

FREQUENTED SPECIES OF FIELD FUNGI ON WHEAT AND THEIR POTENTIAL PRODUCTION OF TOXIC METABOLITES

Zuzana Mašková, Dana Tančinová, Zuzana Barboráková, Michal Mokry

ABSTRACT

The aim of this study was to monitor isolates of *Alternaria* and *Fusarium* species, isolated from Slovak wheat grains in 2006 – 2008, for ability to produce mycotoxins and to estimate a potential contamination risk of wheat grains by mycotoxins. Toxinogenicity of isolates was analyzed by means of thin layer chromatography (TLC) and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). A total of 302 *Alternaria* species (*A. alternata*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. tenuissima*) were tested by TLC method and a total of 238 *Fusarium* species (*F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *F. verticillioides*) were analyzed by TLC as well as LC/MS/MS method. All *Alternaria* sp. strains, excepting *A. infectoria* strains, showed high potentiation to produce altenuen, alternariol and alternariol monomethylether. None of *A. infectoria* species strains produced any mycotoxins analyzed in this study. *Fusarium* sp. strains demonstrated, according to toxicology specificity, ability to produce trichothecenes (deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, fusarenone X, HT-2 toxin, monoacetoxyscirpenol, neosolaniol, nivalenol, T-2 toxin), fumonisins, zearalenones, moniliformine and rarely mentioned toxins as aurofusarine, beauvericine, enniatins, equisetin and chlamydo sporol. High potential production of mycotoxins and wide spectrum of toxic metabolites represent high risk of toxins production in real field conditions.

Keywords: *Alternaria*, *Fusarium*, mycotoxin, wheat

ÚVOD

Mikrobiologická kvalita pšenice má priamy vplyv na konečnú kvalitu mlynských produktov. Múky s väčším mikrobiálnym zastúpením pochádzajú prednostne zo pšenice nižšej mikrobiologickej kvality (Berghofer et al., 2002). Kolonizácia obilnín mikroorganizmami začína už pri klíčení. Baktérie sú obvyčajne prvými kolonizátormi, ale veľmi skoro ich nasledujú kvasinky a vláknité mikroskopické huby. Mikromycéty pokračujú vo vývoji počas rastu rastliny, zvlášť pri dozrievaní semien. Následne žatva výrazne narúša ekosystém zrna. Zrno sa dostáva z premenlivého prostredia klasu do relatívne stáleho prostredia skladu. Tento proces sprevádza značná zmena v zložení mikrocenózy (Lacey, 1989). Suvedeným súvisia dve tradične rozoznávané ekologické skupiny vláknitých mikroskopických húb, ktoré osídľujú obilné zrná – poľné a skladové huby (Pitt et Hocking, 1999; Jesenská, 1987). Poľné huby si pre svoj rast vyžadujú ľahko prístupnú vodu a naopak skladové huby sú schopné rásť v podmienkach s nízkou aktivitou vody (Magan et Lacey, 1988). Medzi poľné huby zaradujeme *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Cephalosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp., *Nigrospora* sp., *Phoma* sp. a ďalšie. Ak sa zrno po žatve vysuší čo najrýchlejšie, nie sú tieto poľné huby schopné ďalej rásť. Len niektoré z nich prežívajú v dormantnom štádiu a znovu vyklíčia po zasiatí zrna do pôdy (Jesenská, 1987). Ich nežiaduce produkty - mykotoxíny však zostávajú v zrnách. Navyše niektoré z nich sú vysoko stabilné a ich koncentrácie sa nemenia ani po technologickom spracovaní pšeničných zrn (Weidenbörner, 2001). Obilniny a olejnaté semená vo všeobecnosti patria medzi najvhodnejšie substráty pre tvorbu mykotoxínov (Weidenbörner, 2001). Spôsobujú redukciu ich kvality, znižujú klíčivosť i nutričné

vlastnosti (Medina et al., 2006; Ramos et al., 1998; Samson et al., 2002a).

Štúdiá týkajúca sa sledovania mikrocenózy pšenice slovenského pôvodu ukázala pomerne vysoké zastúpenie izolátov poľných mikromycét rodov *Alternaria* a *Fusarium*, a to v povrchovej i endogénnej mykocenóze pšenice (Mašková, 2010). Ich vysoké počty spôsobujú znepokojenie predovšetkým kvôli ich potenciálnym toxínogénnym vlastnostiam. Je známych vyše 70 alternáriových metabolitov rôznej štruktúry a biologickej aktivity. Ich toxicita doteraz nebola preštudovaná do takej miery ako u iných rodov, ako sú napríklad *Fusarium* alebo *Aspergillus* (Chielkowski et Visconti, 1992). Jednotlivé štúdie však odhadujú, že okolo 68 % alternáriových kmeňov je toxických. Výsledky toxikologického hodnotenia jednotlivých alternáriových mykotoxínov sú zamerané hlavne na akútnu toxicitu, mutagenitu a karcinogenitu. Ich mykotoxíny však nie sú významne akútne toxické, a preto im je venovaná nižšia pozornosť (Schrader et al., 2001). Najdôležitejšie toxíny produkované rodom *Alternaria* kontaminujúce potraviny sú alternárioly, altenuény, altertoxíny a kyselina tenuazónová, ktorých produkcia je privilegovaná vysokou vlhkosťou a daždivým počasím pred zberom a to v relatívne vysokých množstvách (Weidenbörner, 2001). Izoláty rodu *Fusarium* sú bohatým zdrojom širokej palety bioaktívnych sekundárnych metabolitov, trichotecénov, zearalenonov a fumonizínov a v posledných rokoch vstúpili do pozornosti i mnohé ďalšie dôležité mykotoxíny, ako sú moniliformín, enniatíny, beauvericín a fuzaproliferín (Sorensen, 2009). Diaz (2005) uvádza, že v globálnom meradle sú práve fuzáriové mykotoxíny ekonomicky najvýznamnejšie mykotoxíny v potravinách a krmivách.

Autori Andersen et Thrane (2006) pokladajú výskyt špecifických alternáriových a fuzáriových metabolitov a ich potenciálnu toxicitu za vážny problém a do budúcnosti ho

považujú za hlavnú výzvu pre mykológov. Z toho dôvodu bolo cieľom predkladanej štúdie sledovať schopnosť izolátov rodov *Alternaria* a *Fusarium* produkovať sekundárne toxické metabolity a tak odhadnúť potenciálne riziko kontaminácie pšeničných zŕn mykotoxínmi. Štúdia by mala zároveň poskytnúť prehľad o potencii izolátov z našich komodít produkovať určité mykotoxíny a nasmerovať ich sledovanie aj v podmienkach *in vivo*.

MATERIÁL A METODIKA

Izoláty poľných mikroskopických húb rodov *Alternaria* a *Fusarium* (Tabuľka 1), testované v predkladanej štúdii na potenciálnu schopnosť produkcie vybraných mykotoxínov, boli izolované z endogénnej a exogénnej mykobioty pšenice (*Triticum aestivum* L.) slovenského pôvodu v rokoch 2006 až 2008, podľa metodiky **Mašková (2010)**. Vzorky pšenice pochádzali zo všetkých krajov Slovenska (s výnimkou Košického kraja) a izoláty boli získané výlučne z asymptomatických zŕn.

Vybrané izoláty uvedených rodov boli naočkované na platne s YES agarom (kvasničný agar so sacharózou) (**Samson et al., 2002a**) a kultivované v tme pri teplote 25 ± 1 °C po dobu 7 dní. V prípade nejasného, alebo

negatívneho výsledku bola kultivácia predĺžená na 14 dní. Vyrastené kolónie boli použité na analýzu toxigenity, t. j. schopnosť produkovať vybrané mykotoxíny kvalitatívnou metódou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) a ich kvantitatívne stanovenie pomocou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS).

Kvalitatívne stanovenie mykotoxínov TLC metódou

Kvalitatívne analýzy toxigenity vybraných izolátov TLC metódou boli prevedené podľa metodiky **Samson et al. (2002b)** s modifikáciou podľa **Labuda et Tančinová (2006)**. Z narastených kolónií boli aj so živnou pôdou vykrojené štvorce o približnej veľkosti 2 cm x 2 cm a v malých kúskoch vložené do Eppendorfovej skúmavky spolu s 0,5 ml extrakčného činidla. Obsah skúmaviek bol po dobu 5 minút miešaný rýchlosťou číslo 7 pomocou prístroja Vortex Genie® 2 (MO BIO Laboratories, Inc. – Carlsbad, CA). Získané extrakty boli nanesené na chromatografickú platňu so silikagélom (Alugram®SIL G, Macherey – Nagel, Nemecko) a následne ponorené do vyvíjacej sústavy. Identita stanovených mykotoxínov bola potvrdená porovnaním so štandardmi mykotoxínov. Analyzované mykotoxíny a použité metodiky sú uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 1 Kmene rodov *Alternaria* a *Fusarium*, testované metódami tenkovrstvovej chromatografie (TLC) a kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS) na produkciu vybraných mykotoxínov (v zátvorkách sú uvedené počty testovaných kmeňov)

Metóda	Testované kmene
TLC (446)	<i>Alternaria alternata</i> (9), <i>A. arborescens</i> (21), <i>A. infectoria</i> (136), <i>A. tenuissima</i> (133), <i>Alternaria alternata / arborescens</i> (1), <i>Alternaria</i> sp. (2), <i>Fusarium acuminatum</i> (2), <i>F. avenaceum</i> (28), <i>F. crookwellense</i> (1), <i>F. culmorum</i> (8), <i>F. equiseti</i> (1), <i>F. graminearum</i> (48), <i>F. langsethiae</i> (1), <i>F. poae</i> (33), <i>F. semitectum</i> (1), <i>F. sporotrichioides</i> (17), <i>F. tricinctum</i> (4)
LC/MS/MS (94)	<i>Fusarium acuminatum</i> (2), <i>F. avenaceum</i> (2), <i>F. crookwellense</i> (1), <i>F. culmorum</i> (6), <i>F. equiseti</i> (1), <i>F. graminearum</i> (2), <i>F. langsethiae</i> (1), <i>F. oxysporum</i> (1), <i>F. poae</i> (57), <i>F. proliferatum</i> (10), <i>F. semitectum</i> (1), <i>F. solani</i> (1), <i>F. sporotrichioides</i> (2), <i>F. subglutinans</i> (2), <i>F. tricinctum</i> (4), <i>F. verticillioides</i> (1)

Tabuľka 2 Extrakčné činidlá, vyvíjacie sústavy a spôsoby vizualizácie použité pri analýze vybraných mykotoxínov metódou tenkovrstvovej chromatografie

Mykotoxín	Extrakčné činidlo	Vyvíjacia sústava	Spôsob vizualizácie
altenuén	ch:m	TEF	UV svetlo s vln. dĺžkou 254 a 366 nm
alternáriol monometyléter	ch:m	TEF	UV svetlo s vln. dĺžkou 254 a 366 nm
alternáriol	ch:m	TEF	UV svetlo s vln. dĺžkou 254 a 366 nm
deoxynivalenol	ch:m	TAM	20 % AlCl ₃ v 60 % etanole, zahriatie
diacetoxyscirpenol	ch:m / a:w	TAM	20 % AlCl ₃ v 60 % etanole, zahriatie, 20 % H ₂ SO ₄ vo vode, zahriatie
HT-2 toxín	a:w	TAM	20 % H ₂ SO ₄ vo vode, zahriatie
moniliformín	a:w	BAW	MBTH v 1 % metanole, zahriatie
T-2 toxín	a:w	TAM	20 % H ₂ SO ₄ vo vode, zahriatie
zearalenon	ch:m / a:w	TAM	20 % AlCl ₃ v 60 % etanole, zahriatie, 20 % H ₂ SO ₄ vo vode, zahriatie

ch:m – chloroform : metanol (2:1) (**Samson et al., 2002a**); a:w – acetonitril : voda (50:50) (**Mubatanhema et al., 1999**); TEF – toluén : etylacetát : kyselina mravčia (5:4:1) (**Samson et al., 2002a**); TAM – toluén : acetón : metanol (5:3:2) (**Thrane, 1986**); BAW – butanol : kyselina octová : H₂O (20:10:7) (**Mubatanhema et al., 1999**); MBTH – 0,5 % metylbenzotiazolon-hydrochlorid vo vode (**Samson et al., 2002a**)

Kvantitatívne stanovenie mykotoxínov pomocou LC/MS/MS (kvapalinová chromatografia spojená s tandemovou hmotnostnou spektrometriou)

Kvantitatívne stanovenie bolo zamerané na mykotoxíny aurofuzarín (AUR), beauvericín (BEA), deoxynivalenol (DON), diacetoxyscirpenol (DAS), equisetín (EQU), fumonizíny B₁, B₂, B₃ (FUM B₁, B₂, B₃), fuzarenon-X (FX), HT-2 toxín (HT-2), moniliformín (MON), monoacetoxyscirpenol (MAS), neosolaniol (NEO), nivalenol (NIV), T-2 toxín (T-2) a zearalenon (ZEA). Extrakcia mykotoxínov (ako pri TLC metóde) bola vykonaná pomocou 0,5 ml roztoku chloroform : metanol (2:1), výdatným miešaním sústavy po dobu 5 min na vortexe (V1 plus, Boeco, Nemecko), pričom surové extrakty boli následne prefiltrované a koncentrované vysušením pri teplote cca 60 °C. Pred samotnou detekciou bola vzorka (extrakt) zmiešaná s 1000 µl roztoku acetonitril : voda (1:1; v/v) a následne premiešaná na prístroji IKA MS1 Minishaker (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemecko). Filtrácia zriedeného extraktu do HPLC vialiek bola vykonaná pomocou filtrovacej striekačky (Minisart SRP 4 Satorius, Nemecko) o priemere 4 mm, s veľkosťou pórov 0,45 µm. Toxíny boli detegované a kvantifikované podľa metodiky Sulyok et al. (2006) na zariadení QTrap 4000 LC/MS/MS vybavenom TurboIonSpray ESI zdrojom a 1100 Series HPLC systémom. Chromatografická separácia bola vykonaná pri teplote 25 ± 1 °C na zariadení Gemini 5 µ C₁₈, 150 mm x 4,6 mm (Phenomenex, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Toxinogenita izolátov zistená pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC)

Celkom 302 kmeňov rodu *Alternaria* bolo pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) testovaných na produkciu altenuénu (ALT), alternáriolu monometyléru (AME) a alternáriolu (AOH) (Tabuľka 3). Najväčší počet testovaných kmeňov pochádzal zo skupín *A. infectoria* a *A. tenuissima*, a to z dôvodu ich vysokej frekvencie výskytu a relatívnej denzity na pšenici slovenského pôvodu, zistenej v predchádzajúcej štúdii (Mašková et Tančinová, 2009). Z celkového počtu 136 testovaných izolátov skupiny *A. infectoria* sa ani v jednom prípade nepotvrdila produkcia mykotoxínov ALT, AME a AOH. I podľa iných autorov sa táto skupina výrazne odlišuje od ostatných izolovaných skupín v produkcii sekundárnych metabolitov, pretože dodnes nimi nebola preukázaná produkcia nijakých známych mykotoxínov (Andersen et al. 2002; Andersen et Thrane, 1996; Labuda et al, 2008; Piovarčiová et al., 2007; Pitt et Hocking, 1997). Pravdou však je, že donedávna bolo metabolitom rodu *Alternaria*, a špeciálne skupiny *A. infectoria*, venované len málo pozornosti. Až v poslednej dobe sa objavili publikácie o možných toxických účinkoch niektorých jej menej známych metabolitov, ktoré uvádzajú Larsen et al. (2003) a Christensen et al. (2005). Podľa nich sa jedná o možné fytotoxíny a potenciálne mykotoxíny. Ivanova et al. (2010) ďalej odhalili spojitosť niektorých produktov izolátov skupiny *A. infectoria* (kyselina linolová, kyselina α-linolénová, pyrón) s cytotoxicitou. Testované izoláty skupiny *A. tenuissima* sa ukázali ako

vysoko toxinogénne a z počtu 133 izolátov len 1 neprodukoval žiadny z testovaných mykotoxínov. Všetky ostatné kmene produkovali minimálne 1 mykotoxín. U niektorých kmeňov sa prejavila pomalšia produkcia ALT a na 7. deň nebola na TLC platniach zistená jeho prítomnosť. V takých prípadoch bola kultivácia predĺžená a analýza toxinogenity zopakovaná. Naopak produkcia AOH a AME bola obvyčajne viditeľná už na 7. deň. Izoláty skupín *A. alternata* a *A. arborescens* taktiež preukázali vysokú schopnosť produkcie sledovaných toxických metabolitov. Z celkového počtu 9 izolátov skupiny *A. alternata* len 1 kmeň neprejavil schopnosť produkovať žiadny zo sledovaných mykotoxínov a 1 kmeň neprodukoval AOH, ale tvoril ostatné toxíny. Botalico et Logrieco (1992) uvádzajú, že podľa ich výskumov je *A. alternata* schopná produkovať veľké množstvá toxínov a uvádzajú, že jej prirodzený výskyt v obilninách predstavuje skutočné riziko. Čo sa týka skupiny *A. arborescens*, z počtu 21 izolátov sa všetky kmene prejavili ako toxinogénne. Len jediný izolát neprodukoval ALT, no tvoril AME a AOH.

Rozšírený výskyt alternárií na pšenici a ich schopnosť produkovať mykotoxíny poukazuje zároveň na možnú prítomnosť toxínov v pšenici, prirodzene infikovanej touto hubou. Údajov o prítomnosti týchto toxických látok na pšenici je však veľmi málo. Na jednej strane autori Chielkowski et Visconti (1992) a Medina et al. (2006) uvádzajú, že alternárioly a ostatné alternáriové toxíny boli na zrnách detegované len zriedkavo, na druhej strane Ostrý et al. (2005) vo svojej štúdii zistili prítomnosť ALT vo všetkých testovaných vzorkách pšenice a AOH v 28,6 % vzoriek. Značný výskyt týchto toxínov na obilninách, vrátane pšenice, uvádzajú aj Scott (2001) a Webley et al. (1997).

Tabuľka 3 Produkcia vybraných mykotoxínov testovanými kmeňmi rodu *Alternaria*, izolovanými zo pšenice slovenského pôvodu na kvasničnom agare so sacharózou (YES), zistená metódou tenkovrstvovej chromatografie (v zátvorkách sú uvedené počty testovaných kmeňov)

Skupina	% pozitívnych testov		
	ALT ¹	AME ²	AOH ³
<i>A. alternata</i> (9)	88,9	88,9	77,8
<i>A. arborescens</i> (21)	95,2	100,0	100,0
<i>A. infectoria</i> (136)	0,0	0,0	0,0
<i>A. tenuissima</i> (133)	91,0	97,7	97,7
<i>A. alternata</i> / <i>arborescens</i> (1)	100,0	100,0	100,0
<i>Alternaria</i> sp. (2)	50,0	50,0	50,0

¹altenuén, ²alternáriol monometyléter, ³alternáriol

Medzi ďalších potenciálnych producentov mykotoxínov z radov poľných mikroskopických húb patria zástupcovia rodu *Fusarium*. Spolu 144 kmeňov, testovaných na prítomnosť diacetoxyscirpenolu (DAS), deoxynivalenolu (DON), HT-2 toxínu (HT-2), moniliformínu (MON), T-2 toxínu (T-2) a zearalenonu (ZEA), preukázalo pomerne vysokú schopnosť ich produkcie (Tabuľka 4).

Toxinogenita izolátov zistená pomocou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS)

Tabuľka 4 Produkcia vybraných mykotoxínov testovanými kmeňmi rodu *Fusarium*, izolovanými zo pšenice slovenského pôvodu na kvasničnom agare so sacharózou (YES) v rokoch 2006 až 2008, zistená metódou tenkovrstvovej chromatografie

Druhy	Počet testovaných kmeňov / % pozitívnych testov					
	DAS ¹	DON ²	HT-2 ³	MON ⁴	T-2 ⁵	ZEA ⁶
<i>F. acuminatum</i>	-	-	-	2 / 50,0	-	-
<i>F. avenaceum</i>	-	-	-	28 / 82,1	-	-
<i>F. crookwellense</i>	-	-	-	-	-	1 / 100,0
<i>F. culmorum</i>	-	-	-	8 / 0,0	-	8 / 50,0
<i>F. equiseti</i>	1 / 100,0	-	1 / 100,0	-	1 / 100,0	-
<i>F. graminearum</i>	-	10 / 0,0	-	-	-	48 / 72,9
<i>F. langsethiae</i>	1 / 100,0	-	1 / 100,0	-	1 / 100,0	-
<i>F. poae</i>	33 / 100,0	-	23 / 47,8	-	23 / 4,5	-
<i>F. semitectum</i>	-	-	-	1 / 0,0	-	1 / 0,0
<i>F. sporotrichioides</i>	17 / 47,1	-	1 / 100,0	16 / 62,5	17 / 88,2	-
<i>F. tricinctum</i>	-	-	-	4 / 100,0	-	1 / 0,0

¹diacetoxyscirpenol, ²deoxynivalenol, ³HT-2 toxín, ⁴moniliformín, ⁵T-2 toxín, ⁶zearalenon

Kvalitatívne testy poukazujúce na schopnosť vybraných kmeňov rodu *Fusarium* produkovať rôzne mykotoxíny boli doplnené o kvantitatívne analýzy metódou LC/MS/MS. Najväčšia pozornosť bola venovaná kmeňom druhov *F. poae*, *F. graminearum* a *F. avenaceum*, ktoré boli v predchádzajúcej štúdii (Mašková, 2010) vo vzorkách pšenice diagnostikované s najvyššou frekvenciou a zároveň s vysokou relatívnou denzitou v rámci tohto rodu. Celkom 57 kmeňov *F. poae* bolo analyzovaných na produkciu trichotecénov skupiny A a B, zearalenonu (ZEA), beauvericínu (BEA), fumonizínov (FUM) a aurofuzarínu (AUR), ktoré patria medzi ich najdôležitejšie metabolity (Moss et Thrane, 2004; Thrane et al., 2004; Desjardins, 2006). Práve produkciou B – trichotecénov sa *F. poae* chemicky odlišuje od blízkych príbuzných v sekcii *Sporotrichiella*, a to od druhov *F. sporotrichioides* a *F. langsethiae* (Torp et Nirenberg, 2004; Thrane et al., 2004). Ako vyplýva z Tabuľky 5, je zrejmé, že *F. poae* nepredstavuje výrazné riziko, pokiaľ ide o produkciu A – trichotecénov T-2 a HT-2 toxínov, avšak situácia je iná v prípade A – trichotecénov diacetoxyscirpenolu (DAS), monoacetoxyscirpenolu (MAS) a neosolaniolu (NEO), ktoré boli detegované v pomerne vysokých kvantitách.

Porovnateľné výsledky uvádzajú aj Thrane et al. (2004), ktorí zaznamenali produkciu T-2 a HT-2 toxínov len u malého percenta testovaných kmeňov z rôznych

oblastí Európy, pričom DAS a MAS produkovalo 46, resp. 45 zo 49 testovaných kmeňov. Z B – trichotecénov, izoláty *F. poae* testované v štúdiu autorov produkovali najčastejšie fuzarenon X (FX) (88 % kmeňov), zatiaľ čo nivalenol (NIV) bol produkovaný len 12 % kmeňov. V našej štúdiu síce FX produkovalo porovnateľne 88,7 % izolátov, no zároveň i počet producentov NIV bol pomerne vysoký (80 %). Všetky testované kmene boli zároveň schopné syntetizovať aurofuzarín (AUR) a beauvericín (BEA), čo uvádzajú i Logrieco et al. (2002) a Thrane (2001).

Izoláty druhu *F. graminearum* boli analyzované na schopnosť produkovať mykotoxíny uvedené v Tabuľke 6. V rámci štúdie boli testované 2 kmene na produkciu DON, no ich priemerné množstvo 37,1 µg.l⁻¹ bolo pomerne nízke. Navyše 10 kmeňov sa metódou TLC prejavilo negatívne. Je potrebné však brať na vedomie, že produkcia mykotoxínov je determinovaná nielen genetickými faktormi, ale aj podmienkami prostredia (Sudakin, 2003), ktoré sú ťažko ovplyvniteľné. Ďalším častým produktom tohto druhu je zearalenon (ZEA) (Bottalico et Perrone, 2002). Metódou TLC sa ukázala jeho pomerne častá produkcia testovanými izolátmi. Zo 48 kmeňov celkom 72,9 % syntetizovalo tento metabolit. Metódou LC/MS/MS boli sledované 2 kmene a 1 z nich sa ukázal ako vysoko produkčný (3 900,0 µg.l⁻¹). Okrem ZEA a DON Desjardins (2006) tiež uvádza ako možné produkty aurofuzarín (AUR) a chlamydošporol (CHS), no nestretol sa s produkciou beauvericínu (BEA)

Tabuľka 5 Produkcia vybraných mykotoxínov kmeňmi *Fusarium poae*, izolovanými zo slovenskej pšenice na kvasničnom agare so sacharózou (YES) v sezónach 2006 až 2008, zistená metódou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS)

Mykotoxín	Počet testovaných kmeňov	% pozitívnych testov	Množstvo vyprodukovaného mykotoxínu (µg.l ⁻¹)		
			priemer	minimum	maximum
aurofuzarín	9	100,0	1213,9	8,3	5050,0
beauvericín	57	100,0	537,9	3,6	1910,0
diacetoxyscirpenol	57	100,0	3153,9	2,7	15800,0
fuzarenon X	53	88,7	271,6	0,0	3690,0
monoacetoxyscirpenol	53	96,2	683,3	0,0	5540,0
neosolaniol	50	98,0	220,0	0,0	1460,0
nivalenol	5	80,0	375,7	0,0	1860,0
T-2 toxín	24	29,0	4,2	0,0	36,0

Tabuľka 6 Produkcia vybraných mykotoxínov kmeňmi druhu *Fusarium graminearum*, izolovanými zo pšenice slovenského pôvodu na kvasničnom agare so sacharózou (YES) v sezónach 2006 až 2008, zistená metódou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS)

Mykotoxín	Počet testovaných kmeňov	% pozitívnych testov	Množstvo vyprodukovaného mykotoxínu ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)		
			priemer	minimum	maximum
aurofuzarín	2	100,0	798,5	71,9	1525,1
diacetoxyscirpenol	2	100,0	37,1	22,4	51,7
equisetín	2	50,0	26450,0	0,0	52900,0
zearalenon	2	50,0	1950,0	0,0	3900,0

Tabuľka 7 Produkcia vybraných mykotoxínov kmeňmi druhu *Fusarium avenaceum*, izolovanými zo pšenice slovenského pôvodu na kvasničnom agare so sacharózou (YES) v sezónach 2006 až 2008, zistená metódou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS)

Mykotoxín	Počet testovaných kmeňov	% pozitívnych testov	Množstvo vyprodukovaného mykotoxínu ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)		
			priemer	minimum	maximum
aurofuzarín	2	100,0	177911,0	80595,0	275227,0
eniatín A	2	100,0	1170,0	9,9	2330,0
eniatín A ₁	2	100,0	3986,8	173,5	7800,0
eniatín B	2	100,0	1182,5	770,0	1595,0
eniatín B ₁	2	100,0	5035,0	1120,0	8950,0
eniatín B ₂	2	100,0	3267,5	235,0	6300,0
eniatín B ₃	2	100,0	80,0	2,5	157,5
chlamydosporol	2	100,0	19950,0	18050,0	21850,0
moniliformín	2	50,0	996,5	0,0	1993,0

a moniliformínu (MON). To súhlasí s našimi výsledkami, s výnimkou CHS, ktorý metódou LC/MS/MS u 2 testovaných kmeňov nebol detegovaný. Zaujímavá bola tvorba equisetínu (EQU), s ktorým sme sa stretli u 1 z 2 testovaných kmeňov, a to vo vysokom množstve (52 900,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). So syntézou EQU izolátmi *F. graminearum* sme sa v literatúre doteraz nestretli, no mohlo sa jednať aj o nežiaducu kontamináciu.

Tretím najfrekvencovanejším druhom vo vzorkách pšenice bolo *F. avenaceum*, ktoré je známe predovšetkým syntézou moniliformínu (MON). Jeho produkcia izolátmi *F. avenaceum* bola za posledných vyše 20 rokov potvrdená v Európe, Severnej Amerike a Južnej Afrike (Abramson et al., 2001; Morrison et al., 2002; Rabie et al., 1982). Z celkového počtu 28 izolátov testovaných TLC metódou sa na prítomnosť MON prejavilo pozitívne 82,1 %. LC/MS/MS metódou boli sledované len 2 kmene a MON tvoril iba jeden z nich (1993,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Podľa Bottalico et Perrone (2002) z výskumov vyplýva, že obsah MON v zrnách pšenice koreluje s výskytom izolátov tohto druhu. Ďalšími známymi metabolitmi *F. avenaceum* sú AUR, BEA, CHS a eniatíny (ENS) (Thrane, 2001). Uvedené látky, s výnimkou BEA, syntetizovali všetky nami testované kmene, a to v pomerne vysokých množstvách (Tabuľka 7). Preto i napriek tomu, že *F. avenaceum* neprodukuje trichotecény, zearalenony, alebo fumonizíny, mala by mu byť venovaná zvýšená pozornosť.

Zriedkavejšie alebo obyčajne len ojedinele vyskytujúce sa druhy fuzárií, ako sú *F. acuminatum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F.*

langsethiae, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum* a *F. verticillioides* (Mašková, 2010), samostatne síce nemusia vzbudzovať podozrenie na vysokú kontamináciu zrn toxickými metabolitmi, no spolu s ostatnými izolátmi iných druhov môžu prispievať k znižovaniu ich kvality a toxikologickej bezpečnosti. Andersen et Thrane (2006) uvádzajú, že viaceré druhy húb toho istého rodu, získané z jedného substrátu, môžu produkovať tie isté mykotoxíny (napr. trichotecény, produkované viacerými druhmi rodu *Fusarium* na obilninách). V Tabuľke 8 uvádzame metabolity, ktorých produkcia bola zaznamenaná pomocou LC/MS/MS. Tieto látky môžeme považovať za potenciálne kontaminanty pšenice. Rozdielny mykotoxikologický potenciál jednotlivých druhov, môže mať preto za následok prítomnosť širokého spektra mykotoxínov na obilninách.

Vzhľadom na to, že pri metóde LC/MS/MS neboli použité presné množstvá substrátu, uvedené výsledky nám nepodávajú definitívny údaj o potencii, ale slúžia skôr ako skríning. Táto metóda taktiež nezaručuje úplné vyextrahovanie požadovaných mykotoxínov v určitom čase, pretože môžu byť rôzne špecificky viazané, a preto môžeme predpokladať aj vyššie vyprodukované hladiny sledovaných mykotoxínov. Okrem toho podľa Andersen et Thrane (2006) je dôležité si uvedomovať, že mykotoxíny nakumulované v poľných podmienkach alebo v skorých obdobiach skladovania sú odolné voči skladovacím podmienkam i technologickému spracovaniu zrn počas výroby potravín, či krmív.

Tabuľka 8 Druhy rodu *Fusarium* a ich toxické metabolity, ktorých produkcia bola zistená pomocou LC/MS/MS, pri *in vitro* analýzách izolátov získaných zo pšenice

Druh	Potenciálny toxický metabolit
<i>F. acuminatum</i>	AUR ¹
<i>F. crookwellense</i>	AUR ¹ , ZEA ¹⁵
<i>F. culmorum</i>	AUR ¹ , DON ³ , ZEA ¹⁵
<i>F. equiseti</i>	BEA ²
<i>F. langsethiae</i>	AUR ¹ , DAS ⁴ , ENS ⁵ , CHS ¹⁰ , MAS ¹² , MON ¹¹
<i>F. oxysporum</i>	AUR ¹ , BEA ² , DAS ⁴ , DON ³ , HT-2 ⁹ , NEO ¹³ , T-2 ¹⁴
<i>F. proliferatum</i>	BEA ² , DAS ⁴ , EQU ⁵ , FUM ⁷ B ₁ , FUM ⁷ B ₂ , FUM ⁷ B ₃ , FX ⁸ , MAS ¹² , MON ¹¹ , NEO ¹³
<i>F. semitectum</i>	BEA ² , DAS ⁴ , HT-2 ⁹ , CHS ¹⁰ , MAS ¹² , NEO ¹³ , T-2 ¹⁴
<i>F. solani</i>	AUR ¹ , DON ³ , ZEA ¹⁵
<i>F. sporotrichioides</i>	AUR ¹ , BEA ² , CHS ¹⁰
<i>F. subglutinans</i>	AUR ¹ , BEA ² , DON ³ , ZEA ¹⁵
<i>F. tricinctum</i>	AUR ¹ , ENS ⁵ , CHS ¹⁰ , MON ¹¹
<i>F. verticillioides</i>	MON ¹¹

¹aurofuzarín, ²beauvericín, ³deoxynivalenol, ⁴diacetoxyscirpenol, ⁵enniatiíny, ⁶equisetín, ⁷fumonizín, ⁸fuzarenon-X, ⁹HT-2 toxín, ¹⁰chlamydosporol, ¹¹moniliformín, ¹²monoacetoxyscirpenol, ¹³neosolaniol, ¹⁴T-2 toxín, ¹⁵zearalenon

ZÁVER

Výsledky štúdie poukazujú na to, že zástupcovia poľných mikromycét rodov *Alternaria* a *Fusarium* na zrnách pšenice predstavujú reálne riziko prítomnosti mykotoxínov. Obilniny sa samozrejme len zriedkakedy využívajú na konzum v ich prirodzenom stave. Rôznymi spôsobmi sa spracovávajú a každý krok pri úprave pred spracovaním a mletím redukuje populácie mikroorganizmov. Avšak i napriek tomu je možný značný prenos mykotoxínov, pretože sú rezistentné na čistenie zrn, mletie, varenie, pečenie a iné technologické operácie.

Nami testované izoláty sa preukázali ako potenciálni producenti viacerých toxických metabolitov a vzhľadom na ich frekventovaný výskyt predstavujú vážne riziko kontaminácie pšeničných zrn nebezpečnými mykotoxínmi. Všetky izoláty rodu *Alternaria* analyzované v tejto štúdii (s výnimkou izolátov skupiny *A. infectoria*) sa preukázali ako vysoko toxigénne, t.j. produkujúce mykotoxíny alternáriol, alternáriol monometyléter a altenuén. Mykotoxíny rodu *Fusarium* sú už tradične spájané s obilninami mierneho pásma, čo sa potvrdilo i v našej štúdii. Najčastejšie sa vyskytujúce druhy na obilninách slovenského pôvodu (*F. avenaceum*, *F. graminearum* a *F. poae*) preukázali v podmienkach *in vitro* produkčný potenciál tvoriť trichotecény, zearalenony, fumonizíny a moniliformín. Okrem „tradičných“ mykotoxínov bolo množstvo analyzovaných kmeňov schopných produkovať aj iné sekundárne toxické metabolity, ktoré vstúpili do povedomia až v posledných rokoch. Bola zaznamenaná produkcia aurofuzarínu, beauvericínu, enniatiínov,

equisetínu, či chlamydosporolu. Až doposiaľ je o týchto metabolitoch a ich produkcii k dispozícii len obmedzené množstvo informácií, čo je spôsobené až ich neskorším zaradením medzi mykotoxíny.

Prevedené analýzy toxigenity extraktov z čistých kultúr mikromycét nám indikujú ich vysoký produkčný potenciál a poskytujú nám prehľad o širokom spektre produkovaných metabolitov. V záujme dosiahnutia bezpečnosti potravín na báze obilnín, je nevyhnutné venovať veľkú pozornosť mykotoxínom, detegovaným v predloženej práci v podmienkach *in vitro*.

LITERATÚRA

- ABRAMSON, D., CLEAR, R. M., GABA, D., SMITH, D. M., PATRICK, S. K., SAYDAK, D. 2001. Trichothecene and moniliformin production by *Fusarium* species from western Canadian wheat. In *Journal of Food Protection*, 2001, vol. 64, p. 1220-1225.
- ANDERSEN, B., KROGER, E., ROBERTS, R. G. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. In *Mycological Research*, 2002, vol. 106, p. 170-182.
- ANDERSEN, B., THRANE, U. 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. In *Canadian Journal of Microbiology*, 1996, vol. 42, p. 685-689.
- ANDERSEN, B., THRANE, U. 2006. Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. In *Hocking, A. D., Pitt, J. I., Samson, R. A., Thrane, U. 2006. Advances in Food Mycology*, 2006, vol. 571, p. 137-152.
- BERGHOFER, L. K., HOCKING, A. D., MISKELLY, D., JANSSON, E. 2002. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. In *International Journal of Food Microbiology*, 2002, vol. 85, p. 137-149.
- BOTTALICO, A., LOGRIECO, A. 1992. *Alternaria* plant diseases in Mediterranean countries and associated mycotoxins. In *Chelkowski, J., Visconti, A., 1992. Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Elsevier : London, 1992, 564 p. ISBN 0-444-88998-1.
- BOTTALICO, A., PERRONE, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. In *European Journal of Plant Pathology*, 2002, vol. 108, p. 611-624.
- DESJARDINS, A. E. 2006. *Fusarium Mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology*. St. Paul : The American Phytopathological Society, 2006, 260 p. ISBN 0-89054-335-6.
- DIAZ, D. 2005. *The mycotoxin Blue Book*. University Press : Nottingham, 2005, 349 p. ISBN 1-904761-19-4.
- CHIELKOWSKI, J., VISCONTI, A. 1992. *Alternaria – Biology, Plant Diseases and Metabolites*. London : Elsevier, 1992, 573 p. ISBN 0-444-88998-1.
- CHRISTENSEN, K. B., VAN KLINK, J. W., WEAVERS, R. T., LARSEN, T. O. ANDERSEN, B., PHIPPS, R. K. 2005. Novel chemotaxonomic markers of the *Alternaria infectoria* species-group. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, p. 9431-9435.
- IVANOVA, L., PETERSEN, D., UHLIG, S. 2010. Phomenins and fatty acids from *Alternaria infectoria*. In *Toxicon*, 2010, vol. 55, p. 1007-1114.
- JESENSKÁ, Z. 1987. *Mikroskopické huby v požívatinách a v krmivách*. Bratislava : Alfa, 1987, 319 p.

- LABUDA, R., TANČINOVÁ, D. 2006. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenicity. In *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2006, vol. 13, p. 193-200.
- LACEY, J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. In *Journal of Applied Bacteriology Supplement*, 1989, vol. 67, p. 11 – 25.
- LARSEN, T. O., PERRY, N. B., ANDERSEN, B. 2003. Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria*. In *Tetrahedron Letters*, 2003, vol. 44, p. 4511-4513.
- LOGRIECO, A., MORETTI, A., RITIENI, A., CAIFFA, M. F., MACCHIA, L., 2002. Beauvericin: chemistry, biology and significance. In *Upadhyay, R. K. 2002. Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation*. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 23–30.
- MAGAN, N., LACEY, J. 1988. Ecological determinants of mould growth in stored grain. In *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 7, 1988, no. 3, p. 245-256.
- MAŠKOVÁ, Z., TANČINOVÁ, D. 2009. Spektrum mikromycét rodu *Alternaria* izolovaných zo pšenice slovenského pôvodu v sezóne 2008. In *IV. Vedecká konferencia doktorandov s medzinárodnou účasťou*. Nitra : SPU, 2009, p. 293 – 296.
- MAŠKOVÁ, Z. 2010. Štúdium mikroskopických húb rodov *Alternaria* a *Fusarium* a ich toxických metabolitov v pšenici (*Triticum aestivum* L.) : dizertačná práca. Nitra : SPU, 2010, 165 p.
- MEDINA, Á., VALLE-ALGARRA, F. M., MATEO, R., GIMENO-ADELANTADO, J. V., MATEO, F., JIMÉNEZ, M. 2006. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. In *International Journal of Food Microbiology*, 2006, vol. 108, no. 2, p. 196-203.
- MORRISON, E., KOSIAK, B., RITIENI, A., AASTVEIT, A. H., UHLIG, S., BERNHOFT, A. 2002. Mycotoxin production by *Fusarium avenaceum* strains isolated from Norwegian grain and the cytotoxicity of rice culture extracts to porcine epithelial cells. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, p. 3070-3075.
- MOSS, M. O., THRANE, U., 2004. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. In *Toxicology Letters*, 2004, vol. 153, p. 23-28.
- MUBATANHEMA, W., MOSS, M. O., FRANK, M. J., WILSON, D. M. 1999. Prevalence of *Fusarium* species of the *Liseola* section on Zimbabwean corn and their ability to produce the mycotoxins zearalenone, moniliformin and fumonisin B1. In *Mycopathologia*, 1999, vol. 148, p.157-163.
- OSTRÝ, V., ŠKARKOVÁ, J., NEDĚLNÍK, J., RUPRICH, J., MORAVCOVÁ, H. 2005. Occurrence of *Alternaria* and *Fusarium* mycotoxins in winter wheat from domestic crop in year 2003. In *Mycotoxin Research*, 2005, vol. 21, p. 23-25.
- PIOVARČIOVÁ, Z., LABUDA, R., TANČINOVÁ, D. 2007. Výskyt *Alternaria* spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006. In *Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2007*. České Budejovice : Ústav půdní biologie, 2007, p. 124-132.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D. 1997. *Fungi and food spoilage*. London : Blackie Academic & Professional, 1997, 593 p. ISBN 0-8342-1306-0.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D. 1999. *Fungi and Food Spoilage*. 2. vyd. Maryland: An Aspen Publication, 1999, 593 p. ISBN 0-8342-1306-0.
- RABIE, C. J., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., LÜBBEN, A., VLEGGAAR, R. 1982. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from southern Africa. In *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, vol. 43, p. 517-521.
- RAMOS, A. J., LABERNIA, N., MARÍN, S., SANCHIS, V., MAGAN, N. 1998. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. In *International Journal of Food Microbiology*, 1998, vol. 44, p. 133-140.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O. 2002a. *Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, 389 p., ISBN 90-70351-42-0.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., LUND, F., FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C. 2002b. Method for the detection, isolation and characterisation of food-borne fungi. In: *Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. & Filtenborg, O. Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, p. 283-297. ISBN 90-70351-42-0.
- SCOTT, P. M. 2001. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. In *Journal of AOAC International*, 2001, vol. 84, p. 1809-1817.
- SCHRADER, T. J., CHERRY, W., SOPER, K., LANGLOIS, I., VIJAY, H. M. 2001. Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames Salmonella test. In *Teratogens, Carcinogens and Mutagens*, 2001, vol. 21, p. 261-274.
- SORENSEN, J. L. 2009. Preharvest fungi and their mycotoxins in maize : dizertačná práca. Lyngby : Center for Microbial Biotechnology, 2009. ISBN 978-87-91494-68-0.
- SUDAKIN, D. L. 2003. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. In *Toxicology Letters*, vol. 143, 2003, p. 97-107.
- SULYOK, M., BERTILLER, F., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R., 2006. Development and validation of a liquid chromatography / tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. In *Rapid communications in mass spectrometry*, 2006, vol. 20, p. 2649-2659.
- THRANE, U. 1986. Detection of toxigenic *Fusarium* isolates by thin layer chromatography. In *Letters in Applied Microbiology*, 1986, vol. 3, p. 93-96.
- THRANE, U. 2001. Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. In *Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. 2001. Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. St. Paul : American Phytopathological Society, 2001, p. 29-49.
- THRANE, U., ADLER, A., CLASEN, E., GALVANO, F., LANGSETH, W., LEW, H., LOGRIECO, A., NIELSEN, K. F., RITIENI, A. 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium*

sporotrichioides. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 95, 2004, no. 3, p. 257-266.

TORP, M., NIRENBERG, H. I., 2004. *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. In *International Journal of Food Microbiology*, 2004, vol. 95, p. 247-256.

WEBLEY, D. J., JACKSON, K. L., MULLINS, J. D., HOCKING, A. D., PITT, J. I. 1997. *Alternaria* toxins in weather-damaged wheat and sorghum in the 1995-1996 Australian harvest. In *Australian Journal of Agricultural Research*, 1997, vol. 48, p. 1249-1255.

WEIDENBÖRNER, M. 2001. *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer : London, 2001, 294 p., ISBN 3540675566.

Pod'akovanie:

Práca bola financovaná projektom VEGA 1/0282/10. Pod'akovanie patrí doc. Ing. Romanovi Labudovi, PhD. za jeho cenné rady a Ass. Dr. Michaelovi Sulyokovi za analýzy pomocou LC/MS/MS.

Contact address:

Ing. Zuzana Mašková, PhD., Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: zuzana.maskova@uniag.sk

doc. Ing. Dana Tančinová, PhD., Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: dana.tancinova@uniag.sk

Ing. Zuzana Barboráková, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: zuzana.barborakova@uniag.sk

Ing. Michal Mokry, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: michal.mokry@sk.nestle.com