

Vývoj metody pro screeningová stanovení mykotoxinů v obilovinách

(Development of a method for mycotoxin screening assessments in cereals)

Ing. Ondřej Jirsa, Ph.D., Ing. Jiří Babušník,

Ing. Karel Klem, Ph.D., RNDr. Ivana Polišenská, Ph.D.

Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž

Souhrn

Byla ověřována možnost využití viditelné až velmi blízké infračervené spektroskopie pro stanovení obsahu mykotoxinu deoxynivalenolu (DON) a vizuálně poškozených fuzariózních zrn (VFZ) v pšenici a ječmeni. Pro měření byly použity jednodrúdové soubory pšenice a ječmene i běžné vzorky od farmářů z různých oblastí ČR. Z korelační analýzy normalizovaných spekter byly určeny nejtěsnější korelace odrazivosti s DON v oblasti 500–650 nm a 900–1000 nm. Mezi jednotlivými skupinami vzorků však byly pozorovány rozdíly. Výsledky ukazují, že je možné vytvořit kalibrační modely, které mohou být použity pro orientační stanovení obsahu DON v pšenici a ječmeni. Statistické zpracování metodou analýzy hlavních komponent ukázalo, že hlavní podíl spektrálního rozptylu byl tvořen celkovou odrazivostí vzorku.

Klíčová slova: DON, mykotoxiny, *Fusarium*, pšenice, ječmen

Summary

A possibility of using visible to very near-infrared spectroscopy to assess mycotoxin deoxynivalenol (DON) content and visually scabby kernels in wheat and barley was verified. One-cultivar sets as well as common samples of wheat and barley provided by farmers from various regions of the CR were used for the measurement. The correlation analysis of normalized spectra showed the closest correlations between reflectance and DON in the region of 500–650 nm and 900–1000 nm. However, differences were found among individual groups of the samples. The results suggest that there is a possibility of developing calibration models that can be employed for orientation assessment of the DON content in wheat and barley. Statistical evaluation using the analysis of main components demonstrated that a major proportion of spectral variability was due to total sample reflectance.

Key words: DON, mycotoxins, *Fusarium*, wheat, barley

Úvod

Významným faktorem, ovlivňujícím bezpečnost potravinového řetězce je riziko výskytu mykotoxinů. Mezi nejběžnější mykotoxiny v obilovinách patří deoxynivalenol (DON), známý také jako vomitoxin. DON je metabolit o nízké molekulové hmotnosti ze skupiny trichothecenových mykotoxinů produkovaný houbami rodu *Fusarium*, zejména *F. graminearum*. Tyto houby běžně napadají listy i klasy ječmene a pšenice, respektive palice kukuřice, kde způsobují onemocnění zvané *Fusarium head blight* (FHB) na pšenici a ječmeni resp. *Fusarium ear rot* na kukuřici. DON je znám zejména svým imunotoxickým efektem na organismus lidí i zvířat, v zemědělské praxi je mu věnována pozornost hlavně kvůli odmítání příjmu kontaminovaného krmiva prasaty.

Obilná zrna, napadená patogeny *Fusarium*, se od zrn zdravých liší v mnoha ohledech, předně v jejich chemickém složení, které vede ke snížení kvality zrn. Změny v chemickém složení jsou doprovázeny změnami ve fyzikálních vlastnostech (Tkachuk et al. 1991), např. blednutí zrn a snížení hmotnosti. Mezi poškozením zrn a obsahem mykotoxinů je mnoha autory (Teich et al. 1987; Ruckenbauer et al. 2002; Polišenská a Tvarůžek 2007) uváděna závislost.

Kontaminace obilovin mykotoxiny má celosvětově značný ekonomický dopad. V Evropě jsou pro obsah DON stanoveny maximální limity nařízením Evropské komise (ES/1881/2006), což s sebou přináší nutnost testování velkého množství vzorků. Velmi žádoucí je vývoj rychlých metod stanovení obsahu mykotoxinů v cereáliích pro orientační zjišťování jejich přítomnosti. Použití této metody pro jednotlivé partie obilí by umožnilo vybrat pro přesné, avšak velmi nákladné analýzy pouze vzorky, označené na základě aplikace screeningové metody jako rizikové.

Rychlou metodou, která je již zavedena a v praxi velmi hojně

využívána pro stanovení některých základních kvalitativních parametrů, je blízká infračervená (NIR) spektroskopie. Koncentrace, v jakých se mykotoxiny v obilninách běžně vyskytují, jsou však obecně považovány jako příliš nízké pro přímé stanovení touto metodou. Že je možné se k těmto limitům přiblížit, ukázali např. Pettersson a Aberg (2002), kteří získali v oblasti 670–1100 nm regresní model pro DON s korelačním koeficientem 0,984 a chybou predikce 381 µg/kg.

V této práci byly studovány možnosti využití spektrofotometru Avantes S2000 pro stanovení obsahu DON a poškození zrn pšenice a ječmene patogeny *Fusarium* spp.

Materiál a metody

Vyhodnoceny byly tři odrůdové soubory ozimé pšenice, dva odrůdové soubory ječmene a tři soubory běžných vzorků pšenice ze sklizňových let 2005, 2006 a 2007 (tab. 1). Odrůdové soubory pocházely z fungicidních pokusů s očkováním patogeny *Fusarium*. Analýza obsahu DON byla provedena metodou ELISA s limitem detekce 0,200 mg/kg. Zrna se symptomy poškození patogeny *Fusarium* (VFZ = vizuálně fuzariózní zrna) byla vybrána zkušeným pracovníkem, napadená zrna pšenice byla rozdělena do třech skupin podle stupně a typu poškození (VFZ1, VFZ2, VFZ3) a jejich podíl je udáván v % vztažených k celkové hmotnosti vzorku. Jako VFZ1 byla hodnocena zrna s typicky změnou barvou – bělavá, narůžovělá, zrno standardně vyvinuté; VFZ2 – zrna scvrklá, normální barvy a VFZ3 – zrna scvrklá, se změnou barvou růžovou, bělavou nebo šedou.

Pro měření spektrální reflektance byl použit spektrofotometr Avantes S2000. Jedná se o spektrometrický systém s přívodem detekovaného signálu od vzorku k detektoru prostřednictvím optického vlákna. K měření byla použita měřicí komůrka s umělým zdrojem světla (halogenová lampa) a měřicí plochou kru-

Tab. 1: Přehled použitých vzorků

Odrůda	Plodina	Lokalita	Rok sklizně	Počet vzorků	DON (mg/kg)	VFZ (%)
					min	max
Clever	pšenice	Velká Bystrice	2006	23	2,09	- 65,00
Banquet	pšenice	Tábor	2007	20	pod LOD	- 5,65
Sulamit	pšenice	Ivanovice	2007	12	0,35	- 3,49
Různá (monitoring)	pšenice	různé lokality ČR	2005	84	pod LOD	- 4,44
Různá (monitoring)	pšenice	různé lokality ČR	2006	152	pod LOD	- 5,00
Různá (monitoring)	pšenice	různé lokality ČR	2007	100	pod LOD	- 20,29
Jersey	ječmen	Kroměříž	2007	12	1,56	- 14,60
Prestige	ječmen	Kroměříž	2007	12	3,33	- 17,52

DON = deoxynivalenol, VFZ = vizuálně fuzariózní zrna (celkový obsah), LOD = limit detekce

hového tvaru o průměru jeden centimetr. Efektivní rozsah vlnových délek daný použitým zdrojem světla činí 400–1100 nm. Každá křivka spektrální reflektance byla získána při integrační době 80 ms jako průměr pěti scanů. Vzorky celých zrn a šrotů byly měřeny volně sypané ve skleněné misce ve čtyřech opakováních.

Pro statistickou analýzu byl počet datových bodů redukován (krok 10 nm) a vypočtena průměrná spektra z opakovaných měření. Spektra byla dále matematicky upravena normalizací (podíl reflektancí při dané a referenční vlnové délce), nebo derivací. Hodnoty reflektance při jednotlivých vlnových délkah byly korelovány se známým obsahem DON a VFZ. Normalizovaná spektra byla použita pro tvorbu regresních modelů pomocí neuronových sítí. Pro statistické zpracování bylo využito programu STATISTICA (StatSoft, ČR).

Výsledky a diskuze

Pšenice

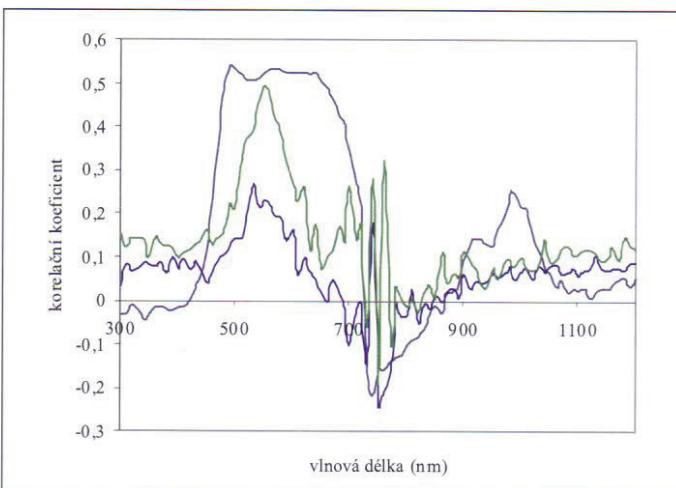
Naměřené hodnoty reflektance byly normalizovány (maximální intenzita spektra = 1) a takto upravená spektra byla podrobená korelační analýze. Nejtěsnější korelační vztah (až 0,5) mezi reflektancí zrn a obsahem DON byl zjištěn pro soubor vzorků odrůdy Clever v oblasti vlnových délek 480 až 650 nm (maximum 490 nm), 730 nm a 980 nm (obr. 1). Hodnoty celkového obsahu VFZ a VFZ1 byly velmi silně korelovány s obsahem DON (korelační koeficient $r > 0,9$) a poskytly tak analogický charakter korelací s hodnotami reflektance (obr. 2), jaký byl získán pro

korelace s obsahem DON. Podíl nejvíce poškozených zrn (VFZ3) vykázal nejvýznamnější korelace k hodnotám reflektance při 480 a 730 nm.

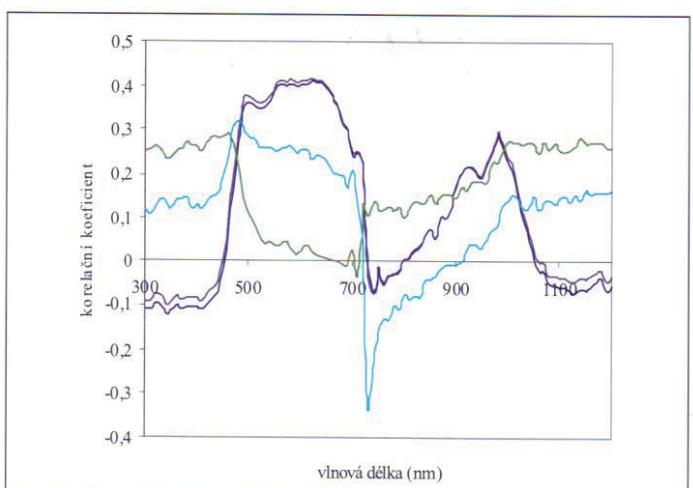
Pro odrůdy Banquet a Sulamit byly získány srovnatelné korelační závislosti, které jsou charakterizovány extrémy v oblastech 510 a 730 nm (obr. 1). I tyto soubory byly charakterizovány silnou závislostí mezi obsahem DON a VFZ1 resp. VFZ jako celku. Tyto soubory však neobsahovaly vzorky s vysokou úrovní kontaminace (max. 5,65 mg/kg). Kromě normalizovaných spekter byly s těmito soubory hledány také korelace použitím derivovaných spekter. Průběh jejich korelační závislosti k obsahu DON se vyznačuje větší členitostí, přičemž maxima dosahují hodnoty až 0,5. Společným rysem pro oba soubory je maximum závislosti v oblasti 320 až 330 nm, nicméně tato oblast (300 až 400 nm) je již mimo efektivní rozsah spektrometru a vykazuje nízký poměr signálu k šumu.

Soubory vzorků z monitorovacích zkoušek jsou charakteristické rozmanitou odrůdovou skladbou. Většina vzorků nedosahuje vyšších hladin koncentrace DON (cca čtvrtina vzorků je pod limitem detekce). Vyšší koncentrace byly zjištěny v roce 2007. Sledovány byly korelace reflektance s obsahem DON. S ročníky 2005 a 2006 byly získány nevýznamné korelace k obsahu DON (obr. 3). S ročníkem 2007 byly získány statisticky významné závislosti s maximy při 500 a 720 nm.

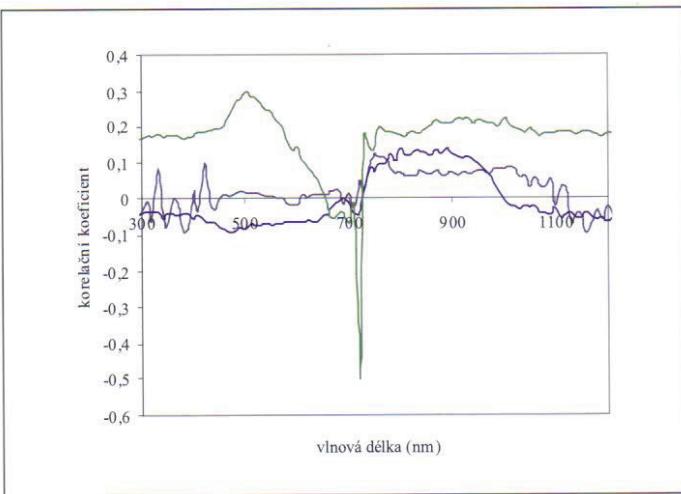
Pro vzorky sklizně 2007 byla analogická měření jako na celém zrnu prováděna také na šrotech. Charakter spekter i korelační závislost mezi reflektancí a obsahem DON mají analogický charakter jako v případě měření celých zrn pro soubory vzorků



Obr. 1: Korelační závislost obsahu DON na odrazivosti celých zrn pro soubory odrůd pšenice. – Clever, – Banquet, – Sulamit.



Obr. 2: Korelační závislost obsahu VFZ na odrazivosti celých zrn pro soubory odrůdy Clever. – Σ VFZ, – VFZ1, – VFZ2, – VFZ2.



Obr. 3: Korelační závislost obsahu DON na odrazivosti celých zrn pro soubory monitoringu pšenice. – 2005, – 2006, – 2007.

odrůd Banquet a Sulamit, přičemž byla dosažena větší míra korelace. Pro běžné vzorky z ČR byla míra korelační závislosti šrotu nižší než v případě celých zrn.

Ječmen

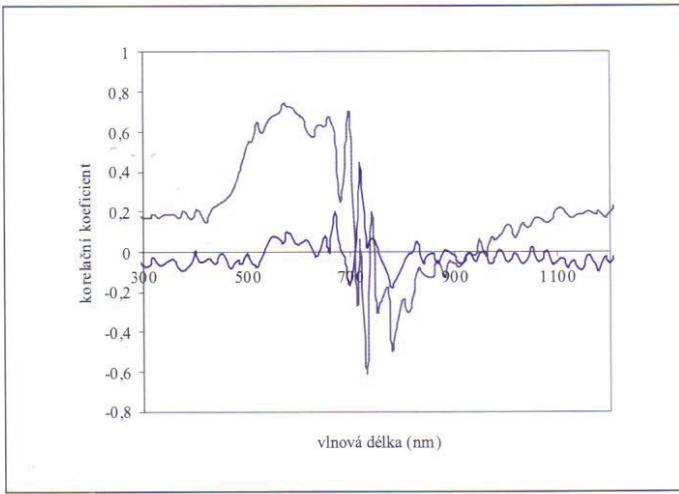
Při hodnocení normalizovaných spekter zrn ječmene byly s odrůdou Jersey získány nejtěsnější korelace (až 0,74) mezi reflektancí celých zrn a obsahem DON v oblasti vlnových délek 500 až 670 nm (maximum 570 nm) a 730 nm (obr. 4), analogicky jako pro pšenice. S odrůdou Prestige byla dosažena nejvyšší míra korelace 0,44 při 720 nm (obr. 4), jednalo se však o jedinou vlnovou délku a v dalších oblastech již nebyla pozorována žádná souvislost s obsahem DON.

Silné korelace (až 0,83) se projevily i s neupravenými spektary s odrůdou Jersey, naopak s odrůdou Prestige nebyly významné při žádné vlnové délce. Při použití první derivace spekter však byly s oběma soubory dosaženy korelace DON větší než 0,5.

Další statistické analýzy vzorků 2007

Spektra zrn vzorků ze sklizně 2007 byla podrobena analýze hlavních komponent (PCA), která vytváří nové nekorelované veličiny seřazené podle klesajícího příspěvku k vysvětlení celkového rozptylu původních proměnných. Po vyhodnocení spekter bylo možné přiřadit první komponentu (90,7 až 99,8 % variability) celkové intenzitě reflektance. Jednotlivé získané latentní proměnné (hlavní komponenty) byly podrobeny korelační analýze k obsahu DON. Významné korelace s první komponentou byly zjištěny pro soubory odrůd Jersey a Banquet, což znamená, že obsah DON koreloval s celkovou mírou odrazivosti. Druhá komponenta byla kromě těchto souborů významná i pro soubor vzorků odrůdy Sulamit. Se souborem odrůdy Prestige a vzorků z monitoringu v roce 2007, které poskytly menší úspěšnost korelací DON s původními spektary, byly nalezeny významné korelace DON s dalšími latentními proměnnými.

Pro odhad obsahu DON na základě získaných hodnot odrazivosti byly dále vytvořeny regresní kalibrační modely pomocí umělých neuronových sítí (ANN), které umožňují modelovat nelineární závislosti. Při hledání optimálního modelu bylo zapojeno několik typů neuronových sítí i celé jejich spektrum. Během učení sítí byly nevýznamné vlnové délky eliminovány, příspěvek uchovaných vlnových délek byl hodnocen citlivostní analýzou.



Obr. 4: Korelační závislost obsahu DON na odrazivosti celých zrn pro soubory odrůd ječmene. – Jersey, – Prestige.

Úspěšnost jednotlivých modelů byla posuzována mírou korelace mezi pozorovanými a predikovanými hodnotami.

Se souborem odrůdy Jersey byly získány nejlepší výsledky s jednoduchými lineárními modely, které využívají pouze několik vlnových délek. Zde je zřejmá souvislost s předchozím pozorováním závislosti maximální reflektance a obsahu DON v tomto souboru. Nejlepší lineární model využívá čtyři vlnové délky (700, 730, 760 a 790 nm) a dosáhl velmi dobré míry korelace 0,98 mezi pozorovanými a predikovanými hodnotami. Se souborem odrůdy Banquet byl získán nejlepší model s hodnotou korelace 0,59, který pracuje se 125 vlnovými délkami. Pro největší hodnocený soubor Monitoring 2007 model zapojil celkem 120 vlnových délek a byla dosažena míra korelace 0,91.

Závěr

Přímá detekce mykotoxinů vyžaduje použít střední oblast infračerveného záření (2,5–20 μm) (Kos et al. 2002), kdežto většina běžných spektrometrů pracuje ve viditelné až infračervené oblasti (400–2500 nm), tj. v oblasti, kde lze detektovat zrna vykazující vizuální symptomy napadení patogeny *Fusarium spp.* Proto dávají lepší výsledky měření soubory jednoodrůdové, pěstované v identických klimatických i agrotechnických podmínkách, kde je také závislost mezi obsahem vizuálně napadených zrn a obsahem DON nejtěsnější. Je předpoklad, že tuto rychlou a levnou optickou metodu bylo možno použít pro detekci napadených zrn a/nebo mykotoxinů alespoň jako screeningový postup. Siuda et al. (2006) porovnávali spektrální rozsahy pro stanovení obsahu napadeného materiálu ve vzorcích mleté pšenice, přičemž nejlepší výsledky získali s rozsahem 200 až 1400 nm.

Korelace mezi obsahem VFZ a obsahem DON je známa a byla popsána mnoha autory (Teich et al. 1987, Dexter a Nowicki 2003, Polišenská a Tvarůžek 2007), může však být ovlivněna mnoha faktory a kolísat ve velkém rozsahu. Při vyhodnocování křivek spektrální odrazivosti různých souborů vzorků byla pozorována velká variabilita korelačních závislostí k obsahu DON, přesto bylo možné určit některé opakující se rysy v hodnocených souborech. Použitím normalizovaných spekter byly určeny dvě nejvýznamnější oblasti okolo 500 a 730 nm. Měřením šrotů, u kterých lze předpokládat větší homogenitu vzorků, byly zlepšeny korelace v případě jednoodrůdových souborů.

Ve shodě s dostupnou literaturou ukázaly výsledky použitelnost zvolené metodiky při screeningu vzorků na přítomnost napadených zrn, což by umožnilo vybrat problémové partie pro přesnou analýzu. Pro možnost jejího praktického využití, tj. vyvinutí spolehlivých a robustních matematických modelů pro odhad intenzity napadení/obsahu DON, bude třeba provést zkoumání na dalších sériích vzorků a stanovit podmínky použitelnosti. Metoda měření optických vlastností obilních zrn může najít také uplatnění při třídění napadených zrn na základě vybraných vlnových délek. Delviche et al. (2005) použili při bichromatickém optickém třídění jednotlivých zrn pšenice dvojici vlnových délek z viditelné (675 nm) a blízké infračervené (1480 nm) oblasti. S komerčním třídičem dosáhli odstranění přibližně poloviny množství napadených zrn a snížení koncentrace DON na polovinu. Vysokorychlostní bichromatické komerční třídiče jsou dostupné i v ČR.

Poděkování:

Publikované výsledky byly dosaženy v rámci řešení výzkumného projektu MZe NAZV č. QG 60047. Některé použité vzorky byly získány v rámci projektu MZe NAZV č. QG 50041.

Literatura

- DELWICHE, S.R., PEARSON, T.C., BRABEC, D.L. (2005): High-speed optical sorting of soft wheat for reduction of deoxynivalenol. *Plant Disease*, vol. 89, s. 1214–1219.
- DEXTER, J.E., NOWICKI, T.W. (2004): Safety assurance and quality assurance issues associated with *Fusarium* head blight in wheat. In Leonard, K.J., Bushnel, W.R., editors. *Fusarium head blight of wheat and barley*. St. Paul, MN: APS Press, s. 420–460.
- KOS, G., LOHNINGER, H., KRSKA, R. (2002): Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium* fungi on maize. *Vibrational Spectroscopy*, vol. 29, s. 115–119.
- POLIŠENSKÁ, I., TVARŮŽEK, L. (2007): Relationships between deoxynivalenol content, presence of kernels infected by *Fusarium* spp. pathogens and visually scabby kernels in Czech wheat in 2003–2005. *Cereal Research Communications*, vol. 35, s. 1437–1448.
- RUCKENBAUER, P., HOLLINS, T.W., DE JONG, H.C., SCHOLTEN, O.E. (2002): Ring test with selected wheat varieties. In Scholten, O.E., Ruckenbauer, P., Visconti, A., Van Osenbruggen, W.A., Den Nijs, A.P.M., editors. *Food Safety of cereals: A chain-wide approach to reduce Fusarium mycotoxins*. s. 17–22. Dostupné z: <http://www.mycotochain.org>
- SIUDA, R., BALCEROWSKA, G., SADOWSKI, C. (2006): Comparison of the usability of different spectral ranges within the near ultraviolet, visible and near infrared ranges (UV-VIS-NIR) region for the determination of the content of scab-damaged component in blended samples of ground wheat. *Food Additives and Contaminants*, vol. 23, s. 1201–1207.
- TEICH, A.H., SHUGAR, L., SMID, A. (1987): Soft white winter wheat cultivar field-resistance to scab and deoxynivalenol accumulation. *Cereal Research Communications*, vol. 15, s. 109–114.
- TKACHUK, R., DEXTER, J.E., TIPPLES, K.H., NOWICKI, T.W. (1991): Removal by specific gravity table of tombstone and associated trichotheccenes from wheat infected with *Fusarium* head blight. *Cereal Chemistry*, vol. 68, s. 428–431.

Kontaktní adresa: jirsa.ondrej@vukrom.cz

SUMI AGRO CZECH s.r.o. PROTUGAN® 50 SC

- postemergentní aplikace proti dvouděložným plevelům a chundelce metlici
- přijímán listy a kořeny
- reziduální účinek až 3 měsíce

TOPSIN M®

- systémový účinek
- preventivní a kurativní účinek
- reziduální účinek 3-4 týdny
- výborný účinek – stéblolam, fusária, rhynchosporiová skvrnitost, dobrý účinek na padlí, tlumí nástup braničnatky
- kombinace s DAM, CCC, herbicidy

IMPACT®

- nejrychlejší azol
- systémový fungicid s rychlým průnikem
- dokonale se rozvádí po celé rostlině
- dobrý kurativní a eradikativní účinek
- účinný proti: rzim, padlí, braničnatkám, rhynchosporiové a hnědé skvrnitosti

Tendəncı® 25

- systémový fungicid s preventivním, kurativním a eradikativním účinkem
- délka působení 3-4 týdny
- použití v pšenici, ječmeni, žitě
- proti braničnatkám, rzem i padlí v pšenici
- proti hnědé a rhynchosporiové skvrnitosti
- v ječmeni použitelný v rámci TM pro posílení účinnosti na stéblolam, padlí aj. (Topsin-M)



SUMI AGRO CZECH s.r.o.

Na Strži 63, 140 62 Praha 4

tel.: 261 090 281-6, fax 261 090 280

www.sumiagro.cz

Jan Hrbáček
střední Čechy
602 446 415

Zdeněk Krejcar
severní Morava
602 669 739

Jiří Andr
východní a střední Čechy
602 177 885

Roman Procházka
jižní a střední Morava
602 205 456

Petr Lacina
jižní Čechy a Vysočina
602 224 885

Václav Noska
severní a západní Čechy
606 704 480