

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ BUCUREȘTI
FACULTATEA DE AGRICULTURĂ**

**CERCETĂRI PRIVIND MICOTOXINELE DIN
GRÂU ȘI PORUMB**

TEZA DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,
Prof. univ. dr. Petru NICULIȚĂ

DOCTORAND,
Ing. Mihaela Nicoleta AVRAM

BUCUREȘTI
2007

CUPRINS

	pagina
LISTĂ DE ABREVIERI	1
INTRODUCERE	3
PARTEA I	6
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL MICOTOXINELOR DIN CEREALE ȘI PRODUSE ALIMENTARE	
Capitol	7
1	
MICOTOXINELOR DIN CEREALE ȘI ALIMENTE	
1.1. Considerații generale privind micotoxinele	7
1.2. Fungi producători de micotoxine	8
1.3. Clasificarea micotoxinelor	15
1.3.1. Micotoxine principale	15
1.3.2. Micotoxine secundare	16
1.4. Caracterizarea micotoxinelor	17
1.4.1. Aflatoxine	18
1.4.2. Ochratoxine	22
1.4.3. Trichotecene	24
1.4.4. Zearalenona	26
1.4.5. Fumonizine	28
1.5. Incidența micotoxinelor în cereale și produse alimentare	29
1.6. Influența condițiilor de depozitare a cerealelor asupra contaminării cu fungi și producerii de micotoxine	32
1.7. Aspecte legislative privind micotoxinele din alimente	34
1.8. Concluzii	39
Capitol	41
2	
POSIBILITĂȚI TEHNICE ȘI METODE ANALITICE DE REDUCERE A CONTAMINĂRII CU MICOTOXINE A CEREALELOR ȘI PRODUSELOR CEREALIERE	
2.1. Metode fizice	42

2.2. Metode chimice	45
2.3. Metode microbiologice	46
2.4. Concluzii	47
Capitol 3 TEHNICI ANALITICE DE DETECȚIE ȘI DETERMINARE ALE MICOTOXINELOR	49
3.1. Metoda cromatografiei în strat subțire (TLC)	50
3.2. Metoda cromatografiei lichide (LC)	51
3.3. Metoda gaz cromatografiei (GC)	56
3.4. Metode imunologice	57
3.5. Concluzii	58
PARTEA a II a CERCETĂRI EXPERIMENTALE PRIVIND MICOTOXINELE DIN GRÂU ȘI PORUMB	60
Capitol 4 MATERIALE, TEHNICI DE EXPERIMENTARE, CONDIȚII ȘI LOCURI DE CERCETARE	61
4.1. Determinarea contaminării microbiene a grâului și porumbului	61
4.1.1. Materiale și echipamente folosite în experimentări	61
4.1.2. Metoda de determinare a contaminării microbiene	62
4.2. Determinarea contaminării cu micotoxine a grâului și porumbului prin metoda ELISA	64
4.2.1. Materiale și echipamente folosite în experimentări	65
4.2.2. Metoda ELISA de determinare a micotoxinelor din grâu și porumb	70
4.3. Materiale și metoda HPLC dezvoltată pentru determinarea micotoxinei DON din cereale	75
4.3.1. Materiale și echipamente folosite în experimentări	75
4.3.2. Metoda HPLC pentru determinarea micotoxinei DON din cereale	77
4.4. Material biologic folosit în experimentări	77

Capitol	CERCETĂRI PRIVIND CONTAMINAREA GRÂULUI CU FUNGI ȘI	85
5	MICOTOXINE ÎN FUNCȚIE DE CONDIȚIILE CLIMATICE	
	5.1. Analiza condițiilor de mediu pe zone de cultură în funcție de proveniența probelor de grâu utilizate în experimentări	85
	5.2. Stabilirea experimentală a contaminării cu fungi a probelor de grâu din recolta anilor 2002, 2003, 2004, 2005 din România	96
	5.3. Experimentări preliminare privind contaminarea cu aflatoxine totale și OTA din recolta de grâu a anului 2002	102
	5.4. Stabilirea experimentală a contaminării cu DON a probelor de grâu din recolta anilor 2002, 2003, 2004, 2005, 2006	105
	5.5. Stabilirea experimentală a contaminării cu fungi și micotoxine (aflatoxine totale și DON) a altor probe de grâu și produse din grâu	113
	5.6. Concluzii	119
Capitol	CERCETĂRI PRIVIND CONTAMINAREA PORUMBULUI CU	122
6	BACTERII, FUNGI ȘI MICOTOXINE ÎN FUNCȚIE DE CONDIȚIILE CLIMATICE	
	6.1. Analiza datelor climatice din zona de cultură a porumbului utilizat în experimentări	122
	6.2. Stabilirea experimentală a contaminării cu bacterii și fungi la recoltare și în timpul depozitării porumbului	124
	6.3. Experimentări privind contaminarea cu DON și ZON la recoltare și în timpul depozitării porumbului	129
	6.4. Stabilirea experimentală a contaminării cu fungi și micotoxine (fumonizine și DON) a altor probe de porumb și produse din porumb	133
	6.5. Concluzii	136
Capitol	CERCETĂRI PRIVIND EFECTELE TRATAMENTULUI TERMIC	138
7	ASUPRA MICOTOXINELOR DON ȘI ZON DIN PROBE DE CEREALE CONTAMINATE NATURAL	

7.1. Experimentări privind influența temperaturii și a timpului de coacere asupra reducerii nivelului micotoxinei DON din probe de grâu contaminate natural	138
7.2. Experimentări privind influența temperaturii și a timpului de coacere asupra reducerii nivelului micotoxinei ZON din probe de porumb contaminate natural	143
7.3. Concluzii	147
Capitol 8 CERCETĂRI PRIVIND DEZVOLTAREA ȘI OPTIMIZAREA METODEI HPLC PENTRU DETERMINAREA MICOTOXINEI DON DIN CEREALE	149
8.1. Experimentări preliminare	149
8.2. Cercetări experimentale privind realizarea curbei de calibrare	153
8.3. Cercetări privind testarea și verificarea metodei HPLC utilizând material de referință certificat DON	155
8.4. Cercetări privind testarea probelor îmbogățite cu standard DON	174
8.5. Cercetări experimentale privind analiza și stabilirea corelației dintre metodele HPLC și ELISA	177
8.6. Concluzii	179
PARTEA a III a	183
CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII ALE AUTORULUI LA DEZVOLTAREA DOMENIULUI	
Capitol 9 CONCLUZII FINALE	184
9.1. Concluzii cu privire la contaminarea grâului cu fungi și micotoxine în funcție de condițiile climatice	184
9.2. Concluzii cu privire la contaminarea porumbului cu bacterii, fungi și micotoxine la recoltare și în timpul depozitării, în funcție de condițiile climatice	185
9.3. Concluzii cu privire la efectul tratamentului termic asupra micotoxinelor DON și ZON	186
9.4. Concluzii cu privire la dezvoltarea și optimizarea metodei HPLC pentru determinarea micotoxinei DON	186

CUPRINS

Capitol	CONTRIBUȚIILE AUTORULUI LA DEZVOLTAREA DOMENIULUI	188
10	10. Contribuțiile autorului la dezvoltarea domeniului	188
	BIBLIOGRAFIE	191
	ANEXA 1 CROMATOGRAME	198
	CONTENT	209
	REFERENCES	214

INTRODUCERE

Micotoxinele fac parte din categoria contaminanților alimentari, care sunt definiți, conform Ordonanței de urgență nr. 97 / 21 iunie 2001, capitol 1, articol 3, litera h « *orice substanță adăugată neintenționat în alimente, prezența în acestea ca rezultat al producției (inclusiv activitățile privind creșterea plantelor și animalelor și medicină veterinară), al fabricației, prelucrării, preparării, tratamentelor, împachetării, ambalării, transportului sau manipulării acestora sau ca rezultat al contaminării mediului înconjurător. Materiile straine, cum ar fi fragmentele de insecte, părul de animale, nu sunt incluse în această definiție*».

Micotoxinele reprezintă un semnal de alarmă prin simpla lor prezență în alimente, chiar și în concentrații mici pun în pericol sănătatea animală și, implicit, pe cea umană, printr-o afectare a răspunsului imun. Încă de la descoperirea acestor toxine, cercetările au fost focalizate asupra modalităților de detecție și determinare, gradului de toxicitate indus la om și animale, stabilirea condițiilor favorabile de dezvoltare a fungilor care produc micotoxine, stabilirea unor limite maxime admise de micotoxine în alimente și furaje.

La nivel european se apreciază că nivelul de contaminare cu micotoxine este de 20 %, chiar și în țările dezvoltate, dar acest procent este cu siguranță mai ridicat în condițiile practicării unei agriculturi mai puțin competitive. În țările dezvoltate ale Europei este estimată o pierdere de recoltă de 5 - 10 % din cauza atacului de fungi.

Încercările de reducere a concentrației de micotoxine au fost extrem de diverse, dar nu s-au dovedit foarte eficiente, datorită, pe de-o parte, diversității structurale și a modului de acțiune al micotoxinelor și, pe de altă parte, a prețului de cost ridicat al tratamentelor. Ca urmare, prevenirea apariției micotoxinelor rămâne, până în prezent, singura și cea mai eficientă cale de evitare a acțiunilor lor negative.

Efectele diverse și extrem de grave pe care le au micotoxinele pe tot parcursul lanțului alimentar, potențialul pericol pe care îl reprezintă pentru om, au făcut ca acest domeniu să reprezinte o prioritate la nivel mondial.

Pe fondul acestui interes mondial privind micotoxinele, Romania, in postura de membru al Uniunii Europene trebuie să se alinieze la cerințele impuse cu privire la asigurarea calității produselor comercializate prin control sistematizat și monitorizat, pornind de la controlul calității materiilor prime până la obținerea produsului finit.

Teza de doctorat prezintă cercetările efectuate în vederea stabilirii contaminării cu fungi potențial toxigeni și micotoxine a grâului și porumbului, având în vedere condițiile climatice și de depozitare. De asemenea, s-a urmărit stabilirea gradului de reducere a contaminării cu micotoxine prin procesarea unor probe contaminate natural, sub influența temperaturii de coacere și a timpului de expunere.

În experimentările efectuate, conținutul de micotoxine a fost determinat prin metoda imunoenzimatică (ELISA), utilizându-se kiturile de analiză specifice fiecărei micotoxine. Metodele de analiză ale micotoxinelor sunt variate, fiecare prezentând diferite tehnici de pregătire a probei, precizia și acuratețea măsurării fiind elementele definitorii ale unei metode. În cadrul acestei lucrări sunt prezentate, de asemenea, și rezultatele experimentărilor privind dezvoltarea și optimizarea metodei cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC) de determinare a micotoxinei deoxinivalenol din cereale. Metoda HPLC reprezintă o metoda de referință în determinarea micotoxinelor, permițând cuantificarea la nivel foarte scăzut, de ordinul ng sau pg.

Experimentările au fost realizate cu sprijinul Institutului de Bioresurse Alimentare și al Centrului de Biochimie Aplicată și Biotehnologie BIOTEHNOL din București. În cadrul laboratorului de microbiologie al Institutului de Bioresurse Alimentare s-au realizat experimentările privind contaminarea cu fungi și bacterii a probelor de grâu și porumb, precum și analiza micotoxinelor prin metoda ELISA. Experimentările cu privire la dezvoltarea și optimizarea metodei HPLC de determinare a micotoxinei DON din cereale s-au realizat în cadrul Centrului de Biochimie Aplicată și Biotehnologie BIOTEHNOL din București.

Studiile și experimentările realizate reprezintă o bază materială deosebită pentru cultivatori și procesatori (unități de morărit și panificație), prin evidențierea factorilor de risc care determină contaminarea cu fungi toxigeni și producerea de micotoxine. Este o cerință unanimă, aceea de a evalua calitatea cerealelor destinate consumului uman și

animal, în vederea stabilirii contaminării cu micotoxine, un rol important având metoda de analiză, care trebuie să fie cât mai sensibilă.

Sunt onorată să amintesc că tema tezei de doctorat, de mare actualitate, mi-a fost propusă de către doamna doctor inginer Nastasia Belc, director general al Institutului de Bioresurse Alimentare, care m-a îndrumat și m-a sprijinit în activitatea de cercetare de la terminarea facultății, oferindu-mi posibilitatea de a lucra împreună cu o echipă dinamică de cercetători a Institutului de Bioresurse Alimentare. Vreau să exprim întreaga mea recunoștință pentru conducătorul de doctorat, domnul profesor universitar doctor Petru Niculiță care m-a sprijinit permanent în activitate. De asemenea, vreau să mulțumesc doamnei profesor doctor inginer Mona Elena Popa pentru încrederea acordată și ajutor în activitatea științifică.

Vreau să mulțumesc întregului colectiv de cercetători și tehnicieni ai Institutului de Bioresurse Alimentare, și mai ales, doamnei doctor biolog Valeria Gagi, conducătorul laboratorului de microbiologie, pasionat cercetător, care m-a îndrumat direct pe toată perioada experimentărilor realizate în acest laborator. Nu în ultimul rând, doamnei doctor biochimist Enuța Iorga, director științific, pentru tot sprijinul acordat și doamnei inginer Sabina Ghencea, datorită căreia a fost posibilă utilizarea în experimentări a probelor din recolta de grâu din România. Nu pot uita colaborarea deosebită cu doamna doctor inginer Florentina Israel Roming și vreau să îi mulțumesc atât pentru introducerea în "tainele HPLC-ului", cât și pentru știința de a împăca profesia și familia.

De asemenea, vreau să mulțumesc doamnelor tehnician Domnica Dumitriu, Constanța Pirvu și Ioana Tira, care mi-au fost alături și m-au sprijinit permanent, atât pe plan profesional, cât și pe plan personal.

Nu în ultimul rând, mulțumesc familiei mele, soțului și părinților mei.