



Szkolenie dotyczące wyników badań prowadzonych
w 2018 r.

**„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”**

Warszawa, 11.12.2018 r.



Zadanie badawcze wykonane na rzecz rolnictwa ekologicznego w 2018 r.

- Nr Hor.re. 027.I.2018 z dnia 24 kwietnia 2018
- Koordynator: dr inż. Marta Kupryś-Caruk
- Współwykonawcy: dr inż. Katarzyna Piasecka-Józwiak
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), Warszawa
- Gospodarstwo Rolne, Janowica (woj. lubelskie)
- Gospodarstwo Rolne Zielonka Stara (woj. mazowieckie)



Wprowadzenie

Ważnym czynnikiem ograniczającym rozwój grzybów pleśniowych w ziarnie i tworzenie się toksyn jest odpowiednie przechowywanie ziarna:

- ❖ Temperatura w magazynie $<15^{\circ}\text{C}$
- ❖ Wilgotność ziarna $<15\%$
- ❖ Przewietrzanie ziarna



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



Wprowadzenie

Grzyby pleśniowe rozwijające się w ziarnie zbóż wytwarzają szkodliwe dla zdrowia ludzi i zwierząt metabolity wtórne tzw. mikotoksyny:

„polowe”

Deoksyniwalenol (DON)
Zearalenon (ZEA)
Toksyna T-2/HT-2

„magazynowe”

Ochratoksyna A (OTA)
Aflatoksyny (AFL)



Wprowadzenie

Drożdże - drobnoustroje naturalnie bytujące na roślinach, wykazują aktywność antymikrobiologiczną, w warunkach *in vitro* hamują rozwój pleśni



Fot. 2. Komórki drożdży
Źródło: <https://biotechnologia.pl/>



Cel zadania badawczego

Opracowanie ekologicznego sposobu biokonserwacji ziarna zbóż poprzez zastosowanie biopreparatu składającego się ze specjalnie wyselekcjonowanego szczepu drożdży o właściwościach antagonistycznych wobec grzybów pleśniowych.



Zakres zadania badawczego

➤ Podzadanie 1.

Ocena 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.

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



Zakres zadania badawczego

➤ Podzadanie 4.

Opracowanie składu kultury drożdżowej oraz metody jej utrwalenia poprzez liofilizację (termin realizacji: czerwiec-lipiec 2018)

➤ Podzadanie 5.

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

➤ Podzadanie 6.

Określenie skuteczności zastosowania wytypowanej kultury drożdżowej w procesie biokonserwacji przechowywanego ziarna pszenicy (badania w powiększonej skali) (termin realizacji: sierpień-listopad 2018)



Wyniki

Tab.1. Analiza ziarna pszenicy jarej z 2017 r. z upraw ekologicznych po 8 miesiącach przechowywania

Województwo /powiat	Sposób przechowywania	Wilgotność (%)	Drożdże i pleśń (log jtk/g)	Mikotoksyny [µg/kg]				
				5,0 OTA	4,0 AFL	1250 DON	100 ZEA	100 T-2
lubelskie/krasnostawski	big bag	12,9	4,65	n.o.	1,2	132	50	56
dolnośląskie/lwówecki	big bag	11,2	4,30	n.o.	1,4	115	n.o.	n.o.
lubelskie/parczewski	luzem na betonowej podłodze	11,3	4,30	n.o.	1,5	132	n.o.	n.o.
mazowieckie/zwoleński	drewniana skrzynia	11,7	4,00	n.o.	1,5	124	n.o.	n.o.
warmińsko- mazurskie/działdowski	silos	12,6	3,60	n.o.	1,4	136	n.o.	n.o.
małopolskie/proszowicki	drewniana skrzynia	9,1	3,70	n.o.	1,7	119	n.o.	n.o.
łódzkie/zduńskowolski	luzem na betonowej podłodze	10,0	3,65	2,3	1,4	114	n.o.	n.o.
lubelskie/łęczyński	big bag	12,0	3,00	2,0	1,6	103	n.o.	n.o.
wielkopolskie/międzychodzki	polietylenowy worek	9,6	4,70	12	1,3	232	108	127



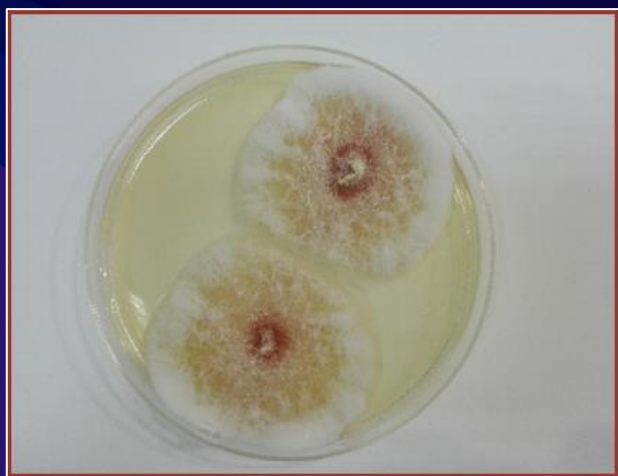
Tab.2. Analiza ziarna żyta z 2017 r. upraw ekologicznych po 8 miesiącach przechowywania

Województwo /powiat	Sposób przechowywania	Wilgotność (%)	Drożdże i pleśnie (log jtk/g)	Mikotoksyny [µg/kg]				
				OTA	AFL	DON	ZEA	T-2
podkarpackie/brzozowski	silos	11,6	4,54	n.o.	2,1	180	n.o.	48
mazowieckie/zwoleński	drewniana skrzynia	11,2	4,54	n.o.	3,0	292	n.o.	43
podlaskie/białostocki	luzem na betonowej podłodze	10,0	4,40	n.o.	3,2	170	43	n.o.
łódzkie/zduńskowolski	luzem na betonowej podłodze	10,0	4,11	3	6,5	293	84	129
wielkopolskie/międzychodzki	worek polietylenowy	10,8	4,48	10	4,1	193	221	157

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



Ze zboża wyizolowano pleśnie należące do rodzajów:
Penicillium, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*,
Lichtheimia



Rys. 3. *Fusarium graminearum*



Rys. 4. *Fusarium sporotrichoides*



Tab.3. Zahamowanie wzrostu wybranych pleśni (%) przez różne szczepy drożdży w temp. 25°C

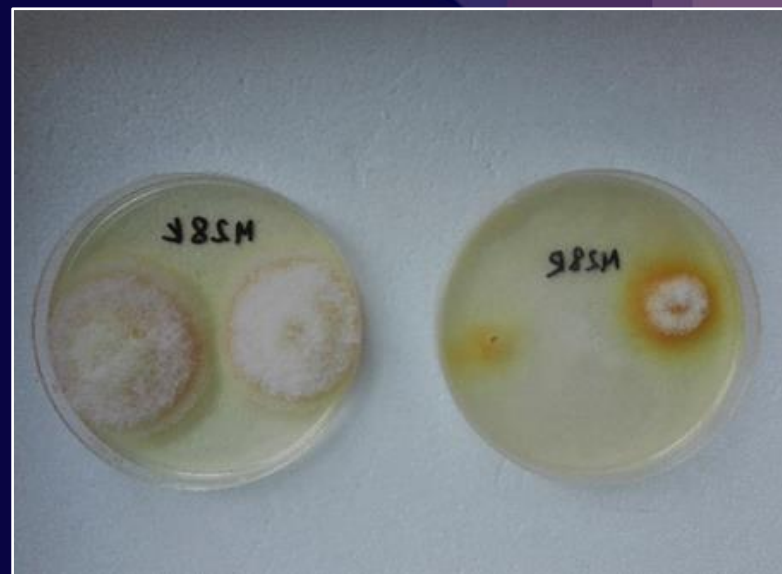
	<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>		<i>Fusarium graminearum</i>	
Liczba drożdży [j.t.k./ml]	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶
<i>Candida tropicalis</i>	77,8	83,3	12,5	50,0	80,8	100
<i>Rhodotorulla graminis</i>	80,6	80,6	brak	25,0	55,8	65,4
<i>Debaromyces hanseni</i>	68,9	77,8	brak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



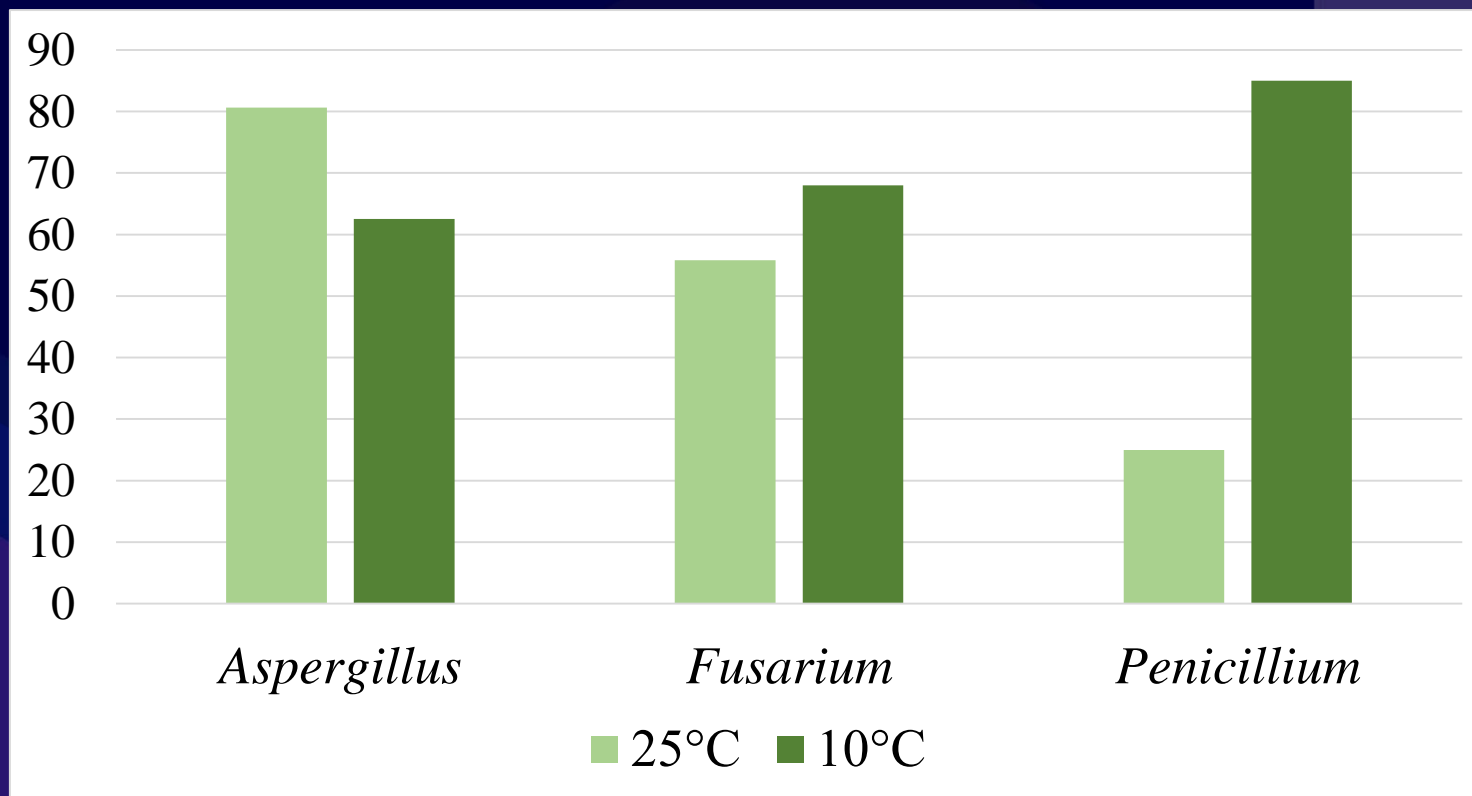
Wyniki



Rys. 5. Wzrost *Alternaria* sp.
(po lewej próba kontrolna, po prawej próba inkubowana w obecności drożdży *Rh. graminis*)



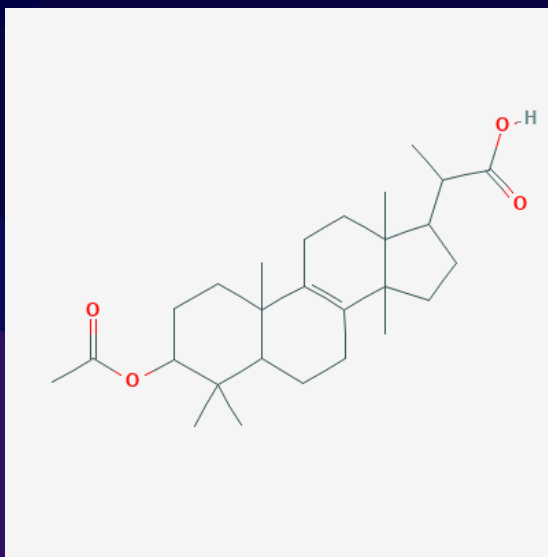
Rys. 6. Wzrost *Fusarium* sp.



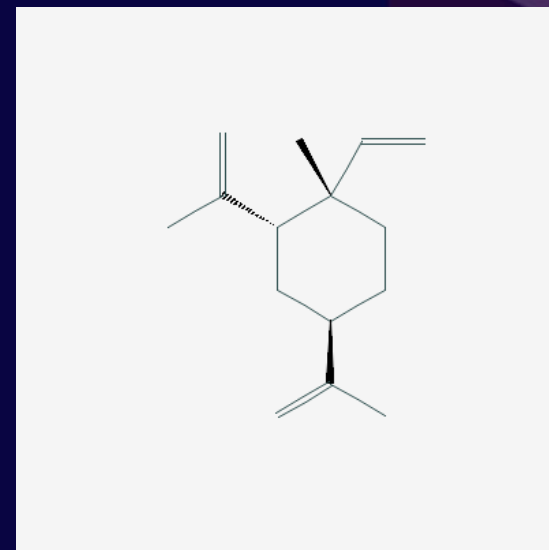
Rys. 8. Zahamowanie wzrostu pleśni (%) przez szczep drożdży *Rhodotorulla graminis* w zależności od temperatury inkubacji



Zidentyfikowane związki lotne o działaniu przeciw drobnoustrojowym wytworzone przez drożdże *Rhodotorulla graminis*



Rys. 7. Pochodna kwasu propanowego



Rys. 8. τ -elemen



Ustalenie dawki preparatu drożdżowego w próbach laboratoryjnych



Warunki doświadczenia:

- Dawka preparatu: 10^6 j.t.k./g
- Temp. przechowywania 25 i 10°C
- Czas przechowywania 5 tygodni

Rys. 9. Mini silosy doświadczalne



Tab. 4. Analiza ziarna pszenicy przechowywanego w mini silosach

Próba/ symbol	Temp. przechowywania [°C]	Wilgotność [%]	Liczba drobnoustrojów [log j.t.k./g]	
			drożdże	pleśnie
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
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– próba kontrolna z mniejszym dodatkiem wody; K/W – z większym dodatkiem wody
P–próby z preparatem z mniejszym dodatkiem wody; P/W–z większym dodatkiem wody



Zastosowanie preparatu drożdżowego - doświadczenie w powiększonej skali



Rys. 10.
Plastikowe beczki



Rys. 12.
Drewniane skrzynie



Rys. 11.
Metalowe beczki



Tab. 5. Analiza ziarna pszenicy po 3 miesiącach od zbioru w zależności od sposobu przechowywania

Rodzaj pojemnika (tworzywo)	Próba	Wilgotność [%]	Liczba drobnoustrojów [log j.t.k./g]		Mikotoksyny [µg/kg]				
			drożdże	pleśnie	OTA	AFL	DON	ZEA	T-2
Plastik	kontrolna	14,8	3,3	4,6	n.o.	n.o.	179,3±3,29	n.o.	n.o.
	preparat	14,9	3,6	3,8	n.o.	n.o.	145,5±24,4	n.o.	n.o.
Drewno	kontrolna	14,6	3,9	4,4	n.o.	n.o.	180,7±24,32	n.o.	n.o.
	preparat	14,4	5,8	4,1	n.o.	n.o.	172,2±9,56	n.o.	n.o.
Metal	kontrolna	15,0	5,7	4,5	n.o.	n.o.	161,1±29,34	n.o.	n.o.
	preparat	14,2	4,5	3,0	n.o.	n.o.	166,6±28,34	n.o.	n.o.

Ziarno po zbiorze: drożdże 3,8; pleśnie 4,3 log j.t.k./g

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



WNIOSKI

- ❖ Ziarno zbóż uprawiane w systemie ekologicznym nie jest wolne od zanieczyszczenia mikotoksynami (DON, AFL).
- ❖ Wyizolowany z ziarna zbóż szczep drożdży *Rhodotorulla graminis* wykazuje aktywność antypleśniową, hamuje w warunkach laboratoryjnych wzrost pleśni z rodzajów: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*.
- ❖ *Rhodotorulla graminis* zdolny jest do efektywnego hamowania wzrostu pleśni również w niskiej temperaturze oraz syntezy lotnych metabolitów o działaniu przeciw drobnoustrojowym.
- ❖ Szczep *Rhodotorulla graminis* wykazuje przydatność do produkcji preparatu utrwalonego metodą liofilizacji.



WNIOSKI

- ❖ Po zastosowaniu preparatu zawierającego szczep *Rhodotorulla graminis* do ziarna pszenicy, podczas jego kilkumiesięcznego przechowywania, zaobserwowano się tendencję do zwiększenia liczby drożdży w stosunku do pleśni (z jednoczesnym obniżeniem liczby pleśni), co może mieć wpływ na obniżenie skażenia ziarna mikotoksynami.
- ❖ Niezbędne są dalsze badania nad wpływem preparatu zawierającego nowo wyizolowany szczep drożdży *Rhodotorulla graminis* na stopień porażenia pleśniami i mikotoksynami ziarna zbóż po dłuższym okresie jego przechowywania w różnych warunkach.



Dziękuję za uwagę