie więcej niż w próbie z dodatkiem preparatu oraz więcej niż pleśni. Spośród oznaczanych mikotoksyn, w ziarnie stwierdzono jedynie obecność deoksyniwalenolu, którego istotnie więcej było w próbie kontrolnej przechowywanej w plastikowych beczkach w porównaniu do prób z dodatkiem preparatu. Ogólnie zawartość DON-u była niższa od wartości stwierdzonych po miesiącu przechowywania, co może być spowodowane addycją toksyn do struktur ściany komórkowej; występowanie tego zjawiska zostało opisane w literaturze naukowej (Shetty i in. 2007, Piotrowska 2012).

Ponadto zaobserwowano wzrost wilgotności ziarna po okresie przechowywania w stosunku do wartości wyjściowej, co może być wynikiem niedostatecznej wentylacji ziarna przechowywanego w zastosowanych pojemnikach.

W gospodarstwie II ziarno przechowywane było w polietylenowych workach (Rys. 10).



Rys. 10. Polietylenowe worki do przechowywania ziarna

W doświadczeniu wykorzystano ziarno charakteryzujące się zróżnicowaną wilgotnością (Tab.8). Do worków nasypywano po 50 kg ziarna, które opryskiwano za pomocą opryskiwacza ręcznego taką samą dawką preparatu drożdżowego, jak w gospodarstwie I. Wykonano także próby kontrolne (ziarno bez dodatku preparatu). Wszystkie próby wykonano w trzech powtórzeniach. Po zadnym czasie z worków pobierano próby ziarna w ten sam sposób, jak to było opisane w przypadku doświadczenia w gospodarstwie I. Wyniki analiz ziarna przedstawiono w Tab. 10.

Tab. 10. Wyniki analiz ziarna pszenicy przechowywanego w workach polietylenowych w gospodarstwie II

Ziarno	Po 1 miesiącu przechowywania				Po 2 miesiącu przechowywania			
	A		B		A		B	
Parametr	kontrola	preparat	kontrola	preparat	kontrola	preparat	kontrola	preparat
Wilgotność [%]	15,2	16,2	11,7	12,3	15,1	15,9	12,7	12,6
Drożdże [log j.t.k.g ⁻¹]	<3,0	<3,0	<3,0	4,1	<3,0	<3,0	<3,0	4,0
Pleśnie [log j.t.k.g ⁻¹]	6,4	6,5	4,3	4,3	6,2	6,5	4,0	4,5
Mikotoksyny [μg kg ⁻¹]								
OTA	36,8	38,9	n.o.	n.o.	35,7	37,8	n.o.	n.o.
AFL	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
DON	200,8	212,6	180,2	195,7	426,1	472,1	366,0	394,1
ZEA	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
T-2	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	153,2	154,3	132,7	141,6

n.o. (nie oznaczono, poniżej granicy oznaczalności metody)

Symbole:

- A- Ziarno o większej wilgotności początkowej
- B- Ziarno o mniejszej wilgotności początkowej

Wilgotność ziarna A w czasie przechowywania utrzymywała się na poziomie powyżej 15%. W ziarnie tym liczba drożdży była mniejsza niż pleśni niezależnie od zastosowania preparatu drożdżowego. Już po pierwszym miesiącu przechowywania w ziarnie A oznaczono bardzo wysoką zawartość ochratoksyny A, której stężenie nie różniło się istotnie w zależności od próby (kontrola czy próba z preparatem drożdżowym). Po dwóch miesiącach przechowywania oznaczono również toksynę T-2 w ilości przekraczającej poziom wskaźnikowy, który zgodnie z Zaleceniem Komisji Europejskiej z 27 marca 2013 r. nie powinien w przypadku nieprzetworzonego ziarna pszenicy przekraczać wartości $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (dla sumy toksyn T-2 i HT-2). Po dwóch miesiącach przechowywania wzrosła również dwukrotnie zawartość deoksyniwalenolu, co świadczyło o rozwoju w ziarnie pleśni z rodzaju *Fusarium*, a których wzrost nie został dostatecznie zahamowany przez wprowadzone z preparatem drożdże. Świadczy to o tym, że w przypadku przechowywania ziarna na jego jakość decydujący wpływ ma wilgotność i przy poziomie powyżej 15% zastosowany preparat drożdżowy nie jest efektywny w ograniczaniu rozwoju pleśni, a tym samym ograniczaniu skażenia mikotoksynami.

W ziarnie B o mniejszej wilgotności początkowej w próbach z dodatkiem preparatu oznaczono większą liczbę drożdży w porównaniu do prób kontrolnych. Liczba pleśni nie była istotnie zróżnicowana w zależności od zastosowania preparatu. Po dwóch miesiącach przechowywania w ziarnie oznaczono większą zawartość deoksyniwalenolu oraz toksyny T-2 w stosunku do ziarna bezpośrednio po zbiorze, a dodatek preparatu nie miał wpływu na zmniejszenie stężenia tych mikotoksyn.

Na obecność mikotoksyn w ziarnie zbóż ma wpływ bioróżnorodność grzybów pleśniowych, które rozwijają się na roślinach podczas ich wegetacji, jak później w magazynowanym surowcu (Czerwiecki 2007). Obecność DON i toksyny T-2 w ziarnie po kilku miesiącach przechowywania świadczyła o tym, że w czasie wegetacji nastąpiło porażenie pszenicy pleśniami z rodzaju *Fusarium*, które rozwinęły się podczas składowania ziarna w workach polietylenowych. W ziarnie po zbiorze liczba pleśni była znacznie większa niż drożdży (Tab. 8), co nie pozwoliło drożdżom wprowadzonym do ziarna z preparatem na dostateczne opanowanie środowiska. Z tego względu zaleca się opryskiwanie ziarna

preparatem drożdżowym zaraz po zbiorze, aby zwiększyć ich szanse na rozwój w magazynowanym ziarnie. Zasadne jest także zbadanie, czy efektywne byłoby zastosowanie preparatu o większej koncentracji drożdży. Ponadto magazynowania ziarna w workach polietylenowych nie zapewnia dostatecznej wymiany powietrza między ziarnami. Z tego powodu w przypadku aktywności antypleśniowej uwarunkowanej działaniem lotnych związków wytwarzanych przez drożdże nie ma możliwości hamowania wzrostu pleśni toksynotwórczych w workach polietylenowych.

5. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników badań sformułowano następujące wnioski:

- ✓ Ziarno zbóż uprawiane w systemie ekologicznym nie jest wolne od zanieczyszczenia mikotoksynami, z których najpowszechniej występuje deoksyniwalenol.
- ✓ Wyizolowane z ziarna zbóż dwa szczepy drożdży *Rhodotorulla graminis* i *Debaromyces hansenii* wykazują aktywność antypleśniową, hamując w warunkach laboratoryjnych wzrost pleśni z rodzajów: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*. Stopień zahamowania wzrostu pleśni różni się w zależności od szczepu drożdży, liczby komórek drożdży oraz temperatury inkubacji.
- ✓ Większą aktywność antypleśniową wykazuje szczep *Rhodotorulla graminis*, który zdolny jest do efektywnego hamowania wzrostu pleśni również w niskiej temperaturze oraz syntezy lotnych metabolitów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.
- ✓ Szczepy *Rhodotorulla graminis* wykazuje przydatność do produkcji preparatu utrwalonego metodą liofilizacji.
- ✓ Zastosowanie preparatu zawierającego szczep *Rhodotorulla graminis* do ziarna pszenicy podczas jego dwumiesięcznego przechowywania w pojemnikach metalowych, plastikowych czy drewnianych skutkuje zmniejszeniem liczby pleśni oraz zwiększeniem liczby drożdży w ziarnie.
- ✓ Preparat z *Rhodotorulla graminis* nie wykazuje efektywnego działania w przypadku zastosowania go do ziarna o wilgotności powyżej 15% oraz przechowywanego w polietylenowych workach.
- ✓ Niezbędne są dalsze badania nad wpływem preparatu z *Rhodotorulla graminis* na stopień porażenia pleśniami i mikotoksynami ziarna po dłuższym okresie jego przechowywania.

6. Piśmiennictwo

1. Bryła M., Waśkiewicz A., Podolska G., Szymczyk K., Jędrzejczak R., Damaziak K., Sułek A.: Occurrence of 26 mycotoxins in the grain of cereals cultivated in Poland. *Toxins* 8(160), 2016, 2-20.
2. Czerwiecki L.: Mikotoksyny w ziarnie zbóż I co dalej? Przegląd zbożowo-młynarski. *Październik*, 2007, 25-27.
3. Da-Woon Kim, Gi-Yong Kim, Hee-Kyoung Kim, Jueun Kim, Sun Jeong Jeon, Chul Won Lee, Hyang Burm Lee, Sung-Hwan Yun: Characterization of nivalenol-producing *Fusarium culmorum* isolates obtained from the air at a rice paddy field in Korea. *Plant Pathol. J.* 32(3), 2016, 182-189.
4. Gardes M, Bruns TD: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol.* 1993, 2: 113-118.
5. Janowicz L. 2007. Współczesne przechowywalność ziarna zbóż. *Przemysł Spożywczy* 7, 24-27.
6. Petersson S., Schnurer J. 1995. Biocontrol of mold growth in high moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Env. Micr.* 61(3), 1027-1032.
7. Piasecka-Józwiak K., Chabłowska B. 2017. Wykorzystanie antypleśniowych właściwości szczepów drożdży do biologicznej ochrony ziarna podczas przechowywania. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 62(4), .
8. Piotrowska M. 2012. Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn z żywności i pasz. *Postępy Mikrobiologii* 51(2), 109-119.
9. Podolska G. 2013. Czynniki wpływające na zanieczyszczenie zbóż mikotoksynami. *Wieś Jutra*, 2(75), 31-32.
10. Rabelo de Lima J, Rocha Barros Gonçalves L, Rocha Brandão L., Augusto Rosa C., Marto Pinto Viana F. 2013. Isolation, identification, and activity *in vitro* of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Journal of Basic Microbiology* 53(7), 590–599.
11. Robiglio A. Sosa M., Lutz M., Lopes C., Sangorrín M.. 2011. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *Int. Journal of Food Microbiology* 6, 147(3), 211-6.

12. Rudziński R. 2011. Zasady przechowywania i magazynowania towarów pochodzenia rolniczego. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, Nr 88, 113-126.
13. Shetty P.H., Hald B. Jespersen L. 2007. Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous
14. Yang F., Jacobsen S., Jørgensen H., Collinge D., Svensson B., Finnie C.: *Fusarium graminearum* and its interactions with cereal heads: studies in the proteomics era. *Frontiers in Plant Science* 4(37), 2013, 1-8.