

# TERAVILJA MIKROBIOLOOGIAST JA OHUTUSEST

H. Lõiveke, E. Ilumäe, E. Akk

Eesti Maaviljeluse Instituut

**ABSTRACT. Microbiology and safety of grain.** The present paper offers an overview of studies in grain safety and microbiology carried out at the Estonian Research Institute of Agriculture since 1973. Main genera and species of grain-infecting mould fungi as well as their potential toxicity have been studied using *Bacillus stearothermophilus* biotest. Data about grain mycotoxin monitoring are displayed since 1998. The presence of T-2 and HT-2 toxins in Estonian grain was proved for the first time in the grain yield from 2006. The dangers arising from mould fungi and of mycotoxins they produce as well as ways to avoid these threats are discussed.

**Keywords:** grain, microbiology, safety, mycotoxins

## Sissejuhatus

Siiani on Eestis üldiselt vähe tähelepanu pööratud kasvatatava vilja mikrobioloogilisele kvaliteedile ja selle halvenemisega seotud ohtudele. Kasvuperioodil arenevad viljal mitmesugused taime-eritistest toituvad ehk epifüütsed mikroorganismid, nii bakterid, pärmseened kui hallitusseened, millised pärinevad taimede risosfäärist, mullast või tuulega, putukatega sinna kantud tolmust ja juhuslikest mikroorganismidest. Tavaliselt on nad taimetele kahjutud, kuid taimi nõrgestavate ja mikroorganismidele väga soodsate tingimuste korral paljunevad nad massiliselt ja lähevad üle parasitisele eluviisile. Peale nende võivad nii kasvaval kui ka koristatud viljal esineda taimpatogeensed bakterid ja mikroorganismid. Ohuks on eelkõige hallitusseentena tuntud mikrosteente suur arvukus, mis halvendab vilja toidu- ja söödakvaliteedi näitajaid nagu kleepevalk, proteiin, tärklis, mahumass, langemisarv, samuti külvisomadusi (idanevus, idanemisenergia). Samuti võivad hallitusseened teatud tingimustes toota mürgiseid ühendeid – mükotoksiine, mis on ohtlikud nii toidu- kui söödavilja kasutamisel. Uurimistöö eesmärgiks oli välja selgitada Eestis kasvatatud teraviljas sagedamini esinevad hallitusseente perekonnad ja liigid, levinumate tüvede (isolaatide) ja liikide toksilisus ning sagedamini esinevad mükotoksiinid.

**Võtmesõnad:** teravili, mikrobioloogia, ohutus, mükotoksiinid

## Uurimismaterjal ja meetodika

Käesoleva ülevaate koostamiseks on kasutatud Eesti Maaviljeluse Instituudis läbi viidud uurimuste tulemusi

alates aastast 1973. *Fusarium*-seente esinemist meie teraviljas (nisu, rukis, oder, kaer) uuriti põhjalikumalt aastatel 1973–1981, levinumate mikrosteente perekonnade ja liikide esinemine tuvastati 1992–1994, 2002–2004 aastate tali- ja suvinisu saagi mükoloogiliste analüüside põhjal. Teravilja proovid koguti majanditest, talunikelt või katsetest vastavalt keskmise proovi koostamise nõuetele, säilitati kuni analüüsimiseni 1–1,5 kuu jooksul laboris toatemperatuuril kuivades tingimustes, kus niiskumine oli välistatud. Mikrobioloogilised analüüsid tehti ja proovide üldtoksilisus määrati Põllumajandusuuringute Keskuse ISO 17000–025 kohaselt akrediteeritud laborites rahvusvaheliselt tunnustatud meetoditega. Proovide ettevalmistamine ja mikrobioloogiline analüüs toimus vastavalt standardile EVSN-EN ISO 6887 – 1:2001. Hallitusseente üldarvu määramiseks tehti väljakülvid 1., 2. või 3. lahjendusest RBCA-le (Rose bengal chloramphenicol agar, ICC Standard Nr. 146, 1992) või virdeagarile. *Fusarium*-ide arvukus määrati Nashi ja Snyderi selektiivsöötmetel. Vajadusel kasutati proovide mükoloogiliseks uurimiseks niiske kambri meetodit. *Fusarium*-id määrati Bilai (1977) järgi, teised hallitusseened vastavate määrajate (Raper *et al.*, 1949; Raper *et al.*, 1965; Bilai *et al.*, 1988) järgi. Teravilja mikrobioloogilist kvaliteeti hallitusseente arvukuse järgi hinnati Saksamaa LV-s kasutatavate söödavilja (Schmidt-Lorenz, 1980) ja toiduvilja (Baumgart, Firmhaber, 1993) standardite kohaselt. Selgitamiseks proovides esinevate seeneliikide ohtlikkust viidi nad puhaskultuuri ja määrati nende üldtoksilisus *Bacillus stearothermophilus*'e suhtes Watsoni ja Lindsay (1982) järgi. Kui kasvupidurduse tsoon oli 0–1 mm - toksilisus puudub, 2–5 mm - nõrgalt toksiline, 6–10 mm - väga toksiline. Vilja üldtoksilisuse määramiseks kasutati biotesti kingloomaga *Paramecium caudatum*. Kui testobjektist jääb ellu 81–100%, ei ole proov toksiline; kui ellu jääb 50–80 %, on proov nõrgalt toksiline; kui ellu jääb 0–49%, on proov toksiline.

## Tulemused ja arutelu

**Tuvastatud hallitusseente perekonnad ja liigid.** Enamus teraviljadel esinevatest haigustest levivad seemnega. Seetõttu tuntakse vastavat patogeenset mikrofloorat seemnetel (*Helminthosporium*, *Pyrenophora*, *Drechslera*, *Leptosphaeria*, *Mycosphaerella*, *Tilletia*, *Ustilago* spp) hästi. Vähem tuntakse teravilja seemnetel esinevaid nn hallitusseeni, mida iseloomustab hästi arenenud seeneniidistik ja rohke eoste produktsiooni võime. Teravilja hallitusseentega saastumise tase on selle mikrobioloogilise kvaliteedi üheks olulisemaks näitajaks. Meie uurimustel hallitusseente liiga suure

sisalduse tõttu ei vastanud Saksamaa LV standarditele Eestis aastatel 1993, 1994, 2002–2007 toodetud toiduviljast 30–40% ja 20–25% söödaviljast. Sagedasemad hallituseente liigid nisudel aastatel 1992–1994 ja 2002–2004 olid *Alternaria* (40–70% teradel), *Fusarium* (20–70% teradel), *Cladosporium* (10–20% teradel), *Penicillium* (10–90% seemnetel) perekondadest, vähem esines aga *Verticillium* i liike. *Alternaria* perekonnast esinesid sagedamini *A. alternata* (Fr.) Keissl., *A. tenuissima* (Fr.) Will.; *Cladosporium* perekonnast *C. herbarum* Link. ex Fr., *C. cladosporioides* (Fres.) de Fries, *C. sphaerospermum* Penz.; *Penicillium* perekonnast *P. expansum* Link ex Fr. ja *P. decumbens* Thom. *Verticillium* perekond oli esindatud fütopatogeensete liikidega *V. dahliae* Kleb., *V. nigrescens* Pethybr. ja *V. albo-atrum* Rke. et Bert. Kui hilinetakse koristamisega, saastub vili lisaks *Mucor* i ja *Rhizopus* e liikidega. *Aspergillus* e liike – *A. fumigatus* (Fres.), *A. niger* Tiegh., *A. sulphureus* (Fres.) Thom et Church. esineb vaid mõnel väga põuasel kasvuperioodil (5–15% teradel). Lisaks võib seal esineda veel liike perekondadest *Acremonium*, *Geotrichum*, *Chaetomium*, *Gliocladium*, *Trichothecium*, *Stachybotrys* jt, eriti kui viljas on alanud riknemise protsess.

**Hallituseente toksilisuse testimine.** Tuvastatud 58 seeneliigist umbes pooled on potentsiaalsed toksikandid. Nimetatud hallituseente liigid võivad toota mitmeid mükotoksiine (alternariool, deoksünivalenool ehk vomitoksiin, zearalenoon, nivalenool, T-2 ja HT-2 toksiinid, ohratoksiin, aflatoksiin jne), mille mürgisus on väga suur, ületades tuhandeid kordi teraviljakasvatuses kasutatavate taimekaitsevahendite mürgisust (Lõiveke, 2008).

Kas aga kõik hallituseente liigid, millel on teada võime toksine produtseerida, seda ka teevad, oleneb paljudest tingimustest. Ka kirjanduses viidatakse, et isegi sama liigi kõik isolaadid ei ole sarnaste toksigeensete omadustega. Biotestil *Bacillus termotearophilus* ega oli hallituseentel kasvupidurduse tsoon olenevalt perekonnast ja liigist – 0–7 mm (*Cladosporium* 0 mm; *Alternaria* 3–4 mm; *Acremonium* 1–3 mm, *Penicillium* 2–7 mm; *Aspergillus* 0–3 mm; *Rhizopus* 0–2 mm). Toksilisemad isolaadid olid järgmistel liikidel: *Aspergillus oryzae*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium* sp (liik määramata) – toksilisuse näitaja 5–7 mm, *Trichothecium roseum* 7–10 mm, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus terreus*, *Acremonium* sp. 9–10 mm, *Penicillium oryzae*, *P. cyclopium* 8–18 mm. Viimased liigid esinesid selgete riknemistunnustega viljas. Riknemata viljast eraldatud hallituseente isolaatide toksilisuse näitaja oli tavaliselt piirides 0–7 mm. Seega juba biotesti põhjal võib järeldada, et paljud

teraviljas esinevad hallituseened kujutavad potentsiaalset ohtu vilja toiduks või söödaks kasutamisel (Lõiveke et al., 2004).

***Fusarium* spp. esinemine teravilja seemnetel.** *Fusarium*-seened põhjustavad teraviljadel mitmesuguseid haigusi nii juurtel, juurekaelal kui ka maapealsetel organitel (tõusmepõletik, juure- ja juurekaelamädanik, lumiseen, punakaste pähikutel) ning viljaterade nakatumist. Aastate 1973–1981 teraviljaproovide analüüs näitas, et *Fusarium* idega nakatunud oli 38–100% proovidest, teradest aga 8–67% (keskmiselt 27%), kõige enam nisu ja kaer, vähem oder ja rukis. Nakatus oli suurem just neil aastatel, kui sademeid oli tavalisest tunduvalt enam (1974, 1978, 1981 – nakatunud vastavalt 44%, 48%, 30% teradest; Lõiveke, 2008).

Ka hilisemate aastate (1992–1994, 2002–2004) nisuproovide uurimisel ilmnes, et *Fusarium* idega nakatus ei vähenenud (20–70% teradest, aastatel 1973–1981 vastavalt 13–67%), mis on ilmselt seotud meie kliimatiliste tingimustega (sademete hulk kasvuperioodil ületab aurumise) ja *Fusarium*-seente labiilsusega temperatuuri suhtes. Sagedamini esinesid viljas liigid *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. sporotrichiella* Bilai, *F. solani* (Mart.) App. et Wr., *F. moniliforme* Sheld., *F. oxysporum* (Schlecht) Snyder et Hans., *F. culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. ja *F. sambucinum* Fuckel. Toksiinide produtseerijateks on *F. sporotrichiella*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. gibbosum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, milliseid esines 50–60% proovides (Lõiveke, 2008). Tuntumad *Fusarium*-seente toksiinid on DON, 3-ADON, NIV, ZEN, HT-2, T-2, DAS, fumonisiinid, moniliformiin, fusaarhape, fusariin C, sambutoksiin, wortmanniin ja veel rida teisi (Miller, Trenholm, 1997).

***Fusarium* spp isolaatide toksilisus.** Meie uurimustes *Fusarium* isolaatidega selgus, et toksilisus *Bacillus stearothermophilus* e kasvupidurduse tsooni ulatuse järgi oli väga erinev –2–10 mm. Aastatel 2002–2005 eraldatud 287 isolaadist oli valdav enamus nõrga kuni keskmise toksilisusega, ainult 5,6% isolaatidel oli kasvupidurduse tsoon üle 6 mm ehk nad olid väga toksilised (Lõiveke, 2006). Tabeli 1 ja 2 andmetel oli kõige suurem toksiliste isolaatide osakaal (9,2%) 2004. aastal, kui õitsemise eel ja järel (juulis) oli kõige suurem sademete hulk. Ka aastatel 2006 ja 2007 eraldatud 227 isolaadist oli väga toksilisi isolaate vähe – 1,8–3,5% (tabel 2). Toksilisemad olid *F. sporotrichiella* var *poae*, *F. moniliforme*, *F. culmorum* ja *F. sambucinum* isolaadid. Valdav osa *Fusarium* floorast seemnetel oli nõrgalt kuni keskmiselt toksiliste omadustega, väga toksilisi isolaate oli alla 10%.

**Tabel 1.** Aastatel 2004 ja 2005 teraviljaproovidest eraldatud *Fusarium*ide isolaatide toksilisus *Bacillus stearothermophilus*'e suhtes (kasvupidurduse tsoon mm)

**Table 1.** Growth inhibition zone of *Bacillus stearothermophilus* (mm) caused by *Fusarium* isolates found on grain in 2004 and 2005

Teravili / Crop	2004				2005			
	Isolaate, tk / Isolates, no	0–1 mm	2–5 mm	6–10 mm	Isolaate, tk / Isolates, no	0–1 mm	2–5 mm	6–10 mm
Nisu / Wheat	110	4	94	12	83	8	74	1
Oder / Barley	24	0	24	0	57	2	50	5
Kaer / Oats	15	1	12	2	–	–	–	–
Rukis / Rye	3	0	3	0	–	–	–	–
Tritikale / Triticale	–	–	–	–	44	2	39	3
Kokku / Total	152	5	133	14	184	12	163	9
%-des / %	100	3,3	87,5	9,2	100	6,5	88,6	4,9

**Tabel 2.** Aastatel 2006 ja 2007 teraviljaproovidest eraldatud *Fusarium*ide isolaatide toksilisus *Bacillus stearothermophilus*'e suhtes (kasvupidurduse tsoon mm)

**Table 1.** Growth inhibition zone of *Bacillus stearothermophilus* (mm) caused by *Fusarium* isolates found on grain in 2006 and 2007

Teravili/ Crop	2006				2007			
	Isolaate, tk / Isolates, no	0–1 mm	2–5 mm	6–10 mm	Isolaate, tk / Isolates, no	0–1 mm	2–5 mm	6–10 mm
Nisu / Wheat	47	30	16	1	62	13	49	0
Oder / Barley	50	15	33	2	46	27	18	1
Kaer / Oats	16	5	10	1	4	3	1	0
Rukis / Rye	–	–	–	–	2	1	0	–
Kokku / Total	113	50	59	4	114	44	68	2
%-des / %	100	44,3	52,2	3,5	100	38,6	59,6	1,8

#### Meteoroloogiliste tingimuste mõju vilja *Fusarium*ide ja teiste hallitusseentega nakatumisele.

Meie katsetes Üksnurme katseväljakul aastatel 2004–2008 ilmnis teravilja hallitusseentega ja *Fusarium* spp nakatumises (fungitsiididega pritsimata kontrollvariantides) mõnikord seos sademete hulgaga õitsemisperioodil ja koristamiseelisel perioodil (tabel 3). Kuna *Fusarium* spp nakatumine toimub eelkõige õitsemise perioodil ja selle järel, teiste hallitusseentega aga koristuse eelselt, siis on see üsna loogiline. 2007. ja 2008. a. sademete hulgad õitsemisperioodil olid lähedased, ja ka *Fusarium*-nakkus oli sarnane. Koristusperioodi-eelselt 2008.a. oli sademeid ca 3 korda enam, millele vastavalt suurenes ka hallitusseente arvukus nisus ca 2 korda, kuid mitte odras. See viitab hallitusseente arvukuse sõltuvusele ka muudest teguritest, millest sademete hulk ja jaotus on vaid üks paljudest. Aastate 2004, 2005 ja 2006 sademete ja vilja nakatatus andmete vastanda-

mine kinnitab sama järeldust. Eesti teraviljas sageli esinevad *Alternaria* ja *Fusarium* liigid on kirjanduse andmetel antagonistid. Nii märgivad Broggi *et al.* (2007), et Argentiinas värskest koristatud nisus, kus esines ülekaalukalt (relatiivse tiheduse ja isoleerimise sageduse alusel) *Alternaria alternata*, *Fusarium* liigid (*F. graminearum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. verticillioides*) esinesid harva. Gonzales *et al.* (1998) uurisid Argentiina kõvanisus *F. graminearum* ja *A. alternata* esinemise suhteid ja *Fusarium*-toksiini DON sisaldust. *F. graminearum* suhtelise tiheduse ja DON sisalduse vahel terades oli positiivne korrelatsioon, seevastu *A. alternata* suhtelise tiheduse ja DON sisalduse vahel terades aga negatiivne korrelatsioon, mis viitab nende kahe hallitusseene antagonistlikele suhetele. Kuna hallitusseente arvukusele põllul mõjub palju erinevaid tegureid komplekselt, ei ole üksikute tegurite mõju alati võimalik eraldi välja tuua.

**Tabel 3.** Vilja hallituseente ja *Fusarium*-seentega nakatatus (ühikut 1g kuivas viljas) aastatel 2004–2006. Sademete hulk mm öitsemisperioodil (juulis) ja koristusperioodil (august–koristamiseni)**Table 3.** Contamination of grain samples with *Fusarium* spp. and other moulds (cfu in one gram of dried seeds) in 2004–2006. The amounts of precipitation in July and during period of harvesting (August – up to harvesting)

Kultuur / Crop	2004		2005		2006	
	Sademed / Precipitation, mm		Sademed / Precipitation, mm		Sademed / Precipitation, mm	
	Juuli / July	Koristusperiood / Harvest period	Juuli / July	Koristusperiood / Harvest period	Juuli / July	Koristusperiood / Harvest period
Suvinisu / Spring wheat	259	59	82	136	15	20
Oder / Barley	259	59	82	136	15	65
	1g kuivas viljas / dried seeds		1g kuivas viljas / dried seeds		1g kuivas viljas / dried seeds	
	<i>Fusa-</i> <i>Rium</i> spp.	Hallitusseened / Moulds	<i>Fusa-</i> <i>rium</i> spp.	Hallitusseened / Moulds	<i>Fusa-</i> <i>rium</i> spp.	Hallitusseened / Moulds
Suvinisu / Spring wheat	2x10 <sup>2</sup> – 2x10 <sup>3</sup>	2–3x10 <sup>4</sup>	1–2x 10 <sup>2</sup>	5–9x10 <sup>3</sup>	1–5 x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup> –6x10 <sup>4</sup>
Oder / Barley	–	–	5–10 x10 <sup>2</sup>	1–3x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>4</sup>

**Tabel 4.** Vilja hallituseente ja *Fusarium*-seentega nakatatus (ühikut 1g kuivas viljas) aastatel 2007 ja 2008. Sademete hulk mm öitsemisperioodil (juulis) ja koristusperioodil (august- koristamiseni).**Table 4.** Contamination of grain samples with *Fusarium* spp. and other moulds (cfu in one gram of dried seeds) in 2007 and 2008. The amounts of precipitation in July and during period of harvesting (August – up to harvesting)

Kultuur / Crop	2007		2008	
	Sademed / Precipitation, mm		Sademed / Precipitation, mm	
	Juuli / July	Koristusperiood / Harvest period	Juuli / July	Koristusperiood / Harvest period
Suvinisu / Spring wheat	42	75	53	203
Oder / Barley	42	107	53	203
	1 g / kuivas viljas / dried seeds		1 g / kuivas viljas / dried seeds	
	<i>Fusarium</i> spp.	Hallitusseened / Moulds	<i>Fusarium</i> spp.	Hallitusseened / Moulds
Suvinisu / Spring wheat	1–1,5x10 <sup>3</sup>	3–4x10 <sup>4</sup>	2–3x10 <sup>3</sup>	7–8x10 <sup>4</sup>
Oder / Barley	5x10 <sup>3</sup> –1x10 <sup>4</sup>	3–6x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>5</sup>

Hallitusseentega, eelkõige *Fusarium*-seentega nakatumisel peetakse oluliseks sademete kõrval ka temperatuuritingimusi. Punakaste tekitajateks viljapeadel ja terade nakatamisel on meie tingimustes eelkõige *F. sporotrichiella*, *F. sporotrichiella* var. *poae*, *F. culmorum* ja *F. avenaceum*, millele võivad lisanduda veel teised liigid. *F. graminearum* esinemist punakaste tekitajana pole meil tuvastatud. Nimetatud liikidel on nisu nakatamiseks öitsemise perioodil optimaalne temperatuur üle 15 °C ja niiske perioodi vajadus vähemalt 15 tundi. Näiteks oli Ukrainas, Moldaavias ja Krasnodari kraisis punakaste kõige tugevamini nisu nakatanud ja suuremaid saagikadusi põhjustanud piirkondades, kus öitsemisest koristamiseni sademete hulk ületas paljuaastast keskmist 2–4 korda, ööpäeva keskmine õhuniiskus oli üle 71% ja ööpäeva keskmine temperatuur üle 15°C (Buhar, 1980). Saksamaa LV teadlased Tishner ja Doleschel (2003) on oma uurimustega jõudnud järeldu-

sele, et punakaste esinemisel on positiivne korrelatsioon mükotoksiinide tekkimisega viljas. Punakastesse nakatumine sõltus talinisul eelkõige virulentse infektsioonilise materjali (jäätmel, nakatunud muld) olemasolust, sademetest ja temperatuurist perioodil lipulehest kuni öitsemise lõpuni. Nakkuse levikuks oli vaja perioodil lipulehest kuni öitsemise alguseni vähemalt 1 kord sademeid üle 4 mm, sooja vähemalt 15–18°C. Järgnevalt pähkute nakatamiseks oli vajalik kuni öitsemise lõpuni vähemalt 2 päeva jooksul sademeid üle 2 mm temperatuuril üle 17°C. Sama toimega on ka rohkem kui 5 päeva kestvad vihmad või püsiv niiskus lehtedel. Seega võib viljas mükotoksiinide tekkimine aset leida juba põllul, kui selleks vajalikud eeldused on olemas. Kui vihmane ilm öitsemise ajal soodustab pähkute *Fusarium*’idega nakatumist, siis koristamisega hilinemine suurendab just vilja nakatumist mikrooseentega perekondadest *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, millised

annavad viljale tumeda värvuse ehk tekitavad nn nõgi-hallitust.

**Koristusjärgse käitlemise mõju hallitusseente arengule viljas.** Koristamisjärgne käitlemine on väga oluline vilja ohutuse seisukohalt. Vilja kiire eelpuhastamine vabastamaks seda umbrohuseemnetest ja prahist, mis on viljast tunduvalt suurema niiskusega, ja vilja kohene kuivatamine aitavad vältida seal hallitusseente arengut, selle isekuumenemist ja toksiinide tekkimist. Hallitusseentega on saastatud ka vilja hulgas esinevad koristusjäätmelised – libled, ohted, pähikute ja kõrte tüükised. Mida kiiremini vilja puhastatakse ja kuivatatakse, seda väiksem on oht viljas hallitusseente arenguks ja toksiinide tekkeks. Kui meie katsetes koristatud vilja (2006 a. saak) niiskussisaldus oli 15,4%, siis viljas sisalduvate umbrohuseemnete niiskussisaldus oli vaadatamata soodsatele koristustingimustele 71,8%. 24 tunni pärast oli proovis terade niiskus tõusnud juba 5% võrra ja vilja riknemise oht oli realne. Seega umbrohuseemned kujutavad endast koristatud viljas tõsist ohtu ja võivad käivitada vilja riknemise ahelreaktsiooni.

#### Hallitusseente võimalik areng ladustatud viljas.

Tavaliselt nn "põlluseened" *Fusarium*, *Alternaria*, *Macrosporium*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* vajavad oma arenguks substraadi suuremat niiskust – 20–21%, osa hallitusseentest nn "laoseened" *Aspergillus*, *Penicillium* lepivad madalama substraadi niiskusega – 13–18%. Toksiinide produtseerimist võivad laos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* liigid alata juba vilja niiskusel 13–16%, produktsiooni maksimum on niiskusel 20–25%. Olenedes liigist on selleks vajalik temperatuur 0–30°C (Bullerman *et al.*, 1984). Enamuse *Fusarium*-toksiinide tootmiseks vajalik temperatuur on 22–27 °C, välja arvatud T-2, mille temperatuur on 2–12°C ja zearalenoone, mis vajab 12–15°C. Lisaks temperatuurile ja niiskusele kui kõige olulisematele faktoritele on toksiinide produtseerimiseks olulised ka muud tegurid nagu toksigeensete mikroosete, bakterite ja konkureeriva mikroflora arvukus, keskkonna reaktsioon, CO<sub>2</sub> ja O<sub>2</sub> suhe, terade vigastatus, putukate, lestad, näriliste esinemine jne. Putukad ja lestad võivad luua massiliselt paljunedes viljas niiskemaiaid koldeid, milles algab hallitusseente areng ja toksiinide tekkimine. Näriliste elutegevus võib samuti koldeliselt suurendada vilja niiskust ja reostada seda väljaheidetega, mis on samuti soodne pinnas hallitusseente arenguks. Vigastatud terad on aga heaks toiduallikaks kõigile mikroorganismidele. Mükotoksiinide teket mõjutavaid faktoreid on palju, ja kõiki arvatavasti ei tunta. Igatahes üksikute faktorite esinemine ei põhjusta veel alati mükotoksiinide teket, küll on aga suurem võimalus selleks paljude faktorite koosesinisel. Lähtudes hallitusseente arenguks vajalikest substraadi niiskuse ja temperatuuritingimustest, peaks kriitiliselt suhtuma senistesse vilja säilitamise eeskirjadesse, mille kohaselt vilja säilitamisel temperatuuril 18–25°C on kriitiliseks niiskuseks 14,0–14,5% (Maasik, 1999). Ilmselt oleks õigem kriitiliseks lugeda madalamat niiskust. Kindlasti oleneb see ka vilja hallitusseentega nakatatus tasemest ja liigilisest koosseisust. Näiteks Vene autorid (Jevsejeva, 1992) peavad *F. graminearum*’iga nakatatud vilja kuivatamisel nõu-

tavaks niiskuse viimist 12–13%-ni, mis väldib selle seene edasise arengu ladustatud viljas. Arvatakse, et vilja niiskusel 10–13% toksikoloogilisi probleeme enam ei teki.

**Mükotoksiinide kahjulikud mõjud.** Kuna mükotoksiinid on värvitud, maitsetud ja lõhnatud, siis on nad viljas ja sellest valmistatud söötades ja toidus eriti ohtlikud. Pealegi on nad vastupidavad keemilisele ja termilisele töötlemisel ning kestvale säilitamisele. Nii näiteks ei lagune deoksünivalenool isegi 12°C juures, osaliselt laguneb alles 210°C juures (Bischoff, 1998). Fermenteerimisel õlle valmistamise protsessis ohratoksiin laguneb vaid vähe, deoksünivalenool, zearalenoone ja aflatoksiin on aga veelgi vastupidavamad ja satuivad toksilise vilja puhul õllesse. Teraviljas, eriti maisis, sageli esinevaid fumoniisiine peetakse suhtelielt termostabiilseteks ega teata ka teisi efektiivseid meetodeid nende detoksikatsiooniks (Lawlor, Lynch, 2001). Ka loomade organismis lagunevad mükotoksiinid vähe ja lähevad üle toodangusse (piim, liha, või, juust, munad) ohustades tarbijate tervist. Mükotoksiinidega saastatud toidu ja söötade kasutamisel tekivad inimestel ja loomadel mitmesugused tervisehäired, eelkõige väheneb haigustele vastupidavus immuunsüsteemi kahjustumise tõttu. Loomadel väheneb söögiisu, langeb söödakasutuse efektiivsus, kaaluüve, järglaste arvukus, tekivad abordid, viljatus või isegi loomade lõppemine. Inimestel tekivad seede- ja närvihaired, iiveldus, oksendamine, nõrkus, peavalu, südamehäired, vereloome, neerude ja maksa kahjustused ja muud, halvimal juhul ka surm (Bilal, Pidoplitško, 1970; Prelusky *et al.*, 1994; D’Mello, Macdonald, 1997; D’Mello *et al.*, 1997). Tuntud on inimestel "purjus leiva haigus" ja hobustel "hullu hobuse haigus", mis viitavad närvisüsteemi kahjustustele.

Peamised teraviljades esineda võivad mükotoksiinid on järgmiste seeneperekondade tekitatud: *Penicillium* – ohratoksiin, *Aspergillus* – aflatoksiin, *Fusarium* – deoksünivalenool, zearalenoone, nivalenool, diatsetoksuütsirpenool, T-2 ja HT-2, moniliformiin ja uuemal ajal leitud boveritsiin ja enniatiinid (Jestoi, 2006). Üle 300 toksiini arvatakse olevat imetajatele toksilised.

**Mükotoksiinid Eesti teraviljas.** Arvestades, et toksiine ei teki viljas alati, tekib küsimus, kuivõrd saastatud või toksiinidest vaba on Eestis toodetud teravili. Meie uuringutel katsetest ja tootmis põldudel kogutud viljaproovide üldtoksilisus (määratud kingloomal *Paramaecium caudatum*) kas puudus või oli tavaliselt nõrk. Nõrgalt toksilisi oli alla 10% proovidest (aastal 2007 – 25% proovidest), erandina sademeterikkama 2008 aasta proovidest osutus toksiliseks umbes 25%. Toksilisemad olid osa kaera proovidest. Mikrobioloogilise analüüsi tulemuste ja eelnimetatud biotesti abil eelselekteeritud proovidest määrati mükotoksiinid ohratoksiin ja zearalenoone Põllumajandusuuringute Keskuses ning deoksünivalenool, T-2 ja HT-2 Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis. 2006. ja 2007. aasta proovidest leiti T-2 ja HT-2 toksiine Eestis toodetud teraviljast esmakordselt, põhiliselt kaerast ja odrast, vähem nisust, kokku vastavalt 41 ja 66% proovidest (tabel 5). DON esines koos nimetatud toksiinidega sa-

mades proovides. Seejuures üksikute toksiinide kogused olid tavaliselt lubatud piirmäärdest väiksemad, kuid erinevate toksiinide koosesinemine suurendab toksilisust tekkiva sünergeetilise efekti tõttu oluliselt (Doko *et*

*al.*, 1996; Lawlor, Lynch, 2001). Teisi uuritud toksiine (ohratoksiin, ZON) 2006. ja 2007 a. proovides ei tuvastatud, mis veel ei välista nende esinemist Eesti teraviljas.

**Tabel 5.** Mükotoksiinide esinemine aastate 2006 ja 2007 teraviljasaagi eelselekteeritud proovides  
**Table 5.** *Mycotoxins occurrence in grain samples in 2006 and 2007*

Teravili / Crop	2006					2007					
	Proove, tk / Samples, no	Mükotoksiine sisaldavaid proove, tk / Contaminated samples, no				Proove, tk / Samples, no	Mükotoksiine sisaldavaid proove, tk / Contaminated samples, no				
		Ohrato- ksiin	ZEN	HT-2	T-2		Ohrato- ksiin	ZEN	HT-2	T-2	DON
Oder / Barley	10	0	0	2	2	16	0	0	14	12	0
Nisu / Wheat	4	0	0	0	0	19	0	0	4	3	2
Kaer / Oats	8	0	0	7	7	6	0	0	3	4	0
Rukis / Rye	–	–	–	–	–	2	0	0	1	1	1
Kokku / Total	22	0	0	9	9	59	0	0	22	20	3
Mükotoksiinidega saastatud, Contaminated, %		0	0	41	41		0	0	37	34	5
Mükotoksiinidest saastamata proove / not contaminated, 13 tk=59%						Mükotoksiinidest saastamata proove / not contaminated, 20 tk=34%					

Põllumajandusuuringute Keskuse korraldatud pikaajase mükotoksiinide monitooringu põhjal võib väita, et ka teisi toksiine Eesti päritolu viljas esineb mõnel aastal sageli. Aastatel 1998–2002 analüüsitud Eesti ja välismaist päritolu toiduviljas ja saadustes leiti mükotoksiine 7,4–42,9% ja söödaviljas, segudes ja kliides 36,4–90,9% proovides. Toiduvilja proovidest oli Eesti päritolu 46–85% ja söödaviljast 34–88%. Aastate 2003–2005 proovidel oli mükotoksiinidega saastatus pisut vähenenud – vastavalt toiduviljal 6,9–11,6% ja söödaviljal 5,1–22,2% proovidest. Monitooritud toiduviljast oli Eesti päritoluga 9–44% ja söödaviljast 32–62%. Põhiliselt esinesid ohratoksiin, zearalenoon, vähem aflatoksiin ja deoksünivalenoon. Kuigi leitud kogused ei ületanud lubatud piirnorme, esines ka proove, kus esinesid koos mitu erinevat mükotoksiini.

**Mükotoksiinide riski vähendamine.** PMK monitooringu ja meie katseandmete põhjal võib väita, et mükotoksiinide esinemise risk on suurem teravilja käitlemise ja töötlemise saadustes – praaktera, jäätmed, kliid, milles võib mükotoksiinide sisaldus olla kordi kõrgem kui täidlastes terades. Seetõttu saab mükotoksiinide sisaldust viljas vähendada purunenud, kõlujate ja peenterade väljasõelumisega, sorteerimisega ja tuulamisega. Koorimine, eriti kaeral, vähendab oluliselt mükotoksiinide sisaldust viljas. Näiteks kesta eemaldamine nisu jahvatamisel vähendas ohratoksiin A sisaldust

40% (Scudamore, 2005). Täisterajahu, millesse on kest sisse jahvatatud, võib tarbijale olla ohtlikum kui kooritud viljast valmistatud jahu. Ohtlik on viljas ka tolm, mis sisaldab toksilisi hallitusseente eoseid ja seeneniidistiku tükikesi, mida on küll võimalik eraldada tuulamisega. Selline tolm tekitab sissehingamisel allergiat või muid tervisehäireid.

Hallitusseente esinemise ohtu viljas võib vähendada juba mõningate agrotehniliste abinõudega nagu õige külvisenorm, optimaalne taimede tihedus pinnaühikul, lamandumise vältimine, tasakaalustatud väetamine, herbitsiidide, retardantide ja fungitsiidide kasutamine. Võimalikult varased külvid puhitud seemnega ja lühema kasvuaajaga sortide kasutamine võimaldavad ka varasemat koristust ajal, kui sademed pole veel jõudnud vilja kvaliteeti rikkuda ja hallitusseente intensiivne paljunemine koristamata viljal pole veel alanud. Kombaini hästi reguleeritud peksuseadmed väldivad terade vigastamise, piisava kombainipargi ja kuivatite võimsuse korral on võimalik vili kuivatada kiiresti ja ettevalmistatud ladude korral ka säilitada, ilma et tekiks viljas hallitusseente arengut, mükotoksiinide teket ja vilja riknemist. Herbitsiidide kasutamisel paranevad teraviljade toitumistingimused ja mikrokliima taimikus muutub hallitusseente arenguks vähem soodsaks. Kui vili on enne koristamist lamandunud 6 nädalat või enam, on selles mükotoksiinide tekkimine väga tõenäoline. Hallitusseente arengu takistamiseks ja mükotoksiinide tekkimise

vältimiseks põllutingimustes on maailmas katsetatud laialdaselt mitmesuguseid fungitsiide (Mesterhazy, Bartok, 1996; Oldenburg, Weinert, Wolf, 2000; Tischner, 2004). Selle uurimissuuna arendamine on vajalik ka Eestis.

**Kokkuvõte ja järeldused.** Teostatud uurimiste tulemusena on selgunud, et hallitusseente liiga suure sisalduse tõttu ei vasta Eesti teraviljast mikrobioloogilise kvaliteedi nõuetele ca üks kolmandik toiduviljast ja veerand osa söödaviljast. Sagedamini esinevad viljas hallitusseened perekondadest *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* ja *Rhizopus*. Valdavalt on nad esindatud nõrgalt kuni keskmiselt toksiliste isolaatidega (tüvedega), samuti on teraviljaproovide üldtoksilisus enamasti nõrk, kaeral suurem kui teistel liikidel. 2006. a. saagi eelselekteeritud proovidest sisaldasid mükotoksiine 41%, 2007.a. saagist vastavalt 66%. Meie teraviljas esinesid sagedamini T-2, HT-2 toksiinid,

harvem DON, aflatoksiin ja ohratoksiin. Toksiinide sisaldused tavaliselt ei ületanud EL lubatud piinorme, kuid ohtu suurendab erinevate toksiinide koosinemisel võimalik sünergeetiline efekt.

Saadud tulemused kinnitavad vajadust pöörata suuremat tähelepanu hallitusseente ja nende toodetavate mükotoksiinide esinemise vähendamisele teraviljakasvatuses ja vastava teadusliku uurimistöö süvendamisele.

## Tänuavaldused / Acknowledgements

Uurimus on läbi viidud ETF grandid nr. 6154 ja Põllumajandusministeeriumi rahalisel toel. The study was financed by grant no. 6154 of Estonian Science Foundation and by financial support of Ministry of Agriculture.

## Kasutatud kirjandus / References

- Baumgart, J., Firmhaber, J. 1993. Mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Hamburg, 425.
- Bilal, V.I., Pidoplitško, N. M. 1970. Toksinoobrazujusije mikroskopitseskije gribõ i võzõvajemõje imi zabolovanija tšeloveka i životnõh. Naukova Dumka, Kijev (vene k).
- Bilal, V. I. 1977. Fusarii. Naukova Dumka, Kijev (vene k).
- Bilal, V. I., Gvozdjak, R. I., Skripall, I. G., Krajev, V. G., Ellanskaja, I. A., Zirka, T. I., Muras, V. I. 1988. Mikroorganizmõ-vozbuditeli boleznei rastenii. Spravotšnik. Naukova Dumka, Kijev (vene k).
- Broggi, L. E., Gonzalez, H. H. L., Resnik, S. L., Pacin, A. 2007. *Alternaria alternata* prevalence in cereal and soyabean seeds from Entre Rios, Argentina. – *Rev Iberoam Micol*, 24, 47–51.
- Buhar, B. I. 1980. *Fusarium graminearum* Schwabe – vozbuditel fuzarioza kolosjev i zerna ozimoi pšenitsõ v uslovijah tšentralnoi zonõ Moldavii. Avtoref. kand. biol. nauk. Moskva. 22 s. (vene k.).
- Bullerman, L. B., Schroeder, L. L., Park, K.-Y. 1984. Formation and control of mycotoxins in food. – *J. Food Prot.*, 47, 637–646.
- D'Mello, J. P. F. and Macdonald, A. M. C., 1997. Mycotoxins. – *Anim. Feed Sci. Technol.* 69, pp. 155–166
- D'Mello, J. P. F., Porter, J. K., Macdonald, A. M. C., Placinta, C. M. 1997. *Fusarium* mycotoxins. In: D'Mello, J. P. F. – *Hanbook of Plant and Fungal Toxicants*. CRC Press, Boca Raton, FL, 287–301.
- Doko, M. B., Canet, C., Brown, N., Sydenham, E. W., Mpuchane, S., Siame, B. A. 1996. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cerealbased foods from eastern and southern Africa. – *J. Agric. Food Chem.* 44, 3240–3243.
- Eesti standard EVS-EN ISO 6887–1:2001 (Preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination). Eesti Standardiamet (eesti k).
- Gonzalez, H. H. L., Martinez, E. J., Pacin, A., Resnik, S. L. 1999. Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinian durum wheat. – *Mycopathologia*, 144, (2, November).
- Jestoi, M. 2006. Emerging *Fusarium*-mycotoxins in Finland. Academic dissertation. –University of Turku. National Veterinary and Food Research Institute. Julkaisuja-Publications, 01, 2005.
- Jevsejeva, R. P. 1992. Opasnost možno predotvratit. *Zastsita rastenii*, 11, 12–13 (vene k).
- Lawlor, P. G. and Lynch, B. 2001. Mycotoxins in pig feeds 2: clinical aspects. – *Irish veterinary Journal*, 54 (4), 172–176.
- Lõiveke, H., Laitamm, H., Sarand, R.-J. 2003. *Fusarium* fungi as potential toxicants on cereals and grain feed grown in Estonia during 1973–2001. – *Agronomy Research*, 1(2), 185–196.
- Lõiveke, H., Ilumäe, E. and Laitamm, H. 2004. Microfungi in grain and grain feeds and their potential toxicity. – *Agronomy Research*, 2(2), 195–205.
- Lõiveke, H. 2006. Incidence of *Fusarium* spp. on several field crops in Estonia and their toxicity towards *Bacillus stearothermophilus*.
- Lõiveke, H. 2008. *Teraviljade fusarioosid Eestis*. Eesti Maaviljeluse Instituut. Saku. 77 lk.
- Maasik, E. 1999. Elevaatori- ja laomajandus. –Teraviljakasvatuse käsiraamat (koost. Older, H.), Saku. 297–313.
- Mesterhazy, A., Bartok, T. 1996. Control of *Fusarium* blight of wheat by fungicides and its effect on the contamination of grains. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer* 49, 187–206.
- Miller, J. D., Trenholm, H. I. 1997. Mycotoxins in Grain. *Compounds Other Than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, Minnesota.

- Oldenburg, E., Weinert, J., Wolf, G. H. 2000. Einfluss von Fungiziden auf den Mykotoxin-Gehalt von Weizen. Bericht des Instituts für Pflanzenbau und Grünlandwirtschaft. Jahresbericht 2000. 22 S.
- Prelusky, D. B., Rotter, B. A. & Rotter, R. G. 1994. Toxicology of mycotoxins. In: J. D. Miller and H. L. Trenholm (eds). *Mycotoxins in Grain: Compounds Other than Aflatoxin*, St. Paul: Eagan Press, 359–403.
- Raper, B. K., Fennell, I. D., Austwick, P. K. C. 1965. *The Genus Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Raper, B. K., Thom, C., Fennell, I. D. 1949. *A Manual of the Penicillia*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Schmidt-Lorenz, W. 1980. Sammlung von Vorschriften zur mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln. Produktgruppe 27. Futtergrundstoffe und Mischfutter. Weinheim.
- Scudamore, K. A. 2005. Mycotoxins And Their Management In The Food Chain.– *European Mycotoxin Seminar Series Evaluating the Impact of Mycotoxins in Europe*, 73–95.
- Tischner, H. 2004. Fungizid-Pack im Angebot. *DLZ*. 1, 34–39.
- Watson, D. H., Lindsay, D. G. 1982. A Critical Review of Biological Methods for the Detection of Fungal Toxins in Food and Foodstuff. – *Journal of Science of Food and Agriculture*, 35, 59–67.

## Microbiology and safety of grain

H. Lõiveke, E. Ilumäe, E. Akk  
*Estonian University of Life Sciences*

### Summary

The present paper provides an overview of results obtained through research in cereal microbiology and toxicology in Estonian Research Institute of Agriculture during 1973–1981, 1993–1994, 2002–2008. In addition to the pathogens causing typical growth period diseases (*Helminthosporium*, *Pyrenophora*, *Drechslera*, *Leptosphaeria*, *Mycosphaerella*, *Tilletia*, *Ustilago* spp) in Estonian grain do also occur so called mould fungi which play a significant role in formation of microbiological quality and toxicological indicators (safety) of grain. Due to too high content of mould fungi about a one third of Estonian grain does not accord to the demands prescribed to food and a quarter to fodder material. More often the mould fungi from genera *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Mucor* and *Rhizopus* were identified on the grains., less abundant were *Aspergillus* and *Verticillium*. In spoilt grain also *Acremonium*, *Geotrichum*, *Chaetomium*, *Gliocladium*, *Trichothecium*, *Stachybotrys* et al were observed. About a half of identified 58 fungal species were potential toxicants. Toxicity of isolates toward *Bacillus stearothermophilus* was different by species: *Fusarium* 0–10 mm, other mould fungi 0–7 mm. More toxic were *Aspergillus oryzae*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium* sp – toxicity indicator 5–7mm, *Trichothecium roseum* 7–10 mm, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus*

*terreus*, *Acremonium* sp. 9–10 mm, *Penicillium oryzae*, *P. cyclopium* 8–18 mm. The last ones did occur in spoilt grain. The growth repression zone of more toxic isolates of *Fusarium* -fungi of species *F. sporotrichiella* var *poae*, *F. moniliforme*, *F. culmorum* and *F. sambucinum* was 6–10 mm. Prevalent part of the *Fusarium*-flora on seeds had low to moderate toxicity, very toxic isolates did constitute less than 10%. Toxic *Fusarium* species were found in 50–60% of samples. Most of the isolates of other mould fungi had also a low to moderate toxicity. In biotesting of grain samples with *Paramecium caudatum* mostly less than 10% of samples proved to be mildly toxic, as an exception about 25% of samples from precipitation-rich year of 2008 turned out to be mildly toxic. After a more rainy growth period also the number of mould fungi on grains was higher. Crop weediness caused an increase of number of mould fungi in harvested grain and to avoid it the harvested grain has to be quickly cleaned and dried.

Hindering of mould fungi development in stored grain is discussed. In Estonian grain mostly the *Fusarium*-toxins HT-2, T-2, DON and ZEN were identified, of other mould fungi toxins ochratoxin, not so often aflatoxin. Of samples collected in 2006 and 2007 the mycotoxin-free samples constituted accordingly 59% and 34%. According to data obtained by Agricultural Research Center in 2003–2005 about 88–93% of food grain samples and 78–95% of fodder grain samples were clean from mycotoxins. Content of individual toxins did not exceed EU max. allowed levels but the synergism caused by co-occurrence of several toxins may significantly rise the grain toxicity. Probable harmful influence of mycotoxins to animal husbandry and measures diminishing the risk of mycotoxins are discussed.