

<p>Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Bydgoszczy STUDIA PRZYRODNICZE Scientific Papers of Pedagogical University in Bydgoszcz NATURAL STUDIES (Zeszyty Nauk. WSP, Stud. Przyr.)</p>	13	125 -134	1997
---	----	----------	------

**OZNACZANIE ERGOSTEROLU W PRODUKTACH  
SKAŻONYCH PATOGENNYMI GRZYBAMI  
I MIKOTOKSYNAMI**

**DETERMINATION OF ERGOSTEROL IN PRODUCTS  
CONTAMINATED WITH PATHOGENIC FUNGI AND  
MYCOTOXINS**

**Jan Grajewski, Hans Pettersson \***

Katedra Biologii i Ochrony Środowiska WSP, ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz

\* Wydział Gospodarki Żywności Zwierząt, Szwedzki Uniwersytet Nauk Rolniczych,  
BOX 7024, S - 750 07 Uppsala

ABSTRACT. In moist barley grains contaminated with *Aspergillus parasiticus* the contents of ergosterol and aflatoxins was determined with HPLC method.

KEY WORDS: barley, *Aspergillus parasiticus*, ergosterol, HPLC.

**Wstęp**

W produktach spożywczych i paszach pochodzenia roślinnego podczas przechowywania dochodzi do rozwoju *Aspergillus sp.* i *Penicillium sp.* Porażenie ziarna zbóż w kłosie ma miejsce także już na polu przez *Fusarium sp.*, szczególnie w wilgotnym okresie żniw. Niebezpieczeństwo jest tym większe, gdy obok saprofitów

na produktach następuje wzrost patogennych form grzybów i wytwarzanie ich toksycznych metabolitów.

W takim przypadku należy florę grzybową oznaczyć do formy patogennej i ustalić powstałą mikotoksynę. Jednak nie wszystkie laboratoria są przygotowane do powyższych metod analitycznych.

Konwencjonalne metody mikologiczne porażonych pleśniami produktów oparte są głównie na metodach posiewów. Niektórzy jednak autorzy (Leibetseder 1993, Schwadorf i Müller, 1989) sygnalizują, że metody mikrobiologiczne z posiewami kulturowymi są niedokładne, ponieważ potwierdzają jedynie obecność zarodników zdolnych do rozmnażania. Każda obróbka termiczna lub dodatek konserwantu do produktu może zredukować stopień porażenia i wówczas trudno ustalić faktyczną początkową zawartość komórek grzybowych w surowcu. Problem ten narasta przy patogennych grzybach. W powyższych przypadkach może występować brak ich izolatów, natomiast mikotoksyny mogą być obecne.

W pracach m.in. Leibetsedera (1993), Müllera i in. (1994), Petterssona (1995), Petterssona i Agendal (1995) oraz Schwadorfa i Müllera (1989) wykazano, że chemicznym indykátorem dla biomasy powstałej z flory grzybowej może być ergosterol (ERG), którego zawartość uwzględnia zarówno ilość żywych jak i martwych komórek. Wcześniej Lew (1981) badając porażoną kukurydzę, zaproponował stopień zagrzybienia określać ilością chityny i ergosterolu. Ostatnie doniesienia Landes i in. (1995), obok powyższych wskaźników wymieniają metodę ze strukturalnymi polisacharydami (EPS) na bazie immunologicznej.

Leibetseder (1993) stwierdza, że badania ergosterolu stanowią *novum* i należy je traktować wstępnie, ponieważ ten sterol produkują także drożdże, co może zniekształcać stopień kontaminacji fuzarioz. Jednak w rutynowych badaniach określających ogólne skażenie produktów (szczególnie ziarna zbóż) przez pleśnie, oznaczenie ergosterolu – zasadniczego składnika w błonie grzyba, wydaje się być obiecującym i trafnym.

Celem badań było określenie ergosterolu w ziarnie jęczmienia skażonym patogennym grzybem, przy udziale suboptymalnego dodatku konserwantów.

### **Material i metody**

Patogeny *Aspergillus parasiticus* 284U kultywowano na pożywkach Czapek Dox agar w temperaturze 25°C przez 7 dni. Spory wymyto roztworem wodnym z udziałem 0,2 % peptonu i 0,1 % Tween-80, uzyskując zawieszenie w 1 ml około  $5 \times 10^7$  (Holmberg i in. 1989). Roztwór wprowadzono do 25 kg ziarna jęczmienia,

uzyskując zawartość komórek grzybowych  $3,9 \times 10^5$  cfu w 1 g. Skażony materiał wykorzystano do 2 doświadczeń.

### Doświadczenie 1

Wilgotność materiału podniesiono do 23 % i dodawano 0,3 % konserwantów, uzyskując warianty: 1. próba kontrolna, 2. mrówczan sodu, 3. propionian sodu, 4. kwas mrówkowy (98 %), 5. kwas propionowy (99,5 %).

### Doświadczenie 2

Wilgotność materiału podniesiono do 36 % i dodano 0,3 % konserwantów i inoculant, uzyskując warianty: 1. próba kontrolna, 2. kwas mrówkowy (98 %), 3. kwas propionowy (99,5 %), 4. wariant 2 i 3 (1/1), 5. inoculant – Siloferm plus (bakterie kwasu mlekowego i enzym).

Ziarno doświadczenia 1, umieszczono w szklanych pojemnikach o pojemności 1,5 kg z dostępem powietrza (otwór przepływowy uszczelniono watą).

Ziarno doświadczenia 2, umieszczono w szklanych pojemnikach o pojemności 2,5 kg bez dostępu powietrza (rurka odprowadzająca gazy wypełniona płynem) powodując proces kiszenia.

Wszystkie warianty w dwóch powtórzeniach pozostawiono w temperaturze 25°C. Po 5 tygodniach wizualnie określono stopień porażenia materiału, który następnie wyjałowiono, wysuszono i rozdrobiono. Zawartość ergosterolu określono metodą HPLC z detekcją UV, wg Schwadorfa i Müllera (1989) z modyfikacją procesu ekstrakcji, wykorzystując kolumnę Extrelut (Pettersson i in. 1995). W tych samych próbach analizowano ilość powstałych aflatoksyn, metodą HPLC z detekcją fluorescencji i tworzeniem pochodnych przez kwas trójfluoro-octowy (Holmberg i in. 1989).

## Wyniki i dyskusja

Organoleptyczną ocenę stopnia skażenia dokonano wizualnie, porównując wszystkie warianty. W doświadczeniu 1: bez zmiany barwy próba 5, lekko zielony kolor wystąpił w 1, 2 i 3 próbie, natomiast wariant 4 (z kwasem mrówkowym) na całym przekroju został porośnięty grzybem (kolor intensywnie zielony).

W doświadczeniu 2: jedynie wariant 2 wykazywał ogniskowe zagrzybenie.

Stosowana w doświadczeniu grzybnia *Aspergillus parasiticus* zawierała 4,2 µg ergosterolu w 1 gramie suchej masy. Wartość ta jest zbliżona do wartości ustalonych dla grzybni innych grzybów z rodzaju *Penicillium*, *Fusarium* oraz

*Alternaria* (Pettersson i in. 1995). W suchym ziarnie jęczmienia (88 % suchej masy) przeznaczonym do badań stwierdzono 7,55 mg/kg ergosterolu.

Wartość ta jest znacznie wyższa od zawartości sterolu podanej w pracach Leibetsedera (1993) oraz Lewa (1981). Podobnie autorzy metody (Schwadorf i Müller, 1989) określili ergosterol w suchym ziarnie zbóż, na poziomie 2-3 mg, natomiast dla kukurydzy poniżej 1 mg. Müller i in. (1994), analizując w dwóch kolejnych latach większą ilość prób pszenicy i otrąb pszennych, wykazali we wszystkich obecność ergosterolu, gdzie w ziarnie zawartość jego wynosiła 1,8-14,1 (x-4,7), a w otrębach 5,4-60,4 mg/kg (x-11,3). Wzrost poziomu ergosterolu skorelowany był ze wzrostem deoxynivalenolu (DON), który wykryto w 100 % prób otrąb, natomiast dla ziarna 100 i 74 %.

Uzyskane w badaniach własnych wyższe zawartości ergosterolu, to efekt zastosowania kolumny Extrelut, podczas ekstrakcji z n-heksanem oraz dokładniejszej chromatograficznej analizy ekstraktu. Oznaczenie wykonano z kolumną 5  $\mu$  silikatową, n-heksanem/izoamyl alkoholu (95+5), przy fazie ruchomej 1 ml/minutę i UV-detekcji 282 nm. Modyfikacja metody dała o 40 % wyższe wartości oznaczeń, niż metoda oryginalna. Dla wydajności ekstrakcji, ważna jest wielkość cząstek badanej próby. Analizowane całe ziarno lub grubo ześrutowane obniża dokładność oznaczeń. Zmieszenie powinno nastąpić sitem o średnicy 1,0 lub 0,5 mm.

W tabeli 1 przedstawiono powstałą po 5 tygodniach ilość ergosterolu i aflatoksyn w konserwowanym ziarnie z dostępem powietrza.

Wystąpił wyraźny rozwój patogennych izolatów *Aspergillus* w wariacie kontrolnym oraz z udziałem soli, a przede wszystkim przy zastosowaniu kwasu mrówkowego.

Powyższe wyniki potwierdzają oznaczenia ergosterolu, którego poziom w stosunku do suchego ziarna wzrósł do 28-34 mg/kg. Z zastosowanych konserwantów jedynie kwas propionowy ograniczył rozwój grzyba. Suboptymalna 0,3 % dawka tego kwasu jest wystarczającą ilością do przechowywania porażonego ziarna o wilgotności powyżej 20 %, co potwierdzają wyniki uzyskane w próbie 5, nie stwierdzono wówczas aflatoksyn i zanotowano minimalny wzrost ergosterolu o 2 mg. Kwas mrówkowy (próba 4) w stosowanej dawce spotęgował tworzenie aflatoksyn. Niniejszym potwierdzono wcześniejsze badania szwedzkie (Holmberg i in. 1989), gdzie obecnie zabroniono używania tego preparatu do konserwacji wilgotnego ziarna zbóż. Porównanie różnych metod oznaczeń aflatoksyn na badanym materiale zostało przedstawione w innej pracy (Grajewski i in. 1995).

Tabela 2 obrazuje zawartość ergosterolu i aflatoksyn w zakiszonym ziarnie (bez dostępu powietrza). Mimo silnego skażenia materiału i przetrzymywania

przez 5 tygodni w sprzyjającej temperaturze, brak dopływu tlenu całkowicie ograniczył rozwój zarodników grzyba. Potwierdzenie uzyskano oznaczając ergosterol, którego ilość nie uległa podwyższeniu. Nie wykryto także obecności aflatoksyn.

W przeprowadzonych badaniach nie wyjaśniono, czy zawartość ergosterolu może być odnośnikiem do stopnia patogenności powstałych aflatoksyn. Problem wymaga dalszych badań.

Rys. 1 przedstawia chromatogram standardu ergosterolu, natomiast rys. 2 zawartość ergosterolu badanych wariantów pierwszego doświadczenia.

### Wnioski

1. Ergosterol może być chemicznym indykatorem określającym stopień zagrzybienia produktu, szczególnie użytecznym w badaniach rutynowych ziarna zbóż.
2. Wprowadzona kolumna Extrelut do zmodyfikowanej metody, pozwoliła dokładniej oznaczyć zawartość ergosterolu.

### Bibliografia

- Grajewski J., Pettersson H., Böhm J. 1995: *Ocena zawartości aflatoksyn w wilgotnym ziarnie jęczmienia skażonym patogennym grzybem *Aspergillus parasiticus* przy wykorzystaniu różnych metod oznaczeń*. Mater. Międzynar. Konf., Wyd. Uczeln. AR Wrocław, t. II: 79-83.
- Holmberg T., Kaspersson A., Larsson K., Pettersson H. 1989: *Aflatoxin Produktion in Moist Barley Treated with Suboptimal Doses of Formic and Propionic Acid*. Acta Agric. Scand., 39: 457-464.
- Landes E., Jaeckel S., Kamphues J. 1995: *Untersuchungen zum Nachweis von Aspergillen und Penicillien in Futtermitteln auf immunologischer Basis*. Mater. Konf. 17. Mykotoxin-Workshop, Braunschweig.
- Leibetseder J. 1993: *Schadwirkungen durch Futtermittel*. In: Ernährung monogastrischer Nutztiere (Ed. Wiesemüller W., Leibetseder J.) Gustav Fischer Jean, p: 57-73.
- Lew H. 1981: *Chemische Indikatoren für Verpilzungsgrad eines Futtermittels*. Wien. tierärztl. Mschr. 68, 8/9: 305-307.

- Müller H.M., Metzger K.U., Modt. R., Reimann J. 1994: *Ergosterin und Fusarien-toxine in Weizenkleie und Weizen*. J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr., 71: 48-55.
- Pettersson H. 1995: *Penicilium verrucosum-Ochratoxin-Ergosterol*. Referat, SLU Uppsala, maszynopis.
- Pettersson H., Agendal M. 1995: *Determination of Ergosterol in Cereals and Relation to Mould and Mycotoxin Concentrations Raport*, SLU Uppsala, maszynopis.
- Schwadorf K., Müller H.M. 1989: *Determination of Ergosterol in Cereals, Mixed Feed Components, and Mixed Feeds by Lignid Chromatography*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 3: 457-462.

## DETERMINATION OF ERGOSTEROL IN PRODUCTS CONTAMINEO WITH PATHOGENIC FUNGI AND MYCOTOXINS

### Summary

The contents of ergosterol and aflatoxins were examined in moist barley grains, contaminated with pathogenic fungi with preservatives with and without air access.

Spores from strain of *Aspergillus parasiticus* isolated from acid treated were inoculated under the temperature of 25° C into newly harvested moist barley with the following treatment control with A. spores added 0,3 % by weight: a) (air access) – propionic acid, formic acid, sodium propionate, sodium formate, b) (no air access) – propionic acid, formic acid, mixture (1/1), Siloferm plus. The suboptimal doses conservants were used to study the risk of ergosterol and aflatoxin formation in connection with failures of particular acid preservation of moist grain. The results display a clear difference between formic and propionic acid treatments. The growth of *A. parasiticus* and ergosterol and aflatoxin production was restricted in propionic acid treated grain. In grain treated with formic acid alone, *A. parasiticus* totally dominated the fungal flora and produced high levels of ergosterol and aflatoxins. Both metabolites were determined with HPLC.

Ergosterol may stand as the chemical indicator determining product contaminations (especially grains) with fungal flora.

**Tabela 1.** Zawartość ergosterolu i aflatoksyn w wilgotnym ziarnie jęczmienia po 5 tygodniach (z dostępem powietrza)

**Table. 1.** The contents of ergosterol and aflatoxins in moist barley grains after 5 weeks (air access)

Nr próby Nr sample	Konserwant (0,3%) Conservants (0,3%)	Ergosterol (mg/kg wilgotnej masy) (mg/kg wet matter)	Aflatoksyny B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> (μg/kg wilgotnej masy) (μg/kg wet matter)
1	Bez konserwanta (kontrola) With out conservants (control)	32,23	8.8
2	Mrówczan sodu Natrium formiat	34.54	3.8
3	Propionian sodu Natrium propionat	31.18	0.9
4	Kwas mrówkowy Formic acid	28.37	34.7
5	Kwas propionowy Propionic acid	9.52	nw
	Suche ziarno Dry grain	7.55	nw



**Tabela 2.** Zawartość ergosterolu i aflatoksyn w zakiszonym wilgotnym ziarnie jęczmienia po 5 tygodniach (bez dostępu powietrza)

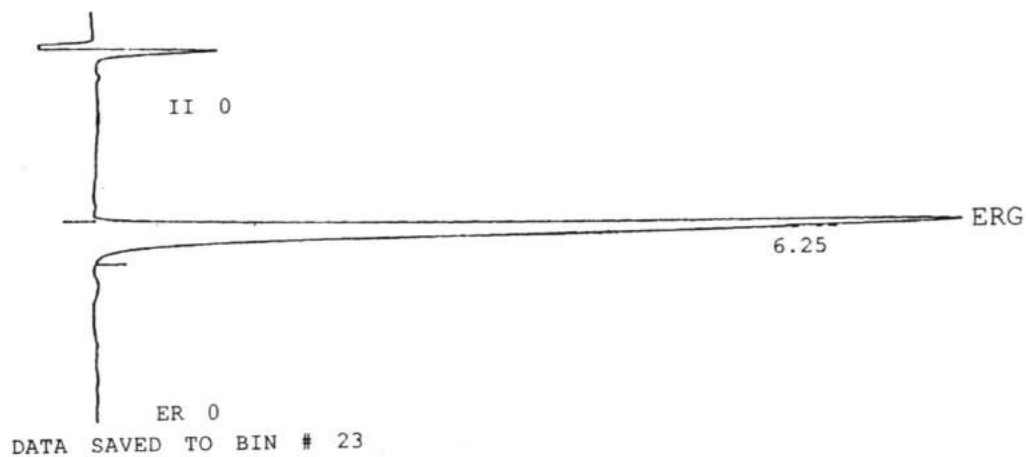
**Table 2.** The contents of ergosterol and aflatoxins in moist barley grains after 5 weeks (no air access)

Nr próby Nr sample	Konserwant (0,3%) Conservants (0,3%)	Ergosterol (mg/kg wilgotnej masy) (mg/kg wet matter)	Aflatoksyny B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> (μg/kg wilgotnej masy) (μg/kg wet matter)
1	Bez konserwanta (kontrola) With out conservants (control)	7.28	nw
2	Kwas mrówkowy Formic acid	6.44	nw
3	Kwas propionowy Propionic acid	6.29	nw
4	Wariant 2 i 3 (1/1) Mixture acid (1/1)	6.68	nw
5	Siloferm plus (inoculant)	7.75	nw
	Suche ziarno Dry grain	7.55	nw

nw – nie wykryto

nw – not detected



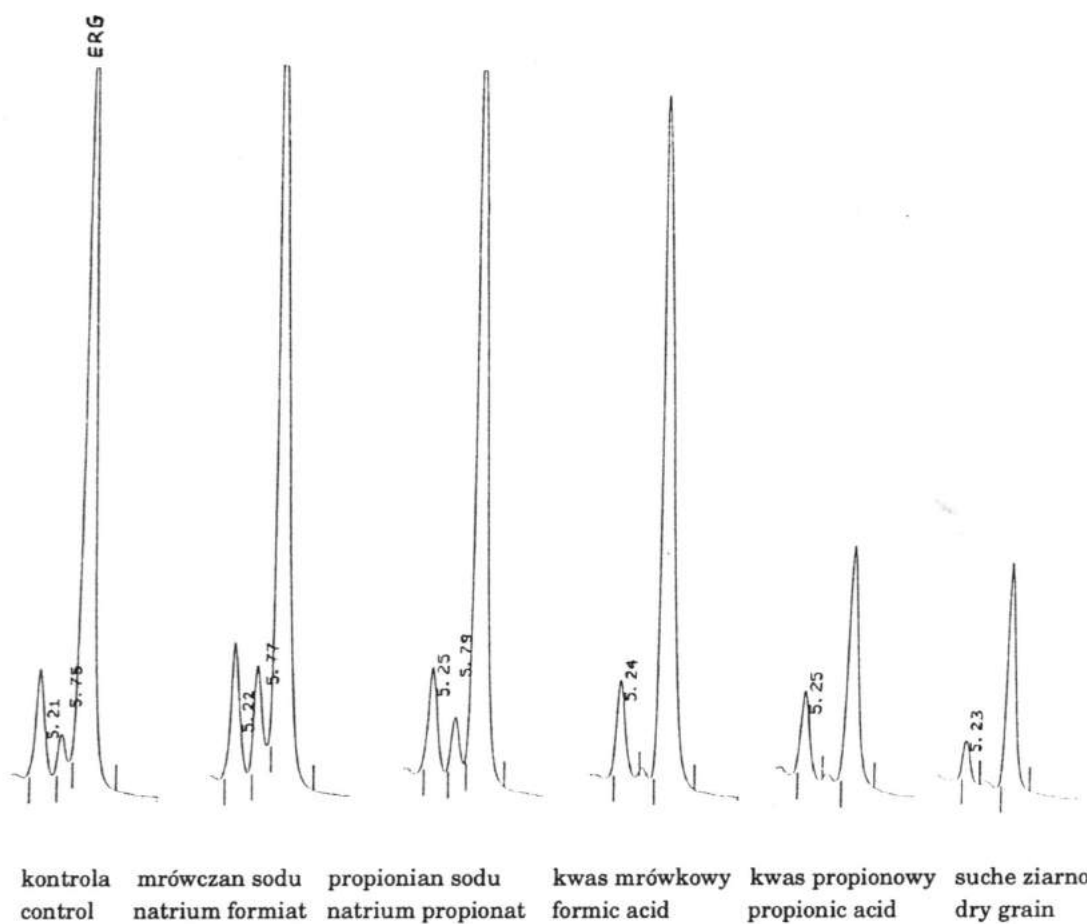


ERGO >< 23:12:56 CH= "B" PS= 1.  
 FILE 6. METHOD 5. RUN 222 INDEX 1 BIN 23  
 ANALYST: MA

NAME	UG	RT	AREA	BC	RF
ERGO	29.647	6.25	974854	01	32881.8
TOTALS	29.647		974854		

**Rys. 1.** HPLC – chromatogram standard ergosterolu  
**Fig. 1.** HPLC – chromatogram standard of ergosterol

ERGO >< 23:12:56 CH = "B" PS = 1.  
 FILE 6. METHOD 5. RUN 222 INDEX 1 BIN 23  
 ANALYST: MA  
 NAME UG RT AREA BC RF  
 ERGO 29.647 6.25 974854 01 32881.8  
 TOTALS 29.647 974854



**Rys. 2.** HPLC – chromatogram ergosterolu w wilgotnym ziarnie jęczmienia po 5 tygodniach (z dostępem powietrza)

**Fig. 2.** HPLC – ergosterol chromatogram in moist barley granis after 5 weeks (air access)