

Katarzyna Janda¹, Krzysztof Ulfig², Grzegorz Hury³, Agata Markowska-Szczupak⁴

¹ Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Zakład Biochemii i Żywienia Człowieka

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

² Zakład Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych

³ Zakład Uprawy Roli i Roślin, Katedra Agronomii

⁴ Zakład Biotechnologii

Autor korespondencyjny – K. Janda, e-mail: kjanda@pum.edu.pl

DOI: 10.5604/12338273.1083531

Zależności pomiędzy wybranymi cechami jakościowymi nasion soi a ich zasiedleniem przez grzyby*

Correlation between some qualitative features of soybean and occurrence of fungi

Słowa kluczowe: soja, jakość nasion, występowanie grzybów, korelacje

Streszczenie

Materiał badawczy stanowiło 15 prób nasion soi. Określono masę tysiąca nasion, ciężar objętościowy, ilość zanieczyszczeń, pH, wilgotność, aktywność wody (a_w), zawartość tłuszczu, kwasowość tłuszczu oraz wilgotność krytyczną nasion. Występowanie grzybów określono z wykorzystaniem pożywek RBA, DG18 oraz YpSs i inkubacji w 25°, 37° i 45°C. Najwięcej grzybów wyizolowano na DG18 w 25°C. Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy masą tysiąca nasion a liczbą grzybów termofilnych. Zaobserwowano dodatnią zależność pomiędzy kwasowością tłuszczu a liczbą grzybów mezofilnych i kserofilnych. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy wilgotnością nasion a liczbą kolonii grzybów kserofilnych. Odwrotnie proporcjonalną zależność wykazano między aktywnością wody nasion a liczbą grzybów na pożywce YpSs (37°C). Stwierdzone zależności wskazują na związek pomiędzy jakością nasion a liczbą kolonii grzybów je zasiedlających.

Key words: soybean, quality of seeds, occurrence of fungi, correlations

Abstract

No work has been found in which correlation between chosen qualitative features of soybean seeds and the settlement of the fungi colonies were investigated. The study was designed to evaluate selected qualitative characteristics of soybean, to determine the quantitative analysis of fungi including different media and temperature incubation and to specify correlation between qualitative characteristics of soybean and the number of colonies of fungi that inhabit them. Investigated material of soya comprised 15 samples of seeds. The characteristics of seeds included calculation of thousand seed weights, volumetric weight, amount of mineral and organic impurities (including the seeds of other species and undeveloped and damaged seeds), pH of seeds, seeds moisture content, seeds water

* Praca finansowana z grantu MNiSW 2P06R 025 30

activity (a_w), seed fat content, fat acidity and critical moisture of seeds. Fungi contaminated soybean was investigated using different culture media (RBA, YpSs, DG18 Agar) and incubation temperatures (25°C, 37°C and 45°C). The number of fungi was diversified depending on the type of culture medium and incubation temperature. The largest number of fungi colonies was isolated when DG18 medium was used at 25°C. Significant differences between thousand seed weights and amount of fungi on YpSs at 45°C have been revealed.

The positive correlation was observed between the fat acidity and the number of mesophilic and xerophilic fungi at 25°C on RBA and DG18 media. The positive correlation was also observed between humidity of seeds and the number of xerophilic fungi on DG18 at 25°C. The negative correlation between water activity of seeds and the number of colonies of mesophilic fungi on YpSs at 37°C has been demonstrated. Relevant statistical correlations between physicochemical properties of soybean and the number of isolated fungi have been shown. Increased fat acidity may indicate fungal contamination of soybean.

Wprowadzenie

W strukturze światowej produkcji nasion oleistych soja zwyczajna (*Glycine clandestina* Wend) zajmuje pierwsze miejsce (ok. 58% powierzchni upraw), zaś w strukturze produkcji krajów Unii Europejskiej — trzecie (ok. 5%). Większość produkcji tego gatunku (ok. 80%) skupiona jest w USA, Argentynie oraz Kanadzie, ale największym importerem są Chiny (Rosiak 2004). Nasiona roślin oleistych, w tym soi, z racji swojego składu chemicznego, są w czasie magazynowania bardziej podatne na pogorszenie jakości niż ziarna zbóż. Problem związany jest z aktywnością życiową wniesionych z surowcem grzybów, które zwłaszcza w czasie długoterminowego przechowywania uaktywniają się w stosunku do najbardziej dostępnego związku chemicznego, stanowiącego źródła węgla. W przypadku nasion roślin oleistych jest nim tłuszcz roślinny. W czasie przechowywania w nieodpowiednich warunkach nasiona soi mogą być atakowane przez różne drobnoustroje, przy czym kserofilne i kserotolerancyjne grzyby o zdolności do biosyntezy egzoenzymów lipolitycznych mogą odgrywać kluczową rolę w biodeterioracji tego surowca. Wielu autorów zajmowało się określaniem składu jakościowego i/lub ilościowego grzybów zasiedlających nasiona soi (El-Kady i Youssef 1993, Roy i in. 2000, Bhattacharya i Raha 2002, Kacaniova 2003, Nazir 2003, Brogii i in. 2007, Medic-Pap i in. 2007, Haikal 2008), przy czym większość z nich do wyodrębniania grzybów stosowała zazwyczaj podłoże PDA i temperaturę 25°C. W dostępnej literaturze nie znaleziono prac, w których badano występowanie korelacji między cechami jakościowymi nasion soi a stopniem ich zasiedlenia przez grzyby.

Celem pracy było określenie cech jakościowych i zasiedlenia przez grzyby nasion soi. Podjęto również próbę zbadania zależności pomiędzy wybranymi cechami jakościowymi nasion soi a stopniem ich zasiedlenia przez grzyby.

Material i metody

Materiał badawczy stanowiły nasiona soi o potencjalnie zróżnicowanym stopniu zasiedlenia ich przez grzyby. 4 próby pochodziły z Zakładu Uprawy Roli i Roślin Katedry Agronomii Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (odmiany: Augusta, Mazowia i 2 próby odmiany Aldana), zaś pozostałe z sieci handlowej Szczecina: 4 próby z Kanady, 3 próby z Chin oraz 4 próby nieznanego pochodzenia, łącznie 15 prób o masie 3 kg każda. W czasie od pobrania prób do wykonania analiz przechowywano je w warunkach chłodniczych w temperaturze 5°C. Charakterystyka nasion obejmowała określenie: masy tysiąca nasion (Krełowska-Kułas 1993), ciężaru objętościowego (PN-ISO 7971-2), ilości zanieczyszczeń mineralnych i organicznych, w tym ziarna innych gatunków oraz niewykształcone lub uszkodzone; nie wyodrębniono jednak zawartości poszczególnych grup zanieczyszczeń, lecz traktowano je wszystkie jako zanieczyszczenia ogółem (Krełowska-Kułas 1993), wartości pH nasion metodą potencjometryczną przy pomocy wodoszczelnego pehametru typ CPC-401 firmy Elmetron, wilgotności nasion metodą suszarkową (Krełowska-Kułas 1993), pomiaru aktywności wody (a_w) nasion przy pomocy miernika aktywności wody firmy Decagon DE 202 Aqua Lite (PN-ISO 21807:2005), zawartości tłuszczu w nasionach metodą Soxhleta (Krełowska-Kułas 1993) i kwasowości tłuszczu (PN-ISO 729:1999). Na podstawie otrzymanych danych wyliczono również wilgotność krytyczną nasion (Tys 2006).

Na nasionach nie występowały objawy zewnętrzne wskazujące na ich zasiedlenie przez grzyby. W celu określenia liczby kolonii grzybów zasiedlających nasiona wykonywano posiewy metodą rozcieńczeń (PN-EN ISO 6887-1:2000). Celem dokładnej oceny liczby kolonii grzybów wykorzystano trzy pożywki agarowe i trzy temperatury hodowli:

- 1) RBA (Rose Bengal Agar) o pH 7,2 (Samson i in. 2000) w 25°C,
- 2) YpSs (Yeast Powder Soluble Starch Agar) o pH 7,0 w 37°C i 45°C w celu wyodrębnienia grzybów, odpowiednio mezofilnych oraz termofilnych i termotolerancyjnych (Del Fratte i Caretta 1990),
- 3) DG 18 (Dichloran Glicerol (DG18) Agar) o pH 5,6 (Samson i in. 2000) w 25°C do wyizolowania grzybów kserotolerancyjnych i kserofilnych.

Do wszystkich pożywek dodawano chloramfenikol w ilości 100 mg/1000 cm³ pożywki (Samson i in. 2000) i sterylizowano je w autoklawie (121°C, 20 minut). Posiewy wykonywano w trzech powtórzeniach. Liczbę kolonii grzybów przedstawiono jako jednostki tworzące kolonie w 100 g nasion (jtk·100 g⁻¹).

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem arkusza kalkulacyjnego Excel oraz programu Statistica 8.0 (StatSoft) w środowisku Windows. Statystyczną istotność różnic określano przy poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Wyniki

Cechy jakościowe nasion soi przedstawiono w tabeli 1. Najmniejsze współczynniki zmienności stwierdzono dla pH nasion, ciężaru objętościowego i zawartości tłuszczu (odpowiednio 0,01; 0,06 i 0,08), natomiast największe dla ilości zanieczyszczeń i kwasowości tłuszczu (odpowiednio 0,59 i 1,0).

Tabela 1

Cechy jakościowe nasion soi — *Qualitative characteristics of soybean*

Cechy nasion <i>Sedes features</i>	Średnia <i>Average</i>	Minimum <i>Minimum</i>	Maksimum <i>Maximum</i>	Współczynnik zmienności <i>Coefficient of variation</i>
Masa tysiąca nasion [g] <i>Thousand seed weights</i>	171,24	113,67	234,10	0,19
Ciężar objętościowy [kg·hl ⁻¹] <i>Volumetric weight</i>	27,49	26,25	33,03	0,06
Zanieczyszczenia [%] <i>Impurities</i>	0,89	0,23	2,43	0,80
pH	6,52	6,36	6,66	0,01
Wilgotność — <i>Moisture</i> [%]	9,90	7,87	11,78	0,13
Aktywność wody [a _w] <i>Water activity</i>	0,61	0,51	0,70	0,11
Zawartość tłuszczu [%] <i>Fat content</i>	16,92	15,09	19,48	0,08
Kwasowość tłuszczu* [%] <i>Fat acidity*</i>	0,45	0,09	1,05	0,51

* w przeliczeniu na procentową zawartość kwasu oleinowego
calculated as percentage value of oleic acid

W tabeli 2 przedstawiono statystycznie istotne zależności pomiędzy cechami jakościowymi nasion. Najsilniejsza, dodatnia korelacja (0,99) wystąpiła pomiędzy wilgotnością nasion a ich aktywnością wody a_w. Udowodniono również dodatnią korelację pomiędzy wilgotnością nasion a kwasowością tłuszczu (0,70). Pomiedzy zawartością tłuszczu w nasionach a ich wilgotnością krytyczną stwierdzono ujemną korelację (-0,87). Współczynnik determinacji wahał się od 0,49 do 0,97.

Pomiedzy próbami nasion soi zróżnicowanie w liczbie uzyskanych kolonii grzybów było znaczące (tab. 3). Różnice te spowodowane były prawdopodobnie między innymi warunkami termiczno-wilgotnościowymi, panującymi w czasie transportu i późniejszego przechowywania nasion w punktach sieci detalicznej. Możliwe jest też, że już warunki panujące podczas wegetacji roślin miały wpływ na liczbę grzybów zasiedlających nasiona.

Tabela 2

Statystycznie istotne zależności pomiędzy cechami jakościowymi nasion soi
Statistically significant correlations between the quality characteristics of soybean

Badane cechy <i>Investigated features</i>	Współczynnik korelacji <i>Correlation coefficient</i>	Równanie regresji <i>Regression equation</i>	Współczynnik determinacji <i>Coefficient of determination</i>
a_w nasion — wilgotność <i>Water activity of seed — moisture</i>	0,99	$y = 2,852 + 1,026$	0,97
Zawartość tłuszczu — wilgotność krytyczna <i>Fat content — critical moisture</i>	-0,87	$y = -0,239x + 3,253$	0,75
Wilgotność nasion — kwasowość tłuszczu <i>Moisture content in seeds — fat acidity</i>	0,70	$y = 0,8928x - 1,765$	0,49

Tabela 3

Liczba kolonii grzybów wyrosłych z nasion soi na określonych pożywkach i temperaturze inkubacji — *Number of colonies of fungi from soybean depending on the type of the medium and the incubation temperature*

Pożywka i temperatura inkubacji <i>Medium and the temperature of the incubation</i>	Średnia <i>Average</i>	Minimum <i>Minimum</i>	Maksimum <i>Maximum</i>	Współczynnik zmienności <i>Coefficient of variation</i>
	jtk (jednostki tworzące kolonie) · 100 g ⁻¹ <i>cfu (colony forming unit) 100 g⁻¹</i>			
RBC, 25°C	$4,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^5$	3,71
DG18, 25°C	$1,4 \times 10^5$	$3,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^6$	2,39
YpSs, 37°C	$3,2 \times 10^2$	$2,5 \times 10^1$	$1,6 \times 10^3$	1,26
YpSs, 45°C	$1,3 \times 10^2$	$2,5 \times 10^1$	$5,7 \times 10^2$	1,19

Największe różnice stwierdzono w występowaniu grzybów mezofilnych wyizolowanych na podłożu RBA w 25°C (od $1,0 \times 10^2$ do $6,0 \times 10^5$ jtk · 100 g⁻¹), zaś najmniejsze na pożywce YpSs w 37°C (od $2,5 \times 10^1$ do $1,6 \times 10^3$ jtk · 100 g⁻¹). Największą liczbę kolonii grzybów ($1,4 \times 10^5$ jtk · 100 g⁻¹) uzyskano na podłożu DG18 w 25°C — były to gatunki kserofilne.

Zależności między cechami jakościowymi nasion soi a ich zasiedleniem przez grzyby przedstawiono w tabeli 4. Stwierdzono ujemną, statystycznie istotną korelację pomiędzy masą tysiąca nasion a występowaniem grzybów termofilnych wyrosłych na YpSs w 45°C. Zaobserwowano istotną statystycznie, wprost proporcjonalną korelację pomiędzy kwasowością tłuszczu a występowaniem grzybów mezofilnych i kserofilnych wyrosłych w 25°C na pożywkach RBA i DG18. Wykazano istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy wilgotnością nasion a liczbą grzybów kserofilnych wyizolowanych na pożywce DG18 w 25°C,

wskazującą, że im wyższa była wilgotność nasion, tym większe występowanie grzybów. Statystycznie istotną, odwrotnie proporcjonalną zależność wykazano także pomiędzy aktywnością wody nasion a występowaniem grzybów mezofilnych wyrosłych na pożywce YpSs w 37°C.

Tabela 4

Współczynniki korelacji pomiędzy liczbą kolonii grzybów wyizolowanych na różnych pożywkach a cechami jakościowymi nasion soi — *Correlation coefficients between the number of colonies of fungi isolated on different media and quality characteristics of soybean*

Cechy nasion <i>Seeds features</i>	Współczynniki korelacji w zależności od pożywki i temperatury inkubacji <i>Coefficients of variation depending on medium and the temperature of the incubation</i>			
	RBA (25°C)	DG18 (25°C)	YpSs (37°C)	YpSs (45°C)
Masa tysiąca nasion <i>Thousand seed weights</i>	-0,27	-0,0	-0,10	-0,55*
Ciężar objętościowy <i>Volumetric weight</i>	-0,06	0,19	0,23	-0,14
Zanieczyszczenia <i>Impurities</i>	-0,12	-0,29	0,15	0,37
pH	-0,39	-0,08	-0,31	-0,27
Wilgotność — <i>Humidity</i>	0,40	0,53*	-0,51	-0,31
Aktywność wody <i>Water activity</i>	0,33	0,48	-0,53*	-0,29
Zawartość tłuszczu <i>Fat content</i>	-0,05	-0,02	0,38	-0,06
Kwasowość tłuszczu <i>Fat acidity</i>	0,60*	0,72*	-0,35	-0,08

* korelacje statystycznie istotne dla $p < 0,05$
correlations statistically significant at $p < 0.05$

Dyskusja

Badania prowadzone w Indiach wykazały, że podczas przechowywania nasion w punktach sprzedaży (marketach) są one bardzo podatne na atak grzybów. Fakt ten przyczynia się do zdecydowanego pogorszenia jakości nasion, między innymi utraty zdolności kiełkowania, co stanowi poważny problem ekonomiczny. Ponadto zarodniki grzybów, uwalniane do powietrza pomieszczeń przechowalniczych, stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia pracowników (Bhattacharya i Raha 2002). Obszerną przeglądową pracę na temat grzybów zasiedlających nasiona, łodygi i kwiaty soi rosnącej w Ameryce Północnej przedstawili Roy i in.

(2000). Badacze ci do wyodrębniania grzybów wykorzystali podłoże PDA i temperaturę 24°C. Z kolei Kacaniova (2003) za cel swoich badań postawiła monitorowanie składu ilościowego i jakościowego grzybów obecnych w próbkach nasion soi w Słowacji. Grzyby izolowała na podłożu Czapek-Dox Agar w 25°C. Wyodrębnianiem grzybów z nasion soi w Pakistanie zajmował się Nasir (2003), który wykorzystywał również pożywkę PDA, a hodowlę prowadził w temperaturze 25°C. Sorour i Uchino (2004) badali natomiast wpływ temperatury (od 15° do 30°C) podczas przechowywania nasion soi o wilgotności od 18% do 26% na liczebność drobnoustrojów oraz proces pogarszania się jakości nasion. Wymienieni badacze w swych pracach do wyodrębniania grzybów stosowali najczęściej jedną pożywkę agarową, a inkubacje prowadzili w jednej temperaturze. W niniejszej pracy do izolowania grzybów z nasion soi wykorzystano natomiast trzy pożywki: RBA (Rose Bengal Agar) o pH 7,2 (Samson i in. 2000), YpSs (Yeast Powder Soluble Starch Agar) o pH 7,0 oraz DG 18 (Dichloran Glicerol Agar) o pH 5,6 (Samson i in. 2000) w 25°C. Hodowle prowadzono w temperaturach 25, 37 i 45°C. Pozwoliło to na wyodrębnienie grzybów mezofilnych, termotolerancyjnych i kserofilnych. W dostępnej literaturze nie znaleziono jednak publikacji, które wskazywałyby na korelacje między jakością nasion a występowaniem na nich grzybów.

Badania własne wykazały, że nasiona soi charakteryzowały się najmniejszym zróżnicowaniem próbek w zakresie ciężaru objętościowego oraz zawartości tłuszczu (współczynnik zmienności wynosił odpowiednio 0,06 i 0,08). Największe różnice między próbkami nasion soi stwierdzono w ilości zanieczyszczeń i kwasowości tłuszczu (współczynnik zmienności wynosił odpowiednio 0,08 i 0,51). Najmniejszym współczynnikiem zmienności (1,26) charakteryzowała się liczba uzyskanych kolonii grzybów mezofilnych na pożywce YpSs w 37°C. Najwięcej grzybów wyizolowano w temperaturze 25°C na pożywce polecanej do wyodrębniania grzybów kserofilnych, jaką jest DG18 (średnio $1,4 \times 10^5$ jtk·100 g⁻¹).

Stwierdzono ujemną, statystycznie istotną korelację między wartością pH nasion a występowaniem grzybów oraz dodatnią, statystycznie istotną korelację między występowaniem grzybów a kwasowością tłuszczu. Zależność ta sugeruje, że wzrost kwasowości tłuszczu może być wskaźnikiem zasiedlenia nasion soi przez grzyby.

Wnioski

1. Najmniejsze zróżnicowanie prób nasion soi występowało w zakresie ciężaru objętościowego oraz zawartości tłuszczu, zaś największe różnice stwierdzono w zawartości zanieczyszczeń i kwasowości tłuszczu.
2. Największą liczbę kolonii grzybów wyizolowano w temperaturze 25°C na pożywce DG18 – były to gatunki kserofilne.

3. Stwierdzono ujemną, istotną korelację między wartością pH nasion a występowaniem grzybów oraz dodatnią istotną zależność między występowaniem grzybów a kwasowością tłuszczu.
4. Otrzymane wyniki sugerują, że wzrost kwasowości tłuszczu może być wskaźnikiem zasiedlenia nasion przez grzyby.

Literatura

- Bhattacharya K., Raha S. 2002. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. *Mycopathologia*, 155: 135-141.
- Broggi L.E., Gonzales H.H.L., Resnik S.L., Pacin A. 2007. *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Rios, Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.*, 24: 47-51.
- Del Fratte G., Caretta G. 1990. Fungi isolated from Antarctic material. *Polar Biol.*, 11, 1-7.
- El-Kady IA., Youssef M.S. 1993. Survey of mycoflora and mycotoxins in Egyptian soybean seeds. *J. Basic Microb.*, 33 (6): 371-378.
- Haikal N.Z. 2008. Effect of filtrates of pathogenic fungi of soybean on seed germination and seedling parameters. *J. Appl. Sci. Res.*, 4 (1): 48-52.
- Kacaniova M. 2003. Feeding soybean colonization by microscopic fungi. *Trakya Univ. J. Sci.*, 4 (2): 165-168.
- Krełowska-Kułas M. 1993. Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa.
- Medić-Pap S., Milošević M., Jasnić S. 2007. Soybean seed-borne fungi in the Vojvodina province. *Phytopathol. Pol.*, 45: 55-65.
- Nasir N. 2003. Detecting seed borne fungi of soybean by different incubation methods. *Pakistan Journal of Plant Pathology* 2 (2): 114-118.
- PN 87/A-86906. Tłuszcze roślinne jadalne. Surowe oleje roślinne.
- PN 68/R-74017. Ziarno zbóż i nasiona strączkowe jadalne. Oznaczanie masy 1000 ziaren.
- PN-EN ISO 658:2004. Nasiona oleiste. Oznaczanie zawartości zanieczyszczeń.
- PN-EN ISO 659:1999. Nasiona oleiste. Oznaczanie zawartości oleju (metoda odwoławcza).
- PN-ISO 21807:2005. Mikrobiologia pasz i żywności. Określanie aktywności wody.
- PN-ISO 7218:1998/A1:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Ogólne zasady badań mikrobiologicznych.
- PN-ISO 729:1999. Nasiona oleiste. Oznaczanie kwasowości oleju.
- PN-ISO 7971-2:1998. Ziarno zbóż. Oznaczanie gęstości w stanie zsypanym, zwanej „masą hektolitra”. Metoda rutynowa.
- Rosiak E. 2004. Produkcja roślin oleistych. Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej, Wyd. Fundusz Współpracy Warszawa.
- Roy K.W., Baird R.E., Abney T.S. 2000. A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod and flower mycoflora in North America, with methods and a key for identification of selected fungi. *Mycopathologia*, 150: 15-27.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. 2000. Introduction to food – and airborne fungi. Sixth ed, Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Tys J. 2006. Rzepak Zbiór, suszenie, przechowywanie. Wyd. Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego, Lublin.