

OFFICIAL CONTROLS OF FOODSTUFFS – CONTAMINATION OF CEREALS BY MYCOTOXINS OF THE GENUS FUSARIUM AND OCHRATOXIN A.*Jaroslav Remža, Jozef Bireš, Mária Matúšová, Magdaléna Lacko-Bartošová***ABSTRACT**

One of the most dangerous food contaminants are mycotoxins – secondary metabolites of toxinogenic fibre fungi considered the main plant pathogens. A variety of *Fusarium* fungi, which are common soil fungi, produce a number of different mycotoxins of the class of trichothecenes (T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol (DON) and nivalenol and some other toxins (zearalenone and fumonisins)). The *Fusarium* fungi are commonly found on cereals grown in the temperate regions of Europe. In this work contamination of Slovak grain by toxins with focus on the genus *Fusarium* was monitored. The results of monitoring pointed at relative low contamination of Slovak grain by toxins the genus *Fusarium* from harvest 2008, which is documented by maximum as well as by average measuring data in comparison with valid legislation. Average measuring data of deoxynivalenol in year 2008 were in barley $48,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in oats $90 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in wheat $70 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in rye $65,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in maize $75,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Average measuring data of zearalenon in year 2008 were in barley $0,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in oats $9,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in wheat $7,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in rye $3,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in maize $13,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Average measuring data of T2 toxin in year 2008 were in barley $3,38 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in oats $22,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in wheat $15 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in rye $2,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in maize $13,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$. In year 2009 when presence of nivalenol in 79 samples was evaluated, detected levels varied from 5 to $1025 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in case of those samples also deoxynivalenol was evaluated, detected levels varied from 25 to $965 \mu\text{g.kg}^{-1}$. The results pointed at higher contamination.

In year 2010 when presence of nivalenol in 96 samples was evaluated, detected levels varied from 5 to $48 \mu\text{g.kg}^{-1}$, in case of those samples also deoxynivalenol was evaluated, detected levels varied from 5 to $2438 \mu\text{g.kg}^{-1}$. In this year the results pointed at the highest contamination over the past three years. Average measuring data of deoxynivalenol in wheat in year 2009 were $241 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Average measuring data of deoxynivalenol in wheat in year 2010 were $552 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Keywords: mycotoxins, *Fusarium*, deoxynivalenol, nivalenol

ÚVOD

V súčasnosti sa predpokladá, že v prírode sa vyskytuje približne 5 000 rôznych druhov mykotoxínov. Patria k sekundárnym metabolitom toxigénnych húb, ktoré sa radia k hlavným rastlinným patogénom (**Betina, 1990**) a prostredníctvom rastlinných produktov sa dostávajú do potravinového reťazca. V poslednom období výsledky ukazujú, že mykotoxíny *Fusarium* sú značne rozšírené v potravinovom reťazci v Spoločenstve.

Hlavnými zdrojmi príjmu toxínov *Fusarium* v strave sú výrobky z obilnín, najmä pšenica a kukurica. Druhy húb rodu *Fusarium* infikujú zrno pred zberom úrody. Rôzne huby *Fusarium*, ktoré sa bežne vyskytujú v pôde, môžu produkovať množstvo rôznych mykotoxínov triedy trichotecény, ako deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxíny T-2 a HT-2 a niektoré iné toxíny ako zearalenon a fumonizíny B1 a B2.

Huby *Fusarium* sa bežne nachádzajú na obilninách pestovaných v miernych pásmach Ameriky, Európy a Ázie. Niekoľko húb produkujúcich toxín *Fusarium* dokáže produkovať dva alebo viacero z týchto toxínov na rôznom stupni. Účinky mykotoxínov na biologické organizmy sú rôzne. V prípade fumonizínov nie je známa žiadna akútna toxicita, ale je tu predpoklad na ich karcinogénne účinky (**FAO, Rim, 2001**). Na druhej strane zearalenon je silným estrogénom a rozširuje paletu známych endokrinných disruptorov. Tiež sa predpokladá, že akútna toxicita tohto mykotoxínu je zanedbateľná.

Trichotecény predstavujú veľmi veľkú skupinu (cca 180) podobných zlúčenín. Ich hlavnými producentmi sú huby rodov *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* a *Stachybotrys* (**Wiedenborner, 2001**). Parazitujú hlavne

na cereáliách. Trichotecény boli identifikované v produktoch z cereálnych výrobkov. Na základe podobnosti v chemickej štruktúre sa členia do viacerých skupín, z ktorých najdôležitejšie sú prvé dve skupiny A a B. Do skupiny typu A zaraďujeme T-2 toxín, HT-2 toxín, diacetoxyscirpenol. Trichotecény typu A sú známe vysokou toxicitou. Do skupiny typu B patria napríklad nivalenol a deoxynivalenol. Trichotecény skupiny typu B sú výrazne menej toxické ako trichotecény skupiny typu A. Trichotecény sú relatívne nestabilné, pôsobením UV žiarenia rýchlo degradujú (**Wiedenborner, 2001**).

Zearalenon je produktom húb rodu *Fusarium*, predovšetkým *Fusarium graminearum*, ktoré parazitujú na cereáliách (**Betina, 1990**). Najčastejšie sa nachádza v kukurici ale bol detegovaný aj v pšenici a sladovníckom jačmeni. Zearalenol (a-Zearalenol a b-Zearalenol) je *in vivo* metabolit zearalenonu (**Ouanes-Benothmen, et al., 2008**). Sú známe aj niektoré viazané formy zearalenonu a zearalenolu („maskované mykotoxíny“), ich účinky na organizmus hospodárskych zvierat nie sú ešte dostatočne preskúmané. Zearalenon a jeho metabolity majú silné estrogénne vlastnosti (**Wiedenborner, 2001**). Kŕmením hospodárskych zvierat kontaminovaným cereálnym krmivom dochádza k chorobám reprodukčného systému. Veľmi citlivé sú predovšetkým ošípané. Pre znížovanie kontaminácie cereálií počas skladovania je dôležité aby vlhkosť bola menej ako 14 % (**Ouanes-Benothmen, et al., 2008**). K samotnej kontaminácii dochádza na poli ale rastu húb sa dá zabrániť dôslednou kontrolou podmienok skladovania. V suchom prostredí už nedochádza k rastu húb a tak je možné zabrániť ich prechodu z infikovaných zŕn aj na nekontaminované zrná.

Fumonizíny (fumonizín B1 (FB1), fumonizín B2 (FB2), fumonizín B3 (FB3)) sú mykotoxíny produkované toxínogénnymi hubami rodu *Fusarium* (Betina, 1990). Z celého rodu *Fusarium* len tri druhy jedincov produkujú fumonizíny v zaujímavých množstvách – *Fusarium verticillioides*, *Fusarium moniliforme* a *Fusarium proliferatum* (FAO, Rím, 2001). *Fusarium verticillioides* a *Fusarium proliferatum* patria k najbežnejším a najčastejšie sa vyskytujúcim hubám kontaminujúcim predovšetkým kukuricu.

Z výsledkov možno konštatovať, že v EU z 3863 vzoriek určených na stanovenie fumonizínu B1 bolo 46 % kontaminovaných a z 1010 vzoriek určených na stanovenie fumonizínu B2 bolo 42% kontaminovaných. Pomerne vysoká bola kontaminácia vzoriek pšenice (79%) fumonizínom B1. V prípade kukurice to bolo 66 % vzoriek (fumonizín B1) a 51 % vzoriek (fumonizín B2) (Brusel, 2003).

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky boli odobierané v sledovanom období v zmysle zákona NR SR č.152/95 Z. z. o potravinách v znení neskorších predpisov v rámci úradných kontrol potravín u prevádzkovateľov potravinárskych podnikov. Jednalo sa o vzorky odobraté orgánmi štátnej veterinárnej a potravinovej správy u prvotných producentov, výrobcov a v baliarňach obilnín, resp. v obchodnej sieti pričom boli analyzované na prítomnosť ochratoxínu A (OTA) a fuzáriových toxínov.

Všetky vzorky boli odobraté v zmysle nariadenie komisie (ES) č. 401/2006 z 23. februára 2006, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analytické metódy na úradnú kontrolu hodnôt mykotoxínov v potravinách.

Deoxynivalenol sa stanovoval metódou HPLC/UV, GC/TOF, stanovenie zearalenonu bolo vykonané metódou HPLC/FLD, GC/TOF, stanovenie T-2 a H-T2 toxínu metódou HPLC/MS/MS, GC/TOF, stanovenie fumonizínov B1+B2 metódou HPLC/FLD a stanovenie ochratoxínu A (OTA) metódou HPLC/FLD.

Najvyššie prípustné množstvá (NPM) fuzáriových toxínov v obilí a vo výrobkoch z obilia sú upravené Nariadením komisie č.1881/2006/ES v znení neskorších predpisov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vyhodnotenie monitoringu toxínov rodu *Fusarium* v obilí slovenského pôvodu - úroda z roku 2008

Európska Komisia vo svojom Nariadení č.1126/2007/ES, ktoré mení a dopĺňa Nariadenie Komisie č.1881/2006, upravujúce maximálne množstvá niektorých kontaminantov v potravinách, upravila maximálne hodnoty toxínov rodu *Fusarium* v obilí a vo výrobkoch z obilia. V spomenutom nariadení sú ustanovené limity u obilia, vrátane kukurice pre deoxynivalenol (DEO), zearalenon (ZEA) a fumonizíny B1 a B2 (FB1 a FB2). Pre T-2 a HT-2 toxín z dôvodu nedostatku potrebných informácií limit stanovený nebol. Európska Komisia vyzvala v roku 2008 všetky členské štáty na monitorovanie situácie v tejto oblasti a vytvorenie spoločnej databázy, ktorá by reprezentovala reálnu situáciu stupňa kontaminácie obilia uvedenými toxínmi. Na základe uvedeného Štátna veterinárna a potravinová správa SR pristúpila k širšiemu monitorovaniu kontaminácie slovenského obilia toxínmi

rodu *Fusarium* z úrody roku 2008. Za účelom splnenia cieľov tohto monitoringu boli odobraté vzorky pšenice, raži, ovsa, jačmeňa a kukurice priamo u pestovateľov. Výsledky stanovení toxínov rodu *Fusarium* vo vzorkách uvedených druhoch obilia dokumentujú výsledky monitoringu. Z výsledkov je zrejmé, že u žiadnej zo vzoriek neboli prekročené už stanovené najvyššie prípustné množstvá (limity). Výsledky monitoringu poukazujú na relatívne nízku kontamináciu slovenského obilia z úrody roku 2008 toxínmi rodu *Fusarium* čo dokumentujú aj niektoré maximálne ako aj priemerné namerané hodnoty uvedené nižšie – v porovnaní s platnou legislatívou.

Vyhodnotenie monitoringu nivalenolu v obilí slovenského pôvodu - úroda z roku 2009

Nivalenol je jeden z druhov mykotoxínov, ktoré produkujú plesne rodu *Fusarium*. Tento mykotoxín v rámci harmonizovanej legislatívy Spoločenstva doposiaľ nemá stanovený platný limit. Na základe vedeckých poznatkov sa predpokladá jeho súbežný výskyt s deoxynivalenolom (DON) v obilí (najmä u ovsa) a to zrejme aj v podobných množstvách. Z uvedených dôvodov európska Komisia zvažuje o prípadnom stanovení samostatného limitu pre tento mykotoxín. Európska Komisia nemá doposiaľ k dispozícii dostatočnú databázu o nameraných hodnotách nivalenolu v obilí. Na základe uvedeného sa uskutočnil screeningový monitoring výskytu tohto kontaminantu v obilí slovenského pôvodu – pšenica, jačmeň, ovos, tritikale). Výsledky stanovení nivalenolu vo vzorkách uvedených druhoch obilia dokumentujú výsledky uvedeného monitoringu (celkovo bolo analyzovaných 79 vzoriek). Z výsledkov je zrejmé, že vzorky ovsa vykazujú vysokú hodnotu nivalenolu (okrem 1 vzorky nahého ovsa). Analýzami sa potvrdila teória o významných nálezoach nivalenolu práve u tohto druhu obilia. Nálezy nivalenolu sú tiež významné v jačmeni a v niektorých vzorkách pšenice. Na zistený výskyt kontaminácie nivalenolom však vplyvajú viaceré environmentálne faktory. Z výsledkov je zrejmé, že v roku 2010 sa jednalo o vyššie namerané hodnoty deoxynivalenolu v porovnaní s rokom 2009. Jedná sa o výsledky v rámci výkonu úradných kontrol v sledovanom období, nie sú tu zahrnuté výsledky monitoringov.

Výsledky odberu vzoriek v rámci úradných kontrol

V roku 2008 bolo odobratých 166 vzoriek, všetky v sledovaných znakoch vyhovel požiadavkám platnej legislatívy a boli v súlade s nariadením komisie (ES) č.1881/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách v znení neskorších predpisov. V roku 2009 bolo celkovo odobratých 178 vzoriek, v sledovaných znakoch nevyhovela požiadavkám platnej legislatívy 1 vzorka pšenice potravinárskej, odroda Pegassos pre prekročenie maximálnej hodnoty obsahu deoxynivalenolu. V roku 2010 bolo celkovo odobratých 200 vzoriek, v sledovaných znakoch nevyhoveli požiadavkám platnej legislatívy 2 vzorky. Vzorka potravinárskej pšenice (tvrdá), odroda Pentadur pre prekročenie maximálnej hodnoty obsahu deoxynivalenolu a pšeničná múka celozrnná špeciál pre prekročenie maximálnej hodnoty obsahu deoxynivalenolu.

potravinárstvo

Tab. 1 Jačmeň – prítomnosť fuzáriových toxínov v roku 2008 vyjadrená v $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Analyt	Počet analýz	Limit	Minimálna hodnota	Maximálna hodnota	Priemerná hodnota	Stredná hodnota
deoxynivalenol	38	1250	<20	576	48,8	<20
zearalenon	38	100	<10	30	0,8	<10
T2+HT2 toxín	8	-	<75	<75	<75	<75
T2 toxín	30	-	<15	58,93	3,38	<15

Tab. 2 Pšenica – prítomnosť fuzáriových toxínov v roku 2008 vyjadrená v $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Analyt	Počet analýz	Limit	Minimálna hodnota	Maximálna hodnota	Priemerná hodnota	Stredná hodnota
deoxynivalenol	44	1250	<20	578	70	<20
zearalenon	38	100	<10	90	7,1	<10
T2+HT2 toxín	8	-	<75	<75	<75	<75
T2 toxín	36	-	<15	<15	<15	<15

Tab. 3 Kukurica – prítomnosť fuzáriových toxínov v roku 2008 vyjadrená v $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Analyt	Počet analýz	Limit	Minimálna hodnota	Maximálna hodnota	Priemerná hodnota	Stredná hodnota
deoxynivalenol	24	1750	<20	560	75,9	<20
zearalenon	24	350	<10	120	13,9	<10
fumonizíny B1+B2	24	4000	<41	1207,4	187,6	69,2

Tab. 4 Výsledky stanovení nivalenolu a deoxynivalenolu (monitoring 2009) - prítomnosť vyjadrená v $\mu\text{g.kg}^{-1}$

vzorka	počet odobratých vzoriek	nivalenol		DON	
		max.	min.	max.	min.
pšenica	44	149,5	<5	539	<25
raž	7	102	<5	267	<25
jačmeň	19	586	<5	965	<25
ovos	4	1025	40	151	34
tritikale	5	141	<5	59	<25

Tab. 5 Porovnanie stanovení v rokoch 2009-2010 - prítomnosť vyjadrená v $\mu\text{g.kg}^{-1}$

vzorka	počet odobratých vzoriek	DON 2009		počet odobratých vzoriek	DON 2010	
		max.	min.		max.	min.
pšenica	44	539	<25	107	2438	<20
raž	7	267	<25	10	289	<100
jačmeň	19	965	<25	11	1243	<20
ovos	4	151	34	3	<20	<5
tritikale	5	59	<25	0	-	-

Tab. 6 Porovnanie stanovení v rokoch 2009-2010 (úradné kontroly potravín) - prítomnosť vyjadrená v $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Pšenica – úroda 2009	Počet vykonaných analýz	Minimálna hodnota	Maximálna hodnota	Priemerná hodnota
ochratoxín A	21	<1	<1	<1
deoxynivalenol	70	<20	2220	241,03
nivalenol	0	-	-	-
zearalenon	70	<1	22	5,94
T2 toxín	20	16,6	<75	16,6
T2+HT2 toxín	17	<75	<75	<75

Tab. 6 Pokračovanie

Pšenica – úroda 2010	Počet vykonaných analýz	Minimálna hodnota	Maximálna hodnota	Priemerná hodnota
ochratoxín A	14	<0,05	<0,2	0,1
deoxynivalenol	77	<20	2438,22	552,25
nivalenol	13	<5	<5	<5
zearalenon	69	<1	288	39,08
T2 toxín	49	<1	78,1	36,26
T2+HT2 toxín	49	<1	65	17,63

ZÁVER

Monitorovaniu kontaminácie slovenského obilia toxínmi a sledovanie maximálnych množstiev niektorých kontaminantov v potravinách je neoddeliteľnou súčasťou úradnej kontroly potravín v Slovenskej republike. Táto činnosť sa vykonáva prostredníctvom systematických úradných kontrol a na základe analýzy rizika. Náročnosť požiadaviek sa z roka na rok zvyšuje, čo do počtu odobratých vzoriek, ako aj dodržaním legislatívnych požiadaviek, pokiaľ sa jedná o metódy odberu vzoriek a analytické metódy na úradnú kontrolu hodnôt mykotoxínov v potravinách. S cieľom vysokej úrovne ochrany ľudského života a zdravia sa tejto činnosti bude aj naďalej venovať osobitná pozornosť.

Na základe výsledkov Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR je možné konštatovať, že bolo kontaminovaných v prípade nivalenolu 47% analyzovaných vzoriek a u deoxynivalenolu 77% vzoriek v roku 2009. Pokiaľ sa jedná o vyhodnotenie v roku 2010 je to v prípade deoxynivalenolu 84,5% kontaminovaných vzoriek obilnín (169 vzoriek z 200 analyzovaných). Napriek skutočnosti, že najvyššie prípustné množstvá, ktoré stanovuje nariadenie komisie (ES) č.1881/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách v znení neskorších predpisov boli prekročené iba u jednej vzorky v roku 2009 a u dvoch vzoriek v roku 2010, jedná sa o vysoké množstvo pozitívnych nálezov v tejto komodite.

Namerané hodnoty fuzáriových toxínov u odobratých vzoriek počas monitoringov, ako aj v priebehu úradných kontrol poukazujú na vyššie namerané hodnoty v roku 2010 v porovnaní s rokom 2009, rozdielne hodnoty boli zistené aj v závislosti od pestovateľskej oblasti. Všeobecne sa jedná o vyššie množstvo kontaminovaných vzoriek u nás v porovnaní s priemerom v EU. Preto je veľmi dôležité pokračovať v sledovaní kontaminácie obilnín a v analýzach v rámci odobratých vzoriek v oblasti úradných kontrol potravín za účelom ochrany spotrebiteľa. V súvislosti s infekciou *Fusarium* a tvorbou mykotoxínov bolo už identifikovaných viacero rizikových faktorov v rámci prevencie a znižovania kontaminácie, je potrebné

sa venovať aj tejto otázke v rámci pestovania, zberu, spracovania a skladovania, ale aj v rámci výkonu a zamerania úradných kontrol potravín v SR.

LITERATÚRA

BETINA, V. 1990. *Mykotoxíny chémia – biológia – ekológia*. Bratislava : Alfa, 1990, 285 s. ISBN 80-05-00631-4.

FAO. 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in Food. FAO Food and Nutrition Paper No. 74, Rome, Italy.

WIEDENBORN, M. 2001. Encyclopedia of Food Mycotoxins. Berlin : Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K, 2001. 312 p. ISBN 9783540675563.

OUANES-BENOTHMEN, Z., EL-GOLLI, E., ABID-ESSEFI, S., BACHA, H. Cytotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites, alpha Zearalenol and beta Zearalenol. On cultured Vero Cells. In *Toxicology*, vol. 252, 2008, p.72-77.

EU EC DG Health and Consumer Protection. 2003. Reports on tasks for scientific cooperation. Task 3.2.10 „Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states.“. Brussels, April 2003.

Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (OJ L 364, 20.12.2006, p. 5–24).

Contact address:

Jaroslav Remža, Department of foodstuffs non-animal origin, State Veterinary and Food Administration of Slovak Republic, Botanická 17, 842 13 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: remza@svssr.sk.

Jozef Bíreš, State Veterinary and Food Administration of Slovak Republic, Botanická 17, 842 13 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: bires@svssr.sk

Mária Matúšová, State Veterinary and Food Administration of Slovak Republic, Botanická 17, 842 13 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: matusova@svssr.sk

Magdaléna Lacko-Bartošová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiological and Food Resources, Department of Sustainable Agriculture and Herbolology, Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E-mail: magdalena.lacko-bartosova@uniag.sk