

A TAKARMÁNYOK PENÉSZFERTŐZÖTTségÉNEK GYORS KIMUTATÁSÁRA HASZNÁLHATÓ INVERTÁZ-TESTT ÉS JELZŐÉRTÉKE A SZÉNÁK TERMÉKTIPIKUS PENÉSZGOMBA FAJAIIRA NÉZVE

SIPICZKI BOJÁNA — KÓKAI ZSUSZA — MÁTRAI TIBOR

ÖSSZEFOGLALÓ

A szerzők a gabonák penészfertőzöttségének gyors kimutatására alkalmas invertáz-teszt alkalmazhatóságát vizsgálták a szénákon előforduló penészfajok esetében. A vizsgálatokban a szénákon leggyakrabban előforduló fajok közül: *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Cladosporium* és *Alternaria* invertáztermelését mérték. Mérhető invertáz termelése csak a *Nigrospora*, *Cladosporium*, és *Alternaria* fajoknak volt. Minthogy a teszt válaszüzeje minimum 48 órának bizonyul, tömeges fertőzöttséget a tenyésztése módszerhez képest csak egynapos előnnyel lehet kimutatni. Az invertáz-tesztet a széna terméktípus mikrofórájából kimutatható fajok, az abrakmintákétól eltérően, nem tartoznak a veszélyes toxinogének közé, a fertőzöttség egészségügyi kockázatát nem jelzi.

SUMMARY

Sipiczki, B.Ms. – Kókai, Zs.Ms. – Mátrai, T.: THE APPLICABILITY OF THE FEED CONTAMINANT MOULD SENSITIVE RAPID INVERTASE TEST IN THE DETECTION OF THE PRODUCT-TYPICAL MOULD GENERA OF THE HAY

The applicability of the invertase test proposed for the rapid detection of mould contamination in grains was studied in mould species typical on hay samples.

Specific invertase producing capacities of *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Cladosporium* and *Alternaria* were determined among standard experimental conditions.

Invertase production could be detected in *Nigrospora*, *Alternaria* and *Cladosporium* species. At the 24th hour of incubation only *Nigrospora*, at 48th hour *Alternaria*, at the 72nd hour of incubation *Cladosporium* reacted positively. Considering a minimum response time of 48 hours the test could mean an advance of 24 hours only over the plate counting standard method. Since the toxinogenic members present in hay micro-flora reacted, the test cannot reveal any specific mycotoxine hazard.

Due to its simplicity, low labour and material demand the invertase test can be recommended as a mould screening method in processing a great number of hay samples.

BEVEZETÉS

A penészfertőzöttség mértékét, jellemző metabolitok — ezen belül extracelluláris enzimtermelés — minőségének és mennyiségének kimutatásán alapuló módszerekkel is meghatározhatjuk.

Magan (1993) *Alternaria alternata*, *Eurotium amstelodami* és *Penicillium aurantiogriseum* törzsekkel beoltott gabonák penészesedési folyamatát kísérte figyelemmel, 0,95 vízakivitáson. A mintákban a száraz, nem penészes gabonához viszonyítva jelentős ergoszeterintartalom, α -D-galaktozidáz és β -D-glükózidáz aktivitás növekedést figyeltek meg.

Keshri és Magan (2000) toxint képző és nem képző *Fusarium moniliforme* és *F. proliferatum* törzsek illóanyag és hidrolitikus enzim termelését vizsgálta. Mindkét módszer alkalmasnak bizonyult a mikotoxinogén törzsek egymástól való megkülönböztetésére. Az illóanyag komponensek vizsgálat 48 óra után megbízható és jól reprodukálható eredményt adott. A hét vizsgált enzim közül (β -D-fruktozidáz, α -D-galaktozidáz és N-acetil- β -D-glükózaminidáz) aktivitása 72 óra után szignifikánsan nagyobb volt mindkét fajban a nem toxinogén, mint a toxinogén fajok esetében. A többi vizsgált enzim (β -D-fruktozidáz, α -D-mannozidáz, β -D-xilozidáz és N-acetil- α -D-glükózaminidáz) aktivitásában nem találtak szignifikáns különbséget a toxinogén és nem toxinogén törzsek között.

Mayer (2002) kifejlesztett egy tenyésztési technikát, amelyben a gombacélium korai növekedése jelezhető az invertáz (β -D-fruktofurazonidáz) aktivitás, a redukáló cukor táplevesben történő felhalmozódása alapján. Vizsgálataiban a gabonák és abraktakarmányok terméktípusos penészflórájának leggyakoribb, és túlnyomó többségben lévő képviselői közül, az *Aspergillus flavus* csoport tagjainak, ezen felül, az *Aspergillus niger* és az *Aspergillus japonicus* invertáz aktivitását találta jellemzőnek. Egyes *Aspergillus* fajok nagyon gyors növekedést és intenzív — a folyékony táptalajban 20 óra inkubálás után felhalmozódott redukáló cukor mennyiségében mérhető — invertáz termelést mutattak.

Ezen eredményen alapuló *Aspergillus*-invertáz teszt tehát alkalmas első-sorban erősen szennyezett élelmiszer, illetve takarmány-gabona magvak *Aspergillus flavus* csoport tagjaival és *Aspergillus fumigatus*-szal való fertőzöttségének megállapítására.

Az invertáz-teszt, az agarlemezen történő tenyésztéssel szemben, lényegesen gyorsabb lehetőséget nyújt a takarmány-alapanyagok (gabonák) raktári penészekkel történő fertőzöttségének kiszűrésére. Szerencsés körülmény, hogy az *Aspergillus flavus* csoport tagjait, ezen kívül az *Aspergillus fumigatus*-t toxinogén ill. patogén gombákként tartjuk nyilván, és a szubmerz tenyésztés körülményei között éppen ezek invertáz termelése kiemelkedő.

Az invertáz-teszt alkalmazása felmerülhet szénák penészfertőzöttségének gyors jelzésére is. Gabonafélék terméktípusos és raktári penészeivel ellentétben, a szénák terméktípusos flórájában a *Mucor* és a *Trichoderma* kivételével lassan növekedő, pigmentált („feketítő gombák”) fajok vannak, amelyek agarlemez tenyésztése, a gabonák esetében szükséges inkubációs időnél lényegesen hosszabb ideig tart. Kísérleteinkben a szénák penészflórájának leggyakrabban előforduló tagjainak invertáz termelő képességét vizsgáltuk annak

megállapítására, hogy ezek invertáz termelése eléggé jellemző-e ahhoz, hogy az invertáz-teszt, mint elővizsgálat alapján, az általános penészfertőzöttség mértékére következtethessünk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgált penészgomba fajok

A szénákról általunk izolált és meghatározott fajok: *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium poe*, *Fusarium sporotrichoides* (csak telepmorfológia alapján), *Mucor piriformis*, *Nigrospora spp.*, *Trichoderma viridae* és *Trichotecium roseum*.

Az Aspergillus invertáz-teszt

Az alkalmazott vizsgálati módszert *Mátrai és mtsai* (2000) dolgozták ki.

Elve: szacharóz bázisú folyékony táptalajban micéliumot tenyésztünk, majd a tápközegben, az invertáz hatására megjelenő redukáló cukor mennyiségéből következtetünk a gomba invertáztermelő képességére.

Folyékony táptalaj: 5 g élesztőkivonat, 20 g szacharóz, és 1,0 g klóramfenikol, ad. 1000 ml desztillált víz (az élesztőkivonatot előzőleg tesztelni kell, hogy tartalmaz-e detektálható invertáz aktivitást, és a szacharóznak is redukálócukor mentesnek kell lennie). 20 mm átmérőjű kémcsövekbe 2-2 ml táplevest adagoltunk, lezárva atmoszférikus gőzben 60 percig sterilizáltuk, majd 37 °C-os víz-fürdőben hűlni hagytuk.

Alapszuszenzió: A szubkultúra egyhetes, szacharóz-élesztőkivonat (MSZ-ISO 7954) agarra oltott penészgomba törzs volt. A konídiumokat kacs segítségével, 2 ml 1% tween 80-at tartalmazó steril fiziológiás oldatba vittük. Az inokulált spóraszámot Bürker-kamrával határoztuk meg.

Decimális hígítási sor: Az alapszuszenzióból kiindulón decimális hígítási sort készítettünk. A hígítási sor minden tagjából 100-100 µl-rel beoltottunk 2-2 ml folyékony táptalajt tartalmazó kémcsövet, három párhuzamosban.

Inkubáció: A beoltott kémcsöveket döntött helyzetben, 37 °C-os inkubátorba helyeztük úgy, hogy a folyékony tápközeg levegőnek kitett felülete kb. 6–7 cm hosszú legyen. Az így biztosított oxigén mennyiség elegendő a micéliás növekedéshez és később a spóráképződéshez is.

A lehasított redukáló cukrok mérése

A lehasított cukrok mérését, a *Mátrai és mtsai* (2000) közleményében megadott módszer alapján, 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoesav (dinitro-szalicilsav, DSA) reagenssel végeztük.

DSA reagens: 5,0 g 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoe savat 400 ml, meleg, 2%-os vizes nátrium-hidroxid oldatban oldottunk fel. Ezután 100 g KNa-tartarátot,

1,0 g fenolt, majd 0,25 g vízmentes nátrium szulfátot oldottunk fel. Az oldatot feltöltöttük desztillált vízzel 500 ml-re. Jól lezárt sötét üvegben, hűvös helyen tárolva, több mint egy évig stabil.

Csőben 0,1 ml DSA reagenst az inkubált csövekből vett 0,1 ml folyékony táptalajhoz adtunk, és az elegyet öt percre forrásban levő vízbe helyeztük. Ezután a mintát 2,0 ml desztillált vízzel hígítottuk, és keverés után az abszorbanciát 540 nm-en mértük. A referencia (vak próba) nem inokulált, de inkubált folyékony médium volt. A pontosabb mérés érdekében glükóz standard sort készítettünk, 0,0, 10, 50, 100, 500 és 1000 µg/ml koncentrációkkal, és kalibrációs görbét vettünk fel. Így az abszorbanciákat µg redukáló cukor/ml folyékony médium formájában fejeztük ki. 10 µg/ml feletti redukáló cukor értékeket fogadtunk el pozitív eredményként.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A vizsgált terméktipikus penészfajok közül észlelhető invertáz termelése a *Nigrospora*, *Alternaria* és *Cladosporium* fajoknak van (1. táblázat, 1. ábra).

1. táblázat

A széna főbb terméktipikus penészfajainak invertáz-termelő képessége (µg glükóz/ml tenyészközege, két párhuzamos tenyészcsőben, 10 fölöött pozitív)

Penészfaj(1)	24 óra(2)	48 óra(2)	72 óra(2)
<i>Alternaria</i>	13/16	245*/269*	290*/296*
<i>Cladosporium</i>	10/10	15/15	157*/44
<i>Fusarium</i>	1/0	0/0	2/2
<i>Nigrospora</i>	92/95	171/174	274/269
<i>Trichoderma</i>	7/7	0/2	5/5
<i>Trichothecium</i>	0/0	0/0	0/0
Vak (kontroll)(3)	0	0	0

* szemmel látható micélium a tenyészközegeben(4)

Table 1.: Invertase producing capacity of the important product-typical mould species in hay samples (µg glucose/ml medium, a/b values in parallel tubes, accepted as positive above 10 µg/ml) species(1), 24, 48, 72 hours(2), blank (control)(3), visible micelial growth(4)

Közülük a *Nigrospora* növekedési sebessége éri el azt a mértéket, amelynek alapján az invertáz-teszt jelző értékűnek tekinthető, már 24 óra után jelentős az aktivitás, amelyet fenntart 48 és 72 óráig is.

Az *Alternaria* 24 órás lag-fázis után, a következő 24 órában nagymértékben termel, azonban 48–72 óra között leáll.

A *Cladosporium* jelentős invertázt csak még hosszabb lag-fázis után, 72 óra után termel.

Érdekes, hogy mind a három faj pigmentált (sötétbarna vagy fekete).

1. ábra: Különböző penészfajok invertáztermelése az idő függvényében

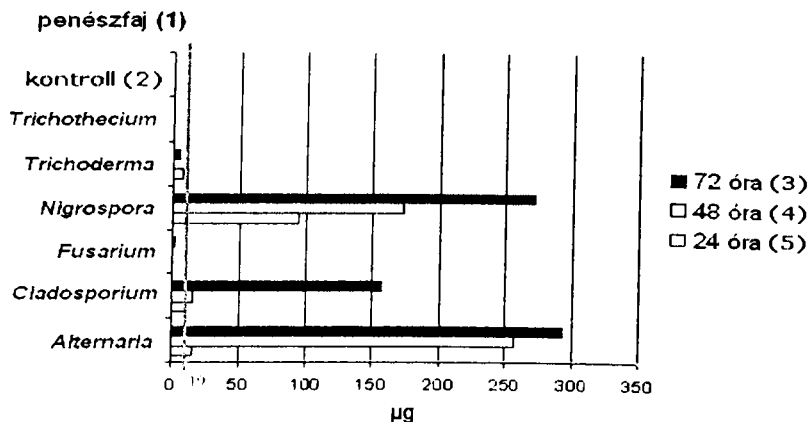


Fig. 1. Invertase production of different mould species
mould species(1), blank(2), 72 hours(3), 48 hours(4), 24 hours(5)

KÖVETKEZTETÉSEK

A Mayer (2002) és Mátrai és mtsai (2000) által kidolgozott invertáz-teszt gabonák gyors penészvizsgálati módszere, ami gabona és más abrakmintákban *aspergillusok* kimutatására, szénák esetében, a terméktipikus flóraalkotók közül csupán 3 penészfajra: a *Nigrospora*, az *Alternaria* és a *Cladosporium* fajokra reagál. Sajnos, ezek a penészek nem tartoznak a „veszélyes” toxinogének közé.

A pozitív reakciót adó fajok invertáz-termelését csak 48 óra után lehet nagy biztonsággal kimutatni. Ebből a szempontból az invertáz-teszt elveszti előnyét más módszerekkel szemben.

Egyrészt a tapasztalatok alapján a „fekete penészek” a szénák terméktipikus állományának mintegy felét teszik ki, és ebben is a *Cladosporium* dominál. A pozitív reakciót adó penészek nem erős toxinogének, másrészt több mint 48 óra inkubálási idő szükséges az invertáz-teszt nem tűnik a tenyésztési módszernél előnyösebbnek a szénák penészfertőzöttségének gyors megállapítására, ill. egészségügyi kockázat jelzésére.

Az inkubáció első 24 órájában csupán a *Nigrospora* adott pozitív eredményt. Minthogy a teszt válaszüzeje minimum 48 óra, tömeges fertőzöttséget a tenyésztési módszerhez képest csak egynapos előnnyel lehet kimutatni.

Szénák esetében az invertáz-teszt egyszerűsége, jelentősen kisebb munka- és eszközigénye miatt tömegvizsgálatokra ajánlható.

IRODALOM

- Keshri, G. – Magan, N.(2000): Detection and differentiation between mycotoxigenic and nonmycotoxigenic strains of two *Fusarium* spp. Using volatile production profiles and hydrolytic enzymes, *J. Appl. Microbiology*, 89. 825–833.
- Magan, N.(1993): Early detection of fungal spoilage in grain. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 32. 145–160.
- Mayer, Zs.(2002): A penészgomba kimutatás korszerű lehetőségei élelmiszerekből és takarmányokból. PhD. értekezés. Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
- Mátrai, T. – Mayer, Zs. – Kókai, Zs. – Salamon, I.(2000): Invertase production of common storage moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. of Food Microbiol.*, 61. 187–191.

Érkezett: 2006. július
Szerzők címe: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Authors' address: Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.
mikro@atk.hu