

Fungal contamination and occurrence of *Fusarium* toxins in maize in the years 2009–2011 in Poland

Skazenia grzybami i występowanie toksyn *Fusarium* w ziarnie kukurydzy w latach 2009–2011 w Polsce

Magdalena Twarużek, Jan Grajewski, Anna Błajet-Kosicka

Summary

The material investigated in 2009–2011 were 203 samples of maize grain. The aim of the study was to evaluate the content of the mycotoxins: deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), T-2 toxin, HT-2 toxin, zearalenone (ZEA) and fumonisins (FUM) using a high performance liquid chromatography (HPLC) with MS/MS (tandem mass spectrometry) detection and mycological analysis of selected samples. Identified species of fungi confirmed that the maize grain was dominated by moulds of the toxicogenic potential. All the analyzed samples revealed the presence of *Fusarium* mycotoxins with varying level in each year of the study.

Key words: maize, moulds, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, mycotoxins

Streszczenie

Materiał badawczy w latach 2009–2011 stanowiły 203 próby ziarna kukurydzy. Celem badań była ocena zawartości mikotoksyn: deoksyniwalenolu (DON), niwalenolu (NIV), toksyny T-2, toksyny HT-2, zearalenonu (ZEA) i fumonizyn (FUM) przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC MS/MS (high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry) oraz analiza mikologiczna wybranych prób. Wykryte rodzaje grzybów potwierdziły, że w ziarnie kukurydzy dominują pleśnie o potencjale toksynotwórczym. We wszystkich analizowanych próbach stwierdzono obecność mikotoksyn fuzaryjnych, których poziom był różny dla poszczególnych lat objętych badaniami.

Słowa kluczowe: kukurydza, pleśń, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, mikotoksyny

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Zakład Fizjologii i Toksykologii
Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz
twarmag@ukw.edu.pl

Wstęp / Introduction

Kukurydza (*Zea mays* L.) stanowi około 30% światowej produkcji zbóż i zajmuje trzecie miejsce po pszenicy i ryżu. Ze względu na opłacalność uprawy w ostatnich latach wzrasta powierzchnia jej zasiewów w naszym kraju (Korbas 2006). Uprawa kukurydzy na ziarno w Polsce do niedawna ograniczona była głównie do cieplejszych regionów, takich jak: Dolny Śląsk i południowa Wielkopolska. Aktualnie obserwujemy przesunięcie zasięgu uprawy na północ Polski. Spowodowane to jest wzrostem temperatury związanym ze skutkami globalnego ocieplenia (Dubas i Michalski 2002) i dystrybucją odpowiednich odmian. Nie każdy rok pod względem warunków klimatycznych był korzystny dla wzrostu kukurydzy. Panujące w Polsce zmienne warunki pogodowe (charakterystyczne dla strefy klimatu umiarkowanego) są szczególnie sprzyjające dla rozwoju grzybów pleśniowych. Za najgroźniejsze uważa się obecnie grzyby rodzaju *Fusarium*, będące sprawcami zgorzeli siewek, zgnilizny korzeni czy zgorzeli podstawy łodygi, ale także niebezpiecznej fuzariozy kolb. Fuzarioza roślin, a szczególnie kolb, powoduje ubytki plonu i w dużym stopniu pogarsza higieniczny status ziarniaków. Grzyby pleśniowe polowe posiadają zdolność produkowania drugorzędowych metabolitów (mikotoksyn), których poziom gwałtownie wzrasta po wczesnych, jesiennych przymrozkach lub skażeniu kolb przez *Ustilago maydis*. Jedną z najliczniejszych grup mikotoksyn wytwarzanych przez grzyby rodzaju *Fusarium* są trichoteceny grupy A i B (deoksyniwalenol, niwalenol, toksyna T-2, toksyna HT-2), zearalenon oraz fumonizyny (Tekiel i wsp. 2005; Grajewski 2006). Brak możliwości ochrony kukurydzy przed fuzariozą kolb czy głównie guzowatą w niesprzyjających latach skutkuje wysokim skażeniem ziarna mikotoksynami i nagromadzeniem zarodników grzybów pleśniowych (Chełkowski 1981). Wykrywane metabolity pleśni w ziarnie kukurydzy, mogą stanowić zagrożenie zdrowotne dla zwierząt, a także na drodze przenoszenia u człowieka (Korbas i wsp. 2007). Niebezpieczeństwo to ostatnio wzrasta przez zwiększoną produkcję DDGS (Dried Distillers Grains with Solubles), którego jakość mikotoksykologiczna budzi obawy (Korol i wsp. 2010).

Celem badań była ocena zawartości mikotoksyn: deoksyniwalenolu (DON), niwalenolu (NIV), toksyny T-2, toksyny HT-2, zearalenonu (ZEA) oraz fumonizyn (FUM) w ziarnie kukurydzy, stosując technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (high performance liquid chromatography) z podwójną spektrometrią mas oraz dodatkowo analiza mikologiczna wybranych prób.

Materiały i metody / Materials and methods

Badania przeprowadzono w latach 2009–2011. Ogółem przebadano 203 próby ziarna kukurydzy z terenu całej Polski. W poszczególnych latach zawartość mikotoksyn: DON, NIV, toksyny T-2, toksyny HT-2, ZEA analizowano w następującej liczbie prób: n = 68 (2009), n = 81 (2010), n = 54 (2011). W przypadku fumonizyn ilości prób były następujące: n = 42 (2009), n = 51 (2010), n = 23 (2011).

W wybranych próbach przeprowadzono dodatkowo ocenę mikologiczną: 37 prób (2009), 9 prób (2010), 9 prób (2011).

W przypadku badań mikologicznych oznaczono ogólną liczbę grzybów oraz przeprowadzono identyfikację do rodzaju z procentowym udziałem poszczególnych grzybów pleśniowych.

Badania mikologiczne

Materiał o minimalnej wadze 500 g dokładnie wymieszano i zmielono w warunkach jałowych. Przygotowano nawązkę w jałowym worku do homogenizatora typu Stomacher, o wadze $20 \pm 0,2$ g. Materiał zawieszono w $180 \pm 2\%$ ml jałowego płynu do rozcieńczeń, przygotowanego według PN EN ISO 6887-1, lipiec 2000 i homogenizowano przez 90 sekund.

Oznaczenie ogólnej liczby grzybów wykonano według PN ISO 7954, wrzesień 1999 z modyfikacją własną (posiew powierzchniowy po 1 ml i 0,1 ml w trzykrotnym powtórzeniu). Ze shomogenizowanej zawiesiny wyjściowej (materiał rozcieńczony 1:10) wykonano serię rozcieńczeń. Posiew powierzchniowy według Kocha wykonano na podłożach YGC oraz DG18 przeznaczonych do izolacji grzybów kserofilnych. Inkubację prowadzono przez 5–7 dni (10–14 dni w przypadku grzybów kserofilnych) w temperaturze $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Po okresie inkubacji zliczono wyrosłe kolonie z zakresu nieprzekraczającego od 10 do 100 kolonii. Rozdziału na grzyby anamorfiniczne i drożdżaki wykonano na podstawie preparatów mikroskopowych. Wyniki wyrażono jako ilość jednostek tworzących kolonie na 1 gram próby [jtk/g] grzybów (grzyby anamorfiniczne + drożdżaki). Z kolonii wyrosłych na podłożu YGC oraz DG18 wykonano preparaty mikroskopowe w laktofenolu według Amanna, według PN-R-64791, grudzień 1994. Na podstawie morfologii kolonii oraz typu zarodnikowania wyodrębniono dominujące rodzaje grzybów anamorfinicznych. Wykonano obliczenia [jtk/g] dla każdego z wstępnie oznaczanego rodzaju.

Analiza mikotoksyn

Przygotowanie próby do analizy toksykologicznej rozpoczęto od rozdrobnienia jej w młynie ultraodśrodkowym ZM 200 (Retsch).

Trichoteceny i zearalenon

Odważono 12,5 g próby, dodano 50 ml ACN:H₂O (80:20). Próbę homogenizowano 3 minuty, następnie przesączono na sączku karbowanym. Do 4 ml przesącza dodano 40 ul roztworu ZAN (zearalenon), wymieszano i naniesiono na kolumnkę BondElut Mycotoxin (Varian). Do 2 ml oczyszczonego ekstraktu dodano wzorce wewnętrzne: 13C-DON, 13C-HT-2, 13C-T-2, całość osuszono w strumieniu azotu w 40°C , a następnie rozpuszczono w 0,5 ml roztworu MeOH:H₂O (1:4).

Fumonizyny

Odważono 10,0 g próby, dodano 40 ml ACN:MeOH:H₂O (1:1:2). Próbę homogenizowano 3 minuty, następnie przesączono na sączku karbowanym. Za pomocą 1 M

NaOH doprowadzono pH roztworu do 6–7. Do zlewki zawierającej 24 ml roztworu MeOH:H₂O (3:1) dodano 6 ml ekstraktu, całość przesączono przez sączek drobnowłóknisty. 20 ml ekstraktu naniesiono na kolumnkę Multi Sep 211 Fum (Romer Labs). Po przepłukaniu kolumnki 8 ml MeOH:H₂O (3:1) oraz 3 ml MeOH, toksyny eluowano 10 ml MeOH:CH₃COOH (99:1). Eluat odparowano w strumieniu azotu w 50°C, a następnie rozpuszczono w 1 ml roztworu ACN:H₂O (1:1).

Toksyny analizowano przy użyciu chromatografu cieczowego (Agilent) z detektorem spektrometrii mas: HPLC-MS/MS (3200 QTRAP). Do rozdzielania chromatograficznego zastosowano kolumnę chromatograficzną Gemini C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm) (Phenomenex). Jako fazy ruchome użyto A: H₂O + 5 mM CH₃COONH₄ + 1% CH₃COOH oraz B: MeOH + 5 mM CH₃COONH₄ + 1% CH₃COOH. Zastosowano przepływ o wartościach: 0,7 ml/min (trichoteceny i ZEA) i 0,5 ml/min (FUM) oraz objętości nastrzyku 20 μl (trichoteceny i ZEA) oraz 15 μl (FUM).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Wyniki badań mikologicznych przedstawiono w tabeli 1. Najniższym skażeniem charakteryzowały się próby z 2009 roku. Najwyższe skażenie grzybami pleśniowymi stwierdzono w 2011 roku na poziomie $8,0 \times 10^5$ jtk/g. Każdego roku dominującymi pleśniami były grzyby z rodzaju *Fusarium*, których procentowy udział w kolejnych latach był następujący: 28, 42 i 27%.

dominującym rodzajem pleśni był rodzaj *Penicillium* z procentowym udziałem w poszczególnych latach odpowiednio: 13, 21 i 13%. Z podobnym udziałem procentowym występował również rodzaj *Mucor*: 16, 14, 12%. Wykryte ilości kolonii i rodzaje grzybów potwierdzają, że dominują w ziarnie kukurydzy pleśnie o potencjale toksynotwórczym.

Zawartość analizowanych mikotoksyn przedstawiono w tabelach 2–7. Każdego roku wykrywane były wszystkie analizowane mikotoksyny. Dominującą toksyną był DON, oznaczony odpowiednio w 96, 99 i 98% prób. Najwyższy jego poziom stwierdzono w próbach z 2010 r. na poziomie 48 500 μg/kg, z średnią zawartością 1434 μg/kg. NIV w najwyższym poziomie wykryto w próbach z 2011 r. na poziomie 4573 μg/kg. Również dla tego roku odnotowano najwyższy procent prób pozytywnych – 83%. Najniższą wartość średnią – 16,5 μg/kg NIV wykryto w 2009 r. W roku tym również zaobserwowano najniższy procent prób pozytywnych – 44%. Dla toksyn T-2 i HT-2 najwyższą średnią zawartość stwierdzono w 2010 r., odpowiednio – 54 i 125 μg/kg. Najniższy procent prób pozytywnych dla obydwu toksyn odnotowano dla 2009 r., odpowiednio – 65 i 62%. W przypadku ZEA procent prób pozytywnych stanowił najwyższą wartość spośród analizowanych mikotoksyn z 100% udziałem prób pozytywnych w 2010 r. Maksymalną wartość 4009 μg/kg stwierdzono w próbie z 2011 r. Najniższą wartość średnią 33,2 μg/kg zanotowano w 2009 r. Fumonizyny najczęściej wykrywano w 2011 r. (70% prób pozytywnych) z najwyższym maksymalnym poziomem 1885 μg/kg.

Tabela 1. Zawartość grzybów w próbach ziarna kukurydzy w poszczególnych latach oraz procentowy udział pleśni
Table 1. The contents of fungi in maize grain in different years and the percentage share of moulds

	2009	2010	2011
Min – Max Ogólnej liczby grzybów Total amount of fungi	nieobecne w no evidence in 0,1 g – $7,8 \times 10^5$ jtk/g	$3,6 \times 10^2$ jtk/g – $4,0 \times 10^5$ jtk/g	< 100, K – $8,0 \times 10^5$ jtk/g
Min – Max Ogólnej liczby pleśni Total amount of moulds	nieobecne w no evidence in 0,1 g – $3,6 \times 10^5$ jtk/g	$3,4 \times 10^2$ jtk/g – $2,8 \times 10^5$ jtk/g	< 50, K – $7,9 \times 10^5$ jtk/g
Min – Max Ogólnej liczby drożdży Total amount of yeast	nieobecne w no evidence in 0,1 g – $4,2 \times 10^5$ jtk/g	< 50, K – $3,3 \times 10^5$ jtk/g	< 20, K – $4,9 \times 10^5$ jtk/g
Pleśnie dominujące Dominant moulds	28% <i>Fusarium</i> 16% <i>Mucor</i> 13% <i>Penicillium</i> 11% <i>Acremonium</i> 9% <i>Endomyces</i> 6% <i>Cladosporium</i> 5% <i>Verticillium</i> 5% n.z. 3% <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Aureobasidium</i> 2% <i>Absidia</i> 1% <i>Rhizopus</i>	42% <i>Fusarium</i> 21% <i>Penicillium</i> 14% <i>Mucor</i> 6% <i>Acremonium</i> 5% <i>Endomyces</i> 4% <i>Aureobasidium</i> 4% n.z. 2% <i>Alternaria</i> 2% <i>Cladosporium</i> 1% <i>Rhizopus</i> 1% <i>Aspergillus</i>	27% <i>Fusarium</i> 24% <i>Eurotium</i> 13% <i>Penicillium</i> 12% <i>Mucor</i> 11% <i>Endomyces</i> 9% <i>Cladosporium</i> 2% <i>Acremonium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> 2% n.z.

n.z. – nie zidentyfikowane – not identified

jtk/g – jednostki tworzące kolonie/g – colony forming units/g

Tabela 2. Zawartość deoksynivalenolu w ziarnie kukurydzy w latach 2009–2011
 Table 2. The content of deoxynivalenol in maize grain from in 2009–2011

		Deoksynivalenol – Deoxynivalenol [µg/kg]		
		2009	2010	2011
Ziarno kukurydzy Grain of maize	próby / próby pozytywne samples / positive samples	68/65 (96%)	81/80 (99%)	54/53 (98%)
	średnia average	413	1434	1048
	mediana median	213	484	624
	maksimum maximum value	4405	48500	4919
	średnia (próby pozytywne) average (positive samples)	432	1452	1068

Tabela 3. Zawartość niwalenolu w ziarnie kukurydzy w latach 2009–2011
 Table 3. The content of nivalenol in maize grain in 2009–2011

		Niwalenol – Nivalenol [µg/kg]		
		2009	2010	2011
Ziarno kukurydzy Grain of maize	próby / próby pozytywne samples / positive samples	68/30 (44%)	81/56 (69%)	54/45 (83%)
	średnia average	16,5	36,8	106
	mediana median	n.w.	< 30	20,3
	maksimum maximum value	76,8	769	4573
	średnia (próby pozytywne) average (positive samples)	37,3	53,2	127

n.w. – nie wykryto – not detected

Tabela 4. Zawartość toksyny T-2 w kukurydzy w latach 2009–2011
 Table 4. The content of T-2 toxin in maize grain in 2009–2011

		Toksyna T-2 – T-2 toxin [µg/kg]		
		2009	2010	2011
Ziarno kukurydzy Grain of maize	próby / próby pozytywne samples / positive samples	68/44 (65%)	81/73 (90%)	54/43 (80%)
	średnia average	12,4	54,0	36,1
	mediana median	3,60	7,74	5,44
	maksimum maximum value	112	878	434
	średnia (próby pozytywne) average (positive samples)	19,1	59,9	45,4

Tabela 5. Zawartość toksyny HT-2 w ziarnie kukurydzy w latach 2009–2011
 Table 5. The content of HT-2 toxin in maize grain in 2009–2011

		Toksyna HT-2 – HT-2 toxin [µg/kg]		
		2009	2010	2011
Ziarno kukurydzy Grain of maize	próby / próby pozytywne samples / positive samples	68/42 (62%)	81/69 (85%)	54/43 (80%)
	średnia average	13,5	125	36,5
	mediana median	< 5	13,6	7,50
	maksimum maximum value	106	3840	322
	średnia (próby pozytywne) average (positive samples)	21,8	147	45,9

Tabela 6. Zawartość zearalenonu w ziarnie kukurydzy w latach 2009–2011
 Table 6. The content of zearalenone in maize grain in 2009–2011

		Zearalenon – Zearalenone [µg/kg]		
		2009	2010	2011
Ziarno kukurydzy Grain of maize	próby / próby pozytywne samples / positive samples	68/66 (97%)	81/81 (100%)	54/53 (98%)
	średnia average	33,2	59,0	207
	mediana median	9,70	40,8	38,2
	maksimum maximum value	422	372	4009
	średnia (próby pozytywne) average (positive samples)	34,3	59,0	211

Tabela 7. Zawartość fumonizyn w ziarnie kukurydzy w latach 2009–2011
 Table 7. The content of fumonisins in maize grain in 2009–2011

		Fumonizyny (B ₁ , B ₂ , B ₃) – Fumonisinis (B ₁ , B ₂ , B ₃) [µg/kg]		
		2009	2010	2011
Ziarno kukurydzy Grain of maize	próby / próby pozytywne samples / positive samples	42/22 (52%)	51/21 (41%)	23/16 (70%)
	średnia average	27,9	34,6	247
	mediana median	< 5,0	n.w.	16,5
	maksimum maximum value	435	316	1885
	średnia (próby pozytywne) average (positive samples)	51,0	83,9	355

n.w. – nie wykryto – not detected

Uzyskane wyniki badań własnych wykazały, że stopień zanieczyszczenia toksycznymi pleśniami i ich metabolitami był zróżnicowany i zależny od rodzaju pleśni, jak

również od badanego roku. W licznych próbach wykryto wysoki poziom mikotoksyn *Fusarium*, z których część prób wykazywała przekroczone maksymalne dopuszczalne

stężenia. Szczególnie podwyższona koncentracja trichotecen grupy A – toksyny T-2 i HT-2 oraz zearalenonu sygnalizuje o możliwości narażenia żywieniowego ludzi i zwierząt. Wcześniejsze badania wykazały także, że kukurydza jako surowiec jest najbardziej skażona toksycznymi metabolitami *Fusarium* (Grajewski i wsp. 2009, 2012).

Wickiel i Ławecki (2009) w swoich badaniach odnotowali podobne wartości dla DON i FUM, jak autorzy w 2011 r. W badaniach własnych stwierdzono wyższe wartości średnie dla ZEA. W przypadku fumonizyn w ziarnie kukurydzy wyższe wartości nawet do 4727 µg/kg odnotowała Tekiela (2008). Cegielska-Radziejewska i wsp. (2009) ustalili, że średnia zawartość DON w próbach kukurydzy (n = 24) była zbliżona do wyników otrzymanych przez autorów w latach 2010–2011. Natomiast zawartość ZEA była średnio dwukrotnie wyższa niż analogiczne wartości w latach 2009–2010, a jednocześnie dwukrotnie niższa w porównaniu z wartością uzyskaną przez autorów w roku 2011.

Literatura / References

- Cegielska-Radziejewska R., Szablewski T., Karolczak K., Kaczmarek A., Kijowski J. 2009. Ocena zawartości mikotoksyn w zbożach paszowych i paszach metodą immunoenzymatyczną. *Nauka Przyroda Technologie* 3 (4) #114.
- Chełkowski J. 1981. Wstępna ocena zagrożenia ziarna zbóż grzybami z rodzaju *Fusarium* i wytwarzanymi przez nie mikotoksynami. *Nowe Rol.* 15: 8–10.
- Dubas A., Michalski T. 2002. Kukurydza w Polsce po II wojnie światowej. *Pam. Puł.* 130 (1): 115–123.
- Grajewski J. (red.). 2006. *Mikotoksyny i Grzyby Pleśniowe Zagrożenia dla Człowieka i Zwierząt*. Wyd. UKW, Bydgoszcz, 202 ss.
- Grajewski J., Błajet-Kosicka A., Twarużek M., Kosicki R., Miklaszewska B. 2009. Wyniki wieloletnich badań mikotoksyn w produktach rolno-spożywczych z uwzględnieniem pasz. s. 34–40. W: „Pasze Przemysłowe” 18, nr 7/8/9 (K. Kwiatek, W. Korol, red.). Wyd. IZ, Kraków, 100 ss.
- Grajewski J., Błajet-Kosicka A., Twarużek M., Kosicki R. 2012. Occurrence of mycotoxins in Polish animal feed in years 2006–2009. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 96 (5): 870–7. doi: 10.1111/j.1439-0396.2012.01280.x., dostęp: 22.02.2012.
- Korol W., Bielecka G., Grajewski J., Twarużek M., Błajet-Kosicka A., Kosicki R., Rubaj J. 2010. Wyniki badań mikotoksyn w ubocznych produktach przetwórstwa rolno-spożywczego na cele paszowe. s. 56. W: *Materiały IX Międzynarodowej Konferencji Naukowej „Mikotoksyny i grzyby pleśniowe”*. UKW, Bydgoszcz, 28–29 czerwca 2010, 70 ss.
- Korbas M. 2006. Głównie kukurydzy i inne choroby – szkodliwość i możliwość zwalczania. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 46 (1): 354–357.
- Korbas M., Horoszkiewicz-Janka J. 2007. Znaczenie i możliwości ograniczenia szkodliwych metabolitów pochodzenia grzybowego. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 47 (2): 141–148.
- Tekiela A., Bereś P., Grajewski J., Miklaszewska B. 2005. Wpływ zwalczania chorób i szkodników kukurydzy na zasiedlenie ziarna przez grzyby i zawartość mikotoksyn. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 45 (2): 1149–1152.
- Tekiela A. 2008. Fuzarioza kolb kukurydzy i skażenie ziarna przez mikotoksyny w Wielkopolsce i na Podkarpaciu. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 48 (3): 1121–1125.
- Wickiel G., Ławecki T. 2009. Występowanie fuzariozy kolb kukurydzy (*Fusarium* spp.) oraz zawartość mikotoksyn w ziarnie kukurydzy chronionej zabiegiem fungicydowym. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 49 (4): 1770–1773.

Wnioski / Conclusions

1. We wszystkich analizowanych próbach ziarna kukurydzy stwierdzono obecność mikotoksyn wytwarzanych przez grzyby pleśniowe rodzaju *Fusarium*, których poziom był różny dla poszczególnych lat objętych badaniami.
2. Dominującymi rodzajami pleśni występującymi w ziarnie kukurydzy były: *Fusarium*, *Penicillium* i *Mucor*.
3. Wykryte wysokie maksymalne poziomy mikotoksyn wskazują na potrzebę dokładniejszego monitoringu ziarna, szczególnie w latach niesprzyjających uprawie kukurydzy.

Podziękowania / Acknowledgements

Autorzy dziękują mgr Ewelinie Soszczyńskiej oraz mgr. Robertowi Kosickiemu za pomoc w wykonaniu badań.