

A biotermesztett *Fagopyrum esculentum* mikrobiológiai és radioaktív tisztaságának vizsgálata

Incze Anna-Katalin¹, Csedő Károly²

¹Galenus Gyógyszertár Sepsiszentgyörgy, ²Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem

Studiul purității microbiologice și radioactive al *Fagopyrum esculentum*, cultivat ecologic

În lucrarea de față s-a urmărit determinarea purității microbiologice și radioactive a drogului vegetal obținut în urma cultivării ecologice a *F. esculentum* Moench. Ca metode de analiză s-au folosit: cultivarea diluțiilor probei pe medii de cultură corespunzătoare (bacterii, fungi), metoda imuno-enzimatică (aflatoxine) și dozimetria (radioactivitate). Rezultatele obținute arată că produsul vegetal, *Fagopyri herba*, corespunde criteriilor de puritate și valorile găsite în el se încadrează în intervalul valorilor normale în fiecare caz.

Cuvinte cheie: puritate microbiologică, puritate radioactivă, *Fagopyrum esculentum*, cultivare ecologică

Study of the microbiological and radioactive purity of the ecologically cultivated *F. esculentum*

In this study we determined the microbiological and radioactive purity and the concentration of the aflatoxins with different methods. Our results demonstrated that the biologically cultivated *Fagopyrum esculentum* was not polluted with bacteria, fungi and radioactivity.

Keywords: microbiological purity, radioactive purity, *Fagopyrum esculentum*, ecological cultivation

Orvostudományi Értesítő, 2008, 81 (2): 139-141

www.orvtudert.ro

A gyógynövények valamint az ezekből nyert fitoterapeutikumok minősítése számos tényező figyelembevételével történik. A termesztett illetve biotermesztett gyógynövények, növényi drogok és készítmények esetében a minőségi előírások biztosítása könnyebb. A minősítés különböző minőségi követelmények, előírások alapján történik, melyeket a Gyógyszerkönyvek vagy gyógynövény-vizsgálati szabványok írnak elő. Ennek megfelelően az E.Gy. V-ik kiadása külön monográfiában határozza meg a gyógynövényekre vonatkozó minősítési előírásokat, melyeket a hazai X-ik R Gyk., 2003-as Kiegészítő kötete is átvett. Ezenkívül még számos EU-s irányelv, direktiva van érvényben, melyeket a EU Tanácsa fogalmazott meg. Ezek kiterjednek a mintavétel módjára, a megfelelő analitikai módszer alkalmazására, a megengedett koncentráció értékének megszabására stb. [10,11].

A növényi drog minősítése több lépésben történik: azonosítás, tisztaságvizsgálat és tartalmi meghatározás. A tisztaságvizsgálat során nyomon követik az organoleptikus tulajdonságokat, a szárítási veszteséget, hamu-, homoktartalmat, meghatározzák a peszticid tartalmat (DDT, HCH), a nehézfém-szennyeződést (Pb,Cd), a mikrobiológiai tisztaságot (szükség esetén az aflatoxin tartalmat) valamint a radioaktív sugárzást [8].

Az említett rendelkezéseket figyelemmel kísérve e tanulmány összegzi a biotermesztés során nyert *Fagopyrum esculentum* Moench mikrobiológiai és radioaktív tisztaságára vonatkozó vizsgálati eredményeket. A nehézfém- és peszticidmaradvány-szennyeződés hiányát jól megválasztott kritériumok alapján biztosították, első sorban a talaj szennyeződés mentessége által. A talaj, a biotermesztett gyógynövények mikrobiológiai és radioaktív tisztaságát is befolyásolja mikroflórája és az esetleg jelenlevő radioaktív elemek által. Ugyanakkor a nem megfelelő gyűjtés, szárítás, tárolás is lehet ezen szennyeződések oka. A baktériumok, vírusok, penészgombák fejlődésére kedvezően hatnak a levegő magas páratartalma, a szellőztetlenség, a megfelelő hőmérséklet. Ilyen körülmények olyan fitoterapeutikumok

kat eredményezhetnek, melyek az emberi szervezetre nézve veszélyesek és mérgezéseket is okozhatnak. Az *Aspergillus* sp. gombák befertőzhetik a növényi drogot, ezért az általuk kiválasztott aflatoxinok [3] jelenlétének kimutatása és mennyiségi meghatározása is előírt. Az előbbieken felsoroltak indokolták az ökotermesztés során nyert pohánka aflatoxinra vonatkozó tisztasági vizsgálatát is.

Anyag és módszer

A tisztasági meghatározások anyagát a *Fagopyri herba* képezi melyet a *Fagopyrum esculentum* Moench, pohánka, biotermesztése során nyertük. A kultúrákat a MOGYE gyógynövényeskertjében és Kovászna megyében Egerpatakon termesztettük és gyűjtöttük 2003-ban és 2004-ben, betartva a termesztésre vonatkozó mezőgazdasági valamint GAP rendelkezéseket [2,11]. A gyűjtést a déli órákban végeztük a teljes virágzás idején. A szárítás jól szellőző padlásokon történt, a tárolás pedig papírszakokban. A mikrobiológiai tisztasági meghatározásokat a pohánka különböző részeiről, a radioaktivitást pedig az egész növényről határoztuk meg.

Az analíziseket nemzetközileg elfogadott módszerekkel végeztük: a hígított növényikivonatok szilárd táptalajon való tenyésztése (mikrobiológiai összetétel), immunológiai enzimikus (ELISA) módszer (aflatoxin), felületi dozimetria (radioaktivitás) [1,4,5,6,7].

A bakteriológiai tisztaság meghatározása érdekében, aerob körülmények közt 35-37°C-on, tenyésztettük szilárd táptalajokon a drogvonatot hígított oldatait (1/10, 1/100, 1/1000), majd megszámláltuk az azonos hígítású oldatokból kifejlett telepeket és meghatároztuk a számtani középértéküket. Ezeket az értékeket megszorozva a megfelelő hígítási faktoralal meghatároztuk 1g drogra a telepkepző egység értékét [8]. Az *E. coli* szám meghatározása érdekében a tízszeres hígítású oldatot megfelelő, 44°C-ra előmelegített táptalajokon (BBLV, indolnak szükséges táptalaj) tenyésztet-



tünk 24-48 órán át. Az indol és gáz fejlődés *E. coli* bacillus jelenlétére utal.

A penészgombák jelenlétének meghatározására, majd a fajok azonosítására a hígított drogvonatok megfelelő táptalajon (Sabouraud táptalaj) való tiszta tenyésztésének módszerét alkalmaztuk, használtuk. Az inkubáció után a telepeket sajátos jellegzetességeik valamint morfológiai tulajdonságaik alapján (mikrofungiális makroszkopikus meghatározás) azonosítottuk és viszonyítottuk 1g drogra az összgombaszámot [8].

Az aflatoxin koncentráció megállapítása az egyszerű és gyors immunológiai-enzimatikus ELISA módszert használtuk, mely antigén-antitest reakción alapszik. A reakció sorozat után szabadon maradt peroxidázzal jelölt aflatoxin mennyiségét fotometriás módon meghatároztuk. Mivel az abszorbancia értékek fordítottan arányosak az aflatoxin koncentrációval, a kapott abszorbancia értékek segítségével kiszámoltuk a próbák aflatoxin koncentrációját.

A radioaktivitás kimutatása érdekében a felületi dózimétriás módszerét alkalmaztuk. Ez alkalmas a természetben normál körülmények közt létező radioaktivitás mérésére, melyet a minden abiotikus és biotikus testben lévő radioaktív izotóp ad. A meghatározásokat a nem elektromos elven működő detektorral, doziméterrel, végeztük, mely a sugárzás teljes intenzitását hosszabb időn át regisztrálja. A kapott értékek irány mutatóak arra nézve, hogy a gyógynövény csak a természetes alapsugárzást adja-e vagy pedig radioaktivitással szennyezett.

Eredmények, megbeszélés

A mikrobiológiai tisztaság meghatározása érdekében végzett vizsgálatok, melyekhez külön-külön a *Fagopyrum esculentum* virág-, levél-, szárdrogból kapott kivonatokat használtuk, a következő eredményeket mutatták:

Az 1., 2. és 3. táblázatokban bemutatott eredmények értékelése érdekében figyelembe vettük első sorban az V.Eu.Ph. erre vonatkozó előírását. A Gyógyszerkönyv előírata szerint

1. táblázat. Telepképző egység (TKE) a *Fagopyri herba* részeiben (TKE/1g drog)

Helység	Év	Virág	Levél	Szár
Egerpatak	2003	86×10^{-2}	33×10^{-4}	34×10^{-2}
Egerpatak	2004	62×10^{-2}	32×10^{-2}	7×10^{-4}
Marosvásárhely	2003	3×10^{-4}	8×10^{-4}	16×10^{-4}
Marosvásárhely	2004	2×10^{-4}	6×10^{-4}	7×10^{-4}

2. táblázat. Összgombaszám a *Fagopyri herba* részeiben 1g drogra vonatkoztatva

Helység	Év	Virág	Levél	Szár
Egerpatak	2003	38×10^{-3}	21×10^{-4}	11×10^{-4}
Egerpatak	2004	14×10^{-4}	38×10^{-2}	2×10^{-4}
Marosvásárhely	2003	39×10^{-4}	6×10^{-3}	5×10^{-4}
Marosvásárhely	2004	6×10^{-4}	116×10^{-4}	9×10^{-4}

az aerob mezofil telepképző baktériumok száma maximálisan 10 TKE/g lehet valamint az összgomba szám felső határértéke 10/g, olyan drogok esetében, melyeket nem főzünk használat előtt. Ugyanebben az esetben a gyógyszerkönyv az *E. coli* baktérium teljes hiányát írja elő és a Gramm negatív baktériumok esetében ezek száma nem haladhatja meg a 10 TKE/g értéket. Összehasonlítva a kapott eredményeket a szabványértékekkel, megállapíthatjuk, hogy bár jelen vannak különböző baktérium és gomba (penész) fajok, létszámuk egyetlen egy esetben sem haladja meg a megengedett felső értéket. Ugyanakkor kísérleti adataink a *E. coli* bacillus teljes hiányát mutatták. Tehát az ökotermesztett pohánka megfelel a mikrobiológiai tisztaság előírásainak.

Az összgombaszám megállapítása után, a telepek makroszkopikus és mikroszkopikus vizsgálata olyan gombafajok jelenlétét mutatta ki, mint az *Aspergillus sp*, melyek olyan, az emberi szervezetre igen mérgező hatású, mikotoxinokat választanak ki, mint az aflatoxinok. Ezért az európai rendeleteket is figyelembe véve, melyek kötelezik a fent említett toxinok mennyiségi meghatározását, ha őket kiválasztó gombafajokat azonosítanak, következő lépésként meghatároztuk ezek tartalmát a pohánka virágban, levélben, szárdrogból. A következő értékeket kaptuk:

3. táblázat. Aflatoxin koncentráció (ppb vagy $\mu\text{g}/\text{kg}$) a *Fagopyri herba* részeiben

Helység	Év	Virág	Levél	Szár
Egerpatak	2003	0,0215	0,0234	0,0092
Egerpatak	2004	0,0062	0,0653	0,0652
Marosvásárhely	2003	0,233	0,0079	<0,005
Marosvásárhely	2004	0,3463	0,0119	<0,005

Az eredmények értékelése végett a szakirodalom adatait használtuk mivel a Eu.Ph. nem ad meg semmilyen értéket az aflatoxin koncentrációra vonatkozóan. Visszont az EU Tanácsának több aflatoxinra vonatkozó rendelete van (EEC no 315/93, EC 591/85, EC 53/98, EC 466/2001), melyek megszabják ezen toxinok maximális értékeit is, mely értékek a pohánkára is érvényesek. Ezen rendelkezések alapján az össz aflatoxin koncentráció nem lehet magasabb mint $4 \mu\text{g}/\text{kg}$, a B1 aflatoxin koncentrációja pedig $2 \mu\text{g}/\text{kg}$. A vizsgált növényi részek esetében megállapíthatjuk, hogy az aflatoxin, bár jelen van, mennyisége nem haladja meg egy esetben sem a megengedett határértéket, tehát az általunk termesztett *F. esculentum* megfelel az aflatoxin tisztaságra utaló kritériumnak is.

A felületi radioaktivitás dozimetriás meghatározása során kapott valamennyi eredmény a természetes alapsugárzási intervallumban található. A normál érték intervallum $0,1 \mu\text{Sv}/\text{h}$ – $0,3 \mu\text{Sv}/\text{h}$ ($\mu\text{Siewert}/\text{h}$) közt van. Az általunk kapott sugárzási értékek az egerpataki kultúrák esetében: $0,19 \mu\text{Sv}/\text{h}/2003$ és $0,18 \mu\text{Sv}/\text{h}/2004$, valamint a marosvásárhelyiek esetében: $0,21 \mu\text{Sv}/\text{h}/2003$ és $0,22 \mu\text{Sv}/\text{h}/2004$. Mint látható minden érték a megengedett határérték közé esik. Mivel a *Fagopyri herba*-ban csak a természetes alapsugárzást mutattuk ki, ezért további radioaktív sugárzó izotóp meghatározásra nem került sor. A növényi drog nem szennyezett, eleget tesz az erre vonatkozó előírásoknak.

Következtetések

A dolgozatban összesített vizsgálati eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a biotermesztéssel nyert *Fagopyrum esculentum* megfelel mind a mikrobiológiai, mind a radioaktív tisztasági előírásoknak. Így akár az összcsíraszámot, mely $2 \times 10^{-4} - 86 \times 10^{-2}$ TKE/1g drog, akár az összgombaszámot, mely $2 \times 10^{-4} - 38 \times 10^{-2}$ /1 g drog közt van, tekintettük, ezek egyetlen próba esetében sem haladták meg a felső határértékeket, 10 baktérium/1g drog illetve 10 gomba/1 g drog. Ugyanakkor teljesen hiányzik az *E.coli* bacillus.

Bár az aflatoxin jelenlétét kimutattuk, a mennyiségi meghatározása azt mutatta, hogy koncentrációja 0,005-0,34 ppb közt van és sokkal alacsonyabb a megengedett határértéknél, 4 µg/kg.

Az általunk vizsgált növényminták méréseink alapján a sugárzás szempontjából is kielégítik mind a gyógyszerkönyvi, mind más nemzetközi előírások követelményeit, tehát nem tartalmaznak radioaktív szennyeződést.

Ismerve e szennyeződés típusok lehetséges forrásait, a termesztés folyamán követni tudtuk ezeket és így a gyógynövények termesztésbe vonása lehetővé tette e tisztasági követelmények minél jobb megvalósítását. Mivel mind a talaj, mind a nem megfelelő technológiai eljárások – a betakarítás, a szárítás, a tárolás – is károsíthatják a pohánka minőségét, szükséges mindezen tényezők figyelemmel való követése. Nagyon fontos a megfelelő minőségű termőtalaj kiválasztása, mely mikroflórája nem tartalmazza az aflatoxint termelő fajokat. Szintén fontos a növénytermesztési technológia, mint a megadott sor- és tőtávolság betartása, mivel egy magasabb páratartalmú és melegebb időjárás esetén a talaj mikroflórája gyorsan fejlődik, a sűrű kultúra pedig nem teszi lehetővé a növények közti szellőzést, így a fertőzés könnyen átterjed egyik növényről a másikra. Úgyszintén szárításkor is kell biztosítani a megfelelő levegőmozgást, hőmérsékletet, a tárolás során pedig az alacsony páratartalmat.

Következtetésként levonható, hogy a fent említett szennyeződés források kiküszöbölése, valamint az agro-technikai munkálatok pontos betartása lehetővé tette az ökotermesztett *Fagopyrum esculentum* szennyezettségét olyan szintre leszorítani, hogy a kapott értékek a jelenlegi szabványok előírásainak megfelelőjenek, sőt a megengedett határértékek alatt legyenek.

Irodalom

1. Abbas H.K., Zablutowicz R.M. et al. – *Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta Aspergillus isolates*, Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(3):193-199.
2. Bernáth J. – *Gyógy- és aromanövények*, Mezőgazdasági Könyvkiadó, Budapest, 2002.
3. Eaton D.L., Groopman J.D. – *Toxicology of Aflatoxins*, Academic Press, New York, 1994, 383-426.
4. Martins H.M., Martins M.L., Bernardo F. – *Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions*, Journal Food Microbiologie, 2001, 68(1-2): 149-153.
5. Mimica-Dukic N., Pavkov R.R., Lukic V. et al. – *Study of chemical composition and microbiological contamination of Chamomile tea*, Acta Horticulturae (ISHS), 1993, 333:137-142.
6. Nilufer D., Bayacioglu D. – *Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in tahini*, J. Agricultural Food Chemistry, 2002, 50(12): 3375-3379.
7. Park D.L., Miller B.M., Nesheim S. et al. – *Visual and semiquantitative spectrophotometric ELISA screening method for aflatoxin B in corn and peanut products follow-up collaborative study*, J. Association off Analytical Chemistry, 1989, 72(4): 638-643.
8. Spiridon Gh., Ciupercescu Victorița, Melpomeni Gh. – *Controlul calității nutrețurilor*, Editura Ceres, București, 1981.
9. ****European Pharmacopoea V Edition*, 2004.
10. ****Guidlines for Good Agricultural Practice (G.A.P.) of Medicinal and Aromatic Plants*, www.europam.net.
11. ****WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) fo medicinal plants*, WHO , Geneva, 2003 .