

doi:10.15199/48.2022.01.18

## Identyfikacja stopnia rozwoju pleśni z rodzaju *Aspergillus* w substancji biologicznej przy wykorzystaniu emisji fotonowej

**Streszczenie.** Ludzkość od wieków dotyka szkodliwe działanie metabolitów pochodzenia pleśniowego, czego skutkiem są zatrucia spowodowane spożyciem zapleśniałej żywności czy pasz. Do najbardziej szkodliwych metabolitów grzybowych zalicza się mykotoksyny [3]. Grzyby pleśniowe to mikroorganizmy należące do królestwa grzybów, wytwarzające strzępki jako wielojądrowe komórki, tworzące grzybnię. Grzyby z rodzaju *Aspergillus* mogą powodować niektóre choroby u ludzi. W Polsce prowadzono badania z wykorzystaniem zjawiska ultra słabej emisji fotonowej, oceniające jakość produktów spożywczych, w trakcie których zaobserwowano, że istnieje praktyczna możliwość różnicowania materii organicznej pod względem stopnia emisji fotonów. Celem badań było określenie wielkości i struktury emisji fotonów wybranych substancji biologicznych tj. owoców egzotycznych w trakcie ich degradacji, generowanych przez pleśń *Aspergillus*, której stopień ekspansji określono na podstawie liczby zarodników zidentyfikowanych na powierzchni owoców w kontrolowanych warunkach. Stwierdzono korelację między stopniem degradacji materii organicznej, liczbą zarodników a liczbą emitowanych fotonów. Możliwe jest określenie stopnia degradacji komórek biologicznych na podstawie analizy fotonowej, co daje nową metodę pomiarową nie wykorzystywaną w żadnym systemie kontroli jakości produktu.

**Abstract.** For centuries, mankind has been affected by the harmful effects of mold metabolites, resulting in poisoning caused by the consumption of moldy food or feed. The most harmful fungal metabolites include mycotoxins [3]. Molds are microorganisms that belong to the kingdom of fungi. Fungi of the genus *Aspergillus* can cause some human diseases [1]. In Poland, research was conducted using the phenomenon of ultra-weak photon emission, assessing the quality of food products, during which it was observed that there is a practical possibility of differentiating organic matter in terms of the degree of photon emission [5]. The aim of the study was to determine the size and structure of photon emission of selected biological substances, i.e. exotic fruit during their degradation, generated by *Aspergillus* mold, the expansion degree of which was determined on the basis of the number of spores identified on the fruit surface under controlled conditions. There was a correlation between the degree of degradation of organic matter, the number of spores and the number of emitted photons. It is possible to identify the degree of degradation of biological cells on the basis of photon analysis, which gives a new measurement method not used in any product quality control system. (**Identification of the degree of development of *Aspergillus* mold in a biological substance using photon emission**)

**Słowa kluczowe:** emisja fotonowa, pleśń, *Aspergillus*  
**Keywords:** photon emission, molds, *Aspergillus*

### Wstęp

Ludzkość od wieków dotyka szkodliwe działanie metabolitów pochodzenia pleśniowego, czego skutkiem są zatrucia spowodowane spożyciem zapleśniałej żywności czy pasz. Do najbardziej szkodliwych metabolitów grzybowych zalicza się mykotoksyny, będące wtórnymi produktami przemiany materii grzybów strzępkowych o różnym poziomie toksyczności dla ludzi i zwierząt. Obecnie do grupy mykotoksyn wchodzi około 400 związków chemicznych, powodujących zanieczyszczenie żywności [1]. Substancje te mają działanie toksyczne, a ich spożycie wywołuje wystąpienie chorób zwanych mykotoksykozami [2]. Współcześnie rozwój grzybów toksynotwórczych jest powodem ogromnych strat ekonomicznych w sektorze spożywczym [3]. Według FAO zanieczyszczonych co najmniej jedną mykotoksyną jest ok. 25% ziaren zbóż na świecie [4]. Psucie się żywności rozpoczyna się od zanieczyszczenia produktu zarodnikami grzybów, które kiełkują, tworząc widoczną grzybnię przed końcem okresu przydatności do spożycia produktu [5]. Grzyby pleśniowe są zdolne do kolonizowania na wszystkich rodzajach żywności [6-8]. Wszystkie układy biologiczne są w stanie w sposób ciągły, bez zastosowania bodźców zewnętrznych lub luminoforów, emitować bardzo słabe światło. Zjawisko to, określa się jako bardzo słaba emisja fotonu. Występuje ono praktycznie we wszystkich układach metabolicznie aktywnych. Obecnie ultra- słaba emisja fotonów znajduje swoje zastosowanie w chemii żywności i skupia się głównie na kontroli jakości różnego rodzaju żywności, będącej fundamentalnym elementem pozwalającym na wprowadzenie danego produktu na rynek [9-11]. W Polsce prowadzono badania z wykorzystaniem zjawiska ultra słabej emisji fotonowej, oceniające jakość produktów spożywczych takich jak owoce, ocet, oliwa z oliwek, pieczywo, czekolada i herbata [10,12-15]. W trakcie badań prowadzonych przez zespół Kielbasy, dotyczących

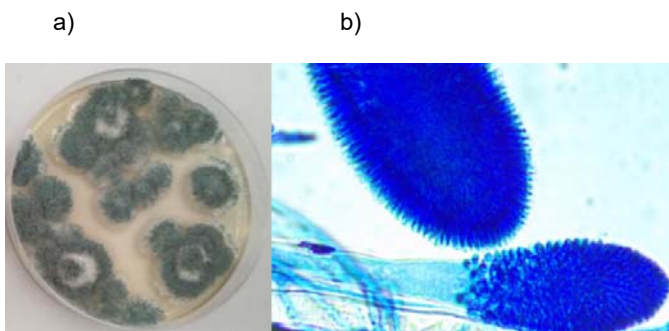
wykorzystania ultrasłabej emisji fotonowej do oceny jakości produktów, zaobserwowano, że istnieje praktyczna możliwość różnicowania materii organicznej pod względem stopnia emisji fotonów [16,17]. Rodzaj *Aspergillus* od kilkudziesięciu lat jest przedmiotem badań naukowych i zastosowań przemysłowych. Po raz pierwszy zyskał praktyczne znaczenie w 1919 r., kiedy wykorzystano przemysłowo zdolność *Aspergillus niger* do produkcji kwasu cytrynowego. Jednak od lat sześćdziesiątych rodzaj stał się źródłem wielu enzymów, które są dobrze znane jako środki techniczne w przetwórstwie owoców, pieczeniu oraz w przemyśle skrobiowym i spożywczym. W naturze rodzaj ten występuje w glebie i ściółce, kompoście i rozkładającym się materiale roślinnym. *Aspergillus* jest powszechnie uważany za organizm bezpieczny. Jest to udokumentowane w wykazach organizacji odpowiedzialnych za bezpieczeństwo i higienę pracy. Ludzie są codziennie narażeni na jego zarodniki bez widocznej choroby. Tylko w nielicznych przypadkach rodzaj *Aspergillus* jest w stanie skolonizować ludzkie ciało jako oportunistyczny patogen i prawie we wszystkich przypadkach powodował u pacjentów ciężkie choroby wymagające leczenia immunosupresyjnego [18]. Rodzaj *Aspergillus* jest zdolny do syntezy mykotoksyn. Głównie syntetyzuje alfatoksyny i ochratoksyny. Aflatoksyny produkowane przez *Aspergillus* sp. są najczęściej spotykane w produktach roślinnych i mogą wtórnie gromadzić się w jajach i mięsie oraz mleku. Aflatoksyny, w szczególności B1, należą do substancji rakotwórczych i odpowiadają m.in. za powstawanie nowotworu wątroby. Ochratoksyny to mykotoksyny produkowane przede wszystkim przez pleśń z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus*. Najważniejsza ochratoksyna A jest wytwarzana przez kilka szczepów grzybów *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium verrucosum*. Ochratoksyna A występuje zazwyczaj w produktach źle wysuszonych

i nieprawidłowo składowanych. Jeśli skażona pasza zostanie podana zwierzęciu, a zwłaszcza trzodzie chlewnej, możliwa jest akumulacja w mięsie, narządach i krwi [19]. Autorzy skupiają się w artykule na możliwości zastosowania zjawiska ultra słabej emisji fotonowej jako metody umożliwiającej identyfikację stopnia degradacji komórek biologicznych spowodowaną wystąpieniem na żywności zarodników grzybów pleśniowych. Pozwoli to określić jeszcze nie stosowaną metodę pomiarową w kontroli jakości produktów żywnościowych.

Celem pracy było określenie wielkości i struktury emisji fotonowej wybranych owoców egzotycznych - banana oraz pomarańczy, w czasie ich degradacji generowanej przez pleśń z rodzaju *Aspergillus*, której stopień ekspansji określano na podstawie liczby zarodników zidentyfikowanych na powierzchni owoców w warunkach kontrolowanych.

### Metodyka

W badaniach wykorzystano pleśń z rodzaju *Aspergillus* znajdującą się w kolekcji Laboratorium Eksperymentalnych Techniki Badawczych Surowców i Produktów Biologicznych, pozyskaną wcześniej z owoców. Przy użyciu jałowej jednorazowej wymazówki, pobrano zarodniki badanej pleśni, którą następnie trójpunktowo posiano na podłożę stałe Sabouraud (Rys 1a). Płytki Petriego inkubowano do góry dnem w cieplarni laboratoryjnej w temperaturze 28°C przez 7 dni (Rys 1b). Owoce przed eksperymentami zostały obrane i ważone oraz umieszczone na płytkach Petriego. Przy użyciu jałowej wymazówki pobrano zarodniki pleśni *Aspergillus* i przeniesiono je do roztworu soli fizjologicznej, uzyskując zawiesinę o gęstości optycznej 0,5 w skali McFarlanda. Gęstość optyczną mierzono przy użyciu densytometru DEN-1B.

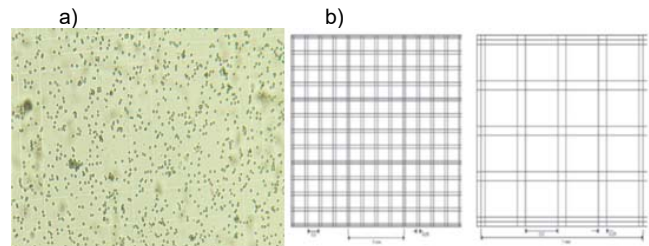


Rys. 1. Pleśń z rodzaju *Aspergillus* a) kolonie wyrosłe po 7 dniach inkubacji; b) widok mikroskopowy

Następnie przygotowane fragmenty owoców banana i pomarańczy zainfekowano, poprzez naniesienie na nie 100 µl zawiesiny z zarodnikami pleśni. Zainfekowane owoce zabezpieczono i przeniesiono do cieplarni, w której były przechowywane przez 7 dni w temperaturze 28°C. Po zainfekowaniu owoców zarodnikami badaną pleśnią z rodzaju *Aspergillus*, każdego następnego dnia monitorowano przyrost zarodników tej pleśni, poprzez ich pobranie z materiału zwilżoną solą fizjologiczną wymazówką i wykonanie zawiesiny. Następnie przy użyciu komory Bürkera obliczano liczbę zarodników (rys. 2). Liczbę zarodników obliczono ze wzoru:

$$L = 2,5 * 10^5 * a * n$$

gdzie: a – średnia liczba komórek w pojedynczym kwadracie; n – rozcieńczenie badanej próbki.

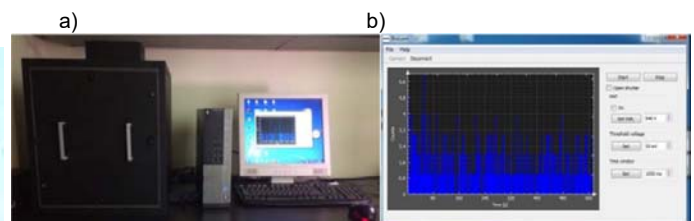


Rys. 2. Komora Bürkera: a) widok mikroskopowy; b) budowa komory

Emisję fotonową wyznaczono z wykorzystaniem procedury badawczej Laboratorium, posiadającego akredytację Polskiego Centrum Akredytacji nr AB 1698. Pojedynczy pomiar trwał 30 minut i był wykonywany co 24 godzinny. Przed analizą fotonową, próbkę każdorazowo ważono, zaznaczając, że za każdym razem do danej analizy używano tej samej próbki. Codziennie, przed wykonaniem pomiaru badanej próby, wykonywano pomiary pustej komory, w celu kontroli sprawności sprzętu oraz czystości pomiarów. Wyznaczając ultra słabą emisję fotonową wykorzystano metodę zliczania pojedynczych fotonów. Wynik pomiaru ultra słabej emisji fotonowej stanowi bezwzględną różnicę między liczbą fotonów zarejestrowanych przez fotopowielacz w komorze światłoszczelnej z materiałem i bez materiału, wg zależności:

$$L=A-B \text{ [foton]},$$

gdzie: L – liczba fotonów emitowanych przez badaną próbkę, A - liczba fotonów emitowana przez próbkę umieszczoną w komorze światłoszczelnej, B - liczba wskazań (fotonów) generowana przez pustą komorę światłoszczelną.

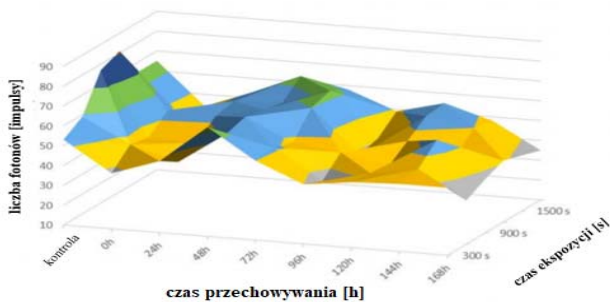


Rys. 3. Stanowisko do pomiarów ultra słabej emisji fotonowej a) układ pomiarowy; b) program umożliwiający zliczanie pojedynczych fotonów

### Wyniki

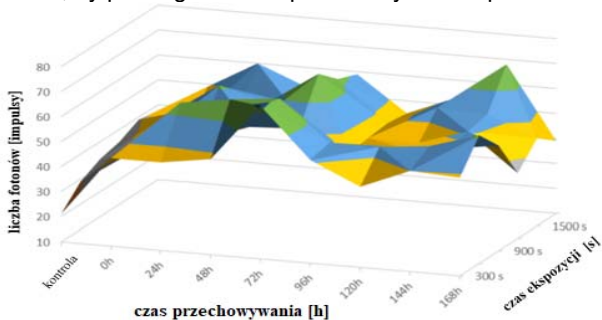
Z otrzymanych danych sporządzono trójwymiarowe zestawienie emisji fotonowej generujących się w następujące struktury. Na rysunku 4 przedstawiono strukturę intensywności emisji fotonowej w czasie ekspozycji materiału w komorze pomiarowej w odniesieniu do czasu przechowywania banana i adekwatnej do tego czasu liczbie zarodników pleśni *Aspergillus clavatus*. Odnotowano, że w początkowej fazie przechowywania (pierwsze 24 godziny) intensywność emisji fotonów była najwyższa wynosząc ponad 18% sumarycznej liczby zidentyfikowanych fotonów w całym cyklu doświadczenia. Najwyższymi wartościami emisji fotonów w każdym interwale czasu ich zliczania w stosunku do pozostałych analizowanych próbek charakteryzowała się próbka kontrolna, gdzie w przedziale czasu emisji między 900 sekund a 1200 sekund wynosiła 81 fotonów (kolor pomarańczowy i granatowy). Analizując próbki rzeczywiste zaobserwowano, że emisja fotonów w poszczególnych czasach ekspozycji była dość wyrównana i oscylowała wokół wartości 300 fotonów. Po 24 godzinach zaobserwowano wzrost ilości emitowanych fotonów

szczególnie w pierwszym interwale czasowym (300 sekund) oraz po 1200 sekundach czasu przebywania w komorze z fotopowielaczem (kolor zielony). Najniższe wartości odnotowano po 168-ośmiu godzinach przechowywania substancji, w każdym interwale czasowym i oscylowały one pomiędzy 32 a 44 emitowane fotony. Zostało zauważone, że intensywności emisji fotonów wraz z czasem przechowywania ulegała stabilizacji. Analizując trend sumarycznej emisji fotonów z owocu banana w czasie jego przechowywania i rozwoju zarodników pleśni *Aspergillus clavatus* zaobserwowano paraboliczny charakter emisji tj. początkowo emisja jest wysoka, następnie spada, by znów powoli rosnąć. Porównując charakterystykę emisji fotonów z charakterystyką liczby zarodników można zaobserwować pewne podobieństwo trendu.



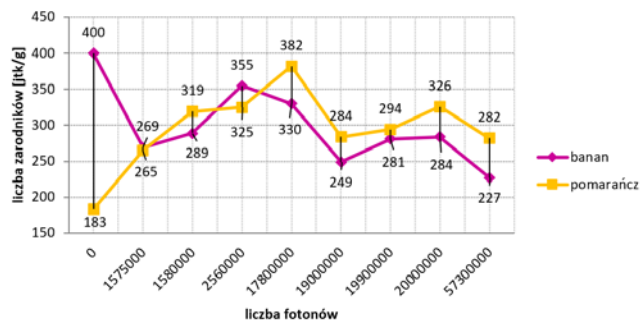
Rys. 4. Wykres przedstawiający strukturę ilości fotonów dla zarodników *Aspergillus clavatus* na bananie w czasie

Na kolejnym rysunku (rys. 5) przedstawiono intensywność emisji fotonowej w czasie na pomarańczy z zarodnikami pleśni *Aspergillus clavatus*. Średnia ilość emitowanych fotonów dla próbki kontrolnej (kolor czerwony) okazała się niższa o prawie 60% od średniej ilości emitowanych fotonów we wszystkich fazach przechowywania dla próbki zarażonej zarodnikami, która podobnie jak w przypadku owocu banana oscylowała wokół wartości 300 fotonów. Analizując strukturę emisji fotonowej najniższe wartości odczytano w średnim interwale czasowym wynoszącym 1200 sekund i wynosiły one między 35 fotonów (168 godzina przechowywania, kolor szary) a 69 fotonów (72 godzina przechowywania, kolor żółty). Odnotowano niewielki wzrost ilości emitowanych fotonów po 120 godzinach przechowywania dla ostatniego interwału czasowego (1800 sekund) jednak po analizie wszystkich interwałów czasowych po 96-sześciu godzinach przechowywania stwierdzono, że miało to charakter epizodyczny. Ponadto stwierdzono, że wraz z długością przechowywania rosła stabilność emisji fotonów w czasie ekspozycji. Linia trendu sumarycznej emisji fotonowej kreowała się w następujący sposób: z dość niskiego pułapu diametralnie rosła do pewnego momentu (24 godziny) następnie utrzymując się na poziomie stabilnego, lekkiego wzrostu, by po 72 godzinach przechowywania opadać.

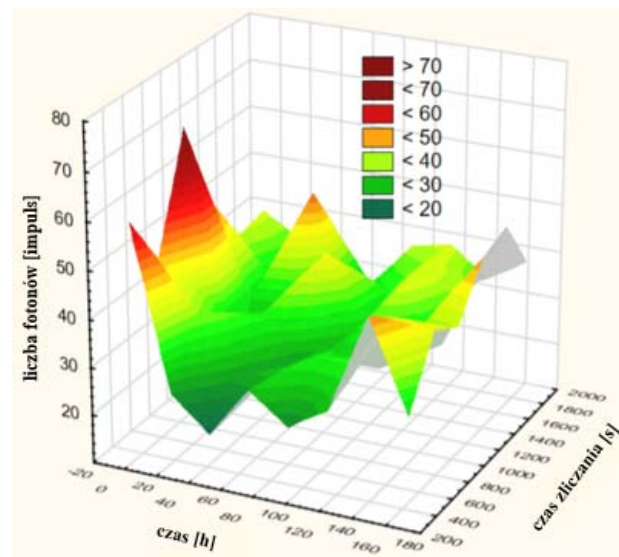


Rys. 5. Wykres przedstawiający ilość fotonów w czasie na pomarańczy zarażonej *Aspergillus clavatus*

Tempo wzrostu ilości zarodników pleśni *Aspergillus clavatus* na owocach i tym samym zależność psucia się materiału w wyniku zarażenia tym rodzajem grzybów strzępkowych do ilości emitowanych fotonów została przedstawiona na rysunku 6. Pomijając początkowe stadia adaptacji zarodników na nowym podłożu ustalono, że ilość emitowanych fotonów wykazała dużą korelację od ilości zarodników pleśni *Aspergillus clavatus*. Stwierdzono, że gdy liczba zarodników była niska ilość emitowanych fotonów była wysoka. Gdy ilość zarodników rosła ilość emitowanych cząstek również ulegała zmianie – na początku rosła i utrzymywała się na stosunkowo równym poziomie to po przekroczeniu pewnych wartości (17,8 mln [jtk/g] zarodników) wyraźnie malała.



Rys. 6. Wykres przedstawiający wzrost ilości zarodników *Aspergillus clavatus* na owocach oraz ilość sumy emitowanych fotonów



Rys. 7. Ilość emitowanych fotonów w czasie na owocach zarażonych *Aspergillus clavatus*

Niezależnie od podłoża początkowa ilość emitowanych fotonów wydaje się być niezależna od ilości zarodników występujących na owocach. Zauważono, że im więcej zarodników pleśni występuje na owocach oraz im dłużej znajdują się na materiale tym fotony emitowane z całej substancji stają się zależne od tych czynników (rys. 7)

### Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że istnieje korelacja między stopniem degradacji owoców przez pleśń *Aspergillus clavatus* a rosnącą ilością zarodników i liczbą emitowanych fotonów. Oszacowano krytyczny z punktu widzenia zdrowotnego interwał czasowy rozwoju pleśni pozwalający na opracowanie oryginalnej metodyki. Metodyka ta może zostać wykorzystana jako marker jakościowy pozwalający zidentyfikować potrzebę szczegółowych analiz chemicznych produktu.

**Autorzy:** mgr inż. Anna Miernik, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki, ul. Balicka 116B, 30-149 Kraków, E-mail: [anna.miernik@urk.edu.pl](mailto:anna.miernik@urk.edu.pl); inż. Aneta Łopatka Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki, ul. Balicka 116B, 30-149 Kraków,

#### LITERATURA

- [1] Piotrowska M. 2012. Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn z żywności i pasz. *Postępy Mikrobiologii*. T. 51. Z. 2 s. 109–119.
- [2] Chełkowski J. 2010. Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy [online]. [Dostęp 28.05.2013]. Dostępny w Internecie: <http://www.cropnet.pl/dbases/mycotoxins.pdf.pl/download>
- [3] CAST 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task force report. No 139. Ames, Iowa, USA. ISSN 0194-4088 ss. 216.
- [4] Krzyzewski J. 2008. Składniki antyodżywcze w dietach krów mlecznych. *Bydło*. Nr 4 s. 8–13
- [5] Dagnas S., Membré J.M. Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food Products. *Journal of Food Protection*, Vol. 76, No. 3, 2013, Pages 538–551 doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-349
- [6] Tipples. K.H. (1995) Quality and nutritional changes in stored grain. In: D.S. Jnyas. N.D.G. White and W.E. Muir (editors). *Stored Grain Ecosystems*. Marcel Dekker. New York. pp. 325–351.
- [7] Jakubowski T. The influence of microwave radiation at the frequency 2.45 GHz on the germination, *Przegląd Elektrotechniczny*, 94 (2018), nr 12, 254–257, DOI10.15199/48.2018.12.58
- [8] Jakubowski T. Effects of microwave radiation on the germination of *Solanum Tuberosum* L. tubers, *Bangladesh Journal of Botany*, 45 (2016), nr 5, 1255–1257
- [9] Cifra M., Pospisil P. Ultra-weak photon emission from biological samples: Definition, mechanisms, properties, detection and applications, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* (2014).
- [10] Oziembłowski M., Drózdź M., Kielbasa P., Drózdź T., Gąsiorowski A., Nawara P., Tabor S. Ultra słaba luminescencja (USL) jako potencjalna metoda oceny jakości żywności tradycyjnej, *Przegląd elektrotechniczny*, R. 93 NR 12/2017, 131–134.
- [11] Syrotiuk V., Syrotiuk S., Ptashnyk V.; Tryhuba A., Baranovych S. Gielzecki J. Jakubowski T. A hybrid system with intelligent control for the processes of resource and energy supply of a greenhouse complex with application of energy renewable sources, *Przegląd Elektrotechniczny*, R. 96 (2020), nr 7, 149–152, DOI 10.15199/48.2020.07.28
- [12] Trzyniec K., Kielbasa P., Oziembłowski M., Drózdź M., Nawara P., Posyłek Z., Leja R. Wykorzystanie emisji fotonów do oceny jakości jabłek, *Przegląd elektrotechniczny*, R. 93 NR 12/2017, 183–186.
- [13] Trzyniec K., Popardowski E., Juliszewski T., Baran D., Miernik A. Wykorzystanie ultra słabej emisji fotonowej do klasyfikacji oceny jakości czekolad, *Przegląd elektrotechniczny*, R. 95 NR 12/2019, 229–232.
- [14] Nawara P., Trzyniec K., Drózdź T., Popardowski E., Juliszewski T., Zagórda M., Miernik A. Analiza możliwości identyfikacji parametrów jakościowych oliwy przy wykorzystaniu ultra słabej luminescencji wtórnej, *Przegląd elektrotechniczny*, R.96 NR 2/2020, 117–120.
- [15] Miernik A., Kielbasa P., Findura P., Byrska K. Influence of the constant electric field on the photon emission characteristics of selected utility cultivars of the *Camellia* plant, *Journal of Physics - Conference Series*, 2021, nr 1782, s.1–8, Numer artykułu:012021. DOI:10.1088/1742-6596/1782/1/012021
- [16] Kielbasa P., Drózdź T., Nawara P., Drózdź M. 2017. Wykorzystanie emisji biofotonów do parametryzacji jakościowej produktów spożywczych. *Przegląd Elektrotechniczny*, nr 1, s. 153–156
- [17] Kielbasa P., Drózdź T., Nawara P., Drózdź M., Trzyniec K. 2018. Assessment of the potential of using photon emission to identify selected qualitative features of organic matter. *Applications of Electromagnetics in Modern Techniques and Medicine (PTZE)*. Raclawice, Poland, Page s: 117 – 120, DOI: 10.1109/PTZE.2018.8503186.
- [18] Schuster, .E., Dunn-Coleman, .N., Frisvad, .J. et al. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 426–435 (2002). <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>
- [19] Krakowiak D., Łopatniuk O, Bohacz J. 2021. Pleśnie i mykotoksyny w produktach żywnościowych o niskiej i wysokiej aktywności wodnej, *Wybrane zagadnienia z zakresu produkcji surowców, żywności i kosmetyków*, Lublin 58–64.