M 48. Dôkaz potenciálnych toxinogénnych húb rodov Aspergillus a Penicillium

1. Princíp

Potencionálne toxinogénne plesne sa môžu dokázať rastom na selektívnych médiách . Aspergillus flavus a Aspergillus parasiticus(potencionálny producenti aflatoxínov) produkujú kyselinu aspergilovú ,alebo neoaspergilovú ,ktorá vytvára so soľami Fe^{3+} farebný komplex feriaspergilín a ferineoaspergilín ,ktorý spôsobí zafarbenie spodiny rastúcej kolónie na žltooranžovo až hrdzavo po kultivácii za konštantných podmienok daných danou metódou.
Penicillium viridicatum(producent nefrotoxínov ochratoxínu a citrinínu) na selektívnom médiu vytvára farebný komplex ,ktorý spôsobuje zafarbenie spodiny rastúcej kolónie na fialovo hnedo až hnedo červeno.
Po preočkovaní pozitívnych kolónií na Czapek-Doxovom agare a následnej kultivácii sa urobí následné mikroskopické vyšetrenie preparátov daných rodov a porovnajú sa ich morfologické znaky s mikrobiologickým kľúčom.

2. Pomôcky
2.1. Prístroje a zariadenia

Autokláv
Sterilizátor teplovzdušný
Petriho misky
váhy II triedy presnosti
pH meter
pipety
očkovacie kľučky
biologický termostat
mraznička (-20°C)

2.2. Činidlá, roztoky , živné pôdy

laktofenol(20ml fenol,20ml kysel.mliečna,1g cotton blue,40ml glycerín,20ml vody)/1,/
chlornan sodný 0,4-2%
Dichloran(botran)2,6dichloro- 4nitroanilín
glycerol
kvasničný autolyzát
citran železitý
agar

chloramfenikol(CHMF)
chlortetracyklin(CTC)
sacharóza
pentachlórnitrobenzén
bengálska červená

Zloženie selektívnych médií: /2,6/ /3,/

	AFPA(g/l)	modifikácia média GKCH(g/l) na stanovenie celkového počtu húb STN 56 0087(ISO 7954)
peptón	10	-
glukóza	-	20
kvasničný autolyzát	20	5
citran železitý	0,5	0,5
agar	15	20
CHMF	0,1	0,1
Dichloran	0,002	0,002
pH	6-6,5	6,5+0,1
podmienky kultivácie	/2,5,6/ 30°C 42 hod.	25°C 3-5 dní

Selektivita AFPA a upraveného GKCH média je spôsobená prídavkom dichloranu, ktorý potláča rast rýchlorastúcich saprofytických húb Soli Fe^{3+} predstavujú diagnostickú súčasť média na indikáciu pozitívnej reakcie.

	/5,6,/ PRYES (g/l)	/4,10/ DRYES(g/l)
kvasničný autolyzát	20	20
sacharóza	150	150
agar	20	20
CHMF	0,05	0,05
CTC	0,05	0,05
Bengálska červeň	0,025	0,025
pentachloronitrobenzén	0,1	-
dichloran	-	0,002
pH pred ster.	5,6	5,6
podmienky kultivácie	20°C 5-7 dní	

Zvýšená koncentrácia sacharózy znižuje a_w PRYES a DRYES médií a preferuje rast xerofilných húb .Bengálska červeň ,dichloran a pentachlórnitrobenzén inhibujú rast rýchlorastúcich druhov húb.
Selektívne médiá pripravujeme podľa STN 560100 Mikrobiologické skúšanie poživatín, predmetov bežného užívania a prostredia potravinárskych prevádzok.
pH médií sa upravuje pred sterilizáciou, sterilizuje sa pri 121 +1°C po dobu 15 min..

3.Bezpečnostné opatrenia pri analýze vzoriek podozrivých z prítomnosti aflatoxínov a toxinogénnych plesní

3.1 Pre prácu s aflatoxínmi a toxinogénnymi plesňami platia predpisy týkajúce sa práce s karcinogénmi. Presné dodržiavanie nižšie uvedených smerníc umožní predísť onemocneniam ako sú mykózy, alergie z plesní alebo aflatoxikózy.
Aflatoxíny sú vysoko toxické pre človeka a zvieratá a preto je potrebné s nimi zaobchádzať ako s nebezpečnými jedmi.Ako najnebezpečnejšie je preniknutie do organizmu intravenózne, potom intramuskulárne. Analýzou vzorky podozrivej z prítomnosti aflatoxínov a patogénnych plesní, tak aj pomocnými prácami, musia byť poverení pracovníci, ktorí boli poučení o bezpečnostných a preventívnych opatreniach. Pri práci nesmú fajčiť,jesť a piť.

3.2 Ochranné prostriedky
Laboratórni pracovníci sa musia chrániť vhodnými ochrannými prostriedkami proti kontaminácii plesňami alebo aflatoxínmi. Ku zvýšenej bezpečnosti musia byť na tvári rúška, na rukách gumenné rukavice, oblečený pracovný plášť.

3.3 Ochranné opatrenia pri práci
Pri vlastnej práci je potrebné zabrániť prístupu nepovolaným osobám.
Pri spracovaní vzoriek sú všetky laboratórne práce, počas ktorých vzniká prach, potencionálne nebezpečné zo šírenia plesní alebo aflatoxínov do prostredia laboratória. Preto triedenie vzoriek, odoberanie vzoriek k analýzam drveniu, rozomieľaniu a preosievaniu sa musí vykonávať opatrne, aby kontaminácia osôb a okolia bola znížená na minimum.

3.4 Dezinfekcia
V laboratóriách, v ktorých sa pracuje so zaplesnenými vzorkami je vhodné pred detoxikáciou previesť dezinfekciu proti vegetatívnym i spórovým formám týchto plesní. K tomuto sa hodí formalín, kyselina peroxyoctová (Persteril), Lastanox Q a Lastanox F.Rod. Aspergillus je v čistom prostredí inaktivovaný kyselinou peroxyoctovou pri 0,005% koncentrácii, Lastanoxom Q pri 0,5mg/l, Lastanoxom F v koncentrácii 10mg/l.
Bežné upratovanie sa prevádza handrami stieraním s roztokom 15% roztoku chlórnanu sodného riedeného 1+10 vodou.
K dekontaminácii plôch, prípadne iného materiálu sa používa 5% roztok chlórnanu sodného. Keď sa majú zneškodniť roztoky nemiešateľné s vodou, prelejú sa najprv 5% chlórnanu sodného a potom sa pridá rovnaký objem HCl o koncentrácii 6mol/l, čím sa uvoľní chlór.Vytvorený plynný chlór je veľmi účinný, nechá sa pôsobiť niekoľko minút a potom sa vyvetrá. Pracovný priestor v digestóriu je možné po ukončení práce ožiariť UV lampou o výkone 40W najmenej 4 hodiny.

Laboratórne sklo sa dekontaminuje v kúpeli tohoto zloženia:
2,5 kg hydroxidu sodného technického
1 roztoku chlornanu sodného technického
200ml saponátu
50 l vody,
sklo sa nechá namočené 12 hodín.
Ak nie je možnosť spalovania kontaminovaných vzoriek, môžu sa dekontaminovať roztokom chlórnanu sodného, doba pôsobenia pol hodiny.
Pri kontaminácii rúk je nutné dekontaminovať 5% roztokom chlornanu sodného, potom umyť mydlom a opláchnuť. /11/

4. Pracovný postup
4.1. Príprava vzorky

Vzorky práškové: STN EN ISO 6887-1 (56 0102) Všeobecné pokyny na prípravu riedenia základnej suspenzie a desaťnásobných riedení
Vzorky pevné: na povrchovú sterilizáciu sa používa napr. 5% formalín,75% alkohol,0,5-2,0% chlornan sodný, ktoré necháme pôsobiť 1-5 minút. Potom zrnká, alebo kúsky 3 krát opláchneme za sebou sterilnou vodou tak, aby sa odstránili všetky zvyšky dezinfekčného roztoku. /2/
Vzorky určené na priame očkovanie (semená,bôby,oriešky,koreniny), sa udržujú 72 hodín pri -20°C,aby sa usmrtili roztoče a ich zárodky.

4.2. Stanovenie

Pri vzorkách pevných používame metódu priamej inokulácie /2,/,ktorá je často veľmi výhodná, pretože sa ňou môžu izolovať zo vzoriek aj také kmene mikroskopických húb, ktoré sú vo vzorke menej zastúpené. Metódou priamej inokulácie sa zo vzoriek izoluje z vyšetrených substrátov 3-násobne viac rozličných druhov mikroskopických vláknitých húb, ako zo vzoriek očkovaných dilučnou metódou. Množstvo inokulovaného materiálu na živnú pôdu v jednej Petriho miske sa však musí v tomto prípade prispôsobiť predpokladanej kontaminácii. Pri metóde priameho očkovania treba očkovať materiál na väčší počet misiek. Jednou z modifikácií priamej inokulácie je kladenie povrchovo sterilizovaných zŕn a orieškov na povrch živných médií. Toto vyšetrenie sa robí vtedy, ak sa majú selektívne izolovať mikromycéty, ktoré vrástli do rastlinného tkaniva a pod. Vzorka sa naváži v množstve 10 g, povrchovo sa sterilizuje podľa predchádzajúceho odstavca, pozorne sa všetky vysterilizované zrnká, tiež ich sterilné rezy, kladú sterilnou pinzetou na povrch tuhých živných pôd v Petriho miskách, podľa veľkosti 5 až 20 kúskov na 1 Petriho misku /2/.

Čo sa týka reprodukovateľnosti výsledkov pri vzorkách sypkých, je potrebná ich homogenizácia, pri ktorej je potrebné dodržať čas homogenizácie 1 minútu. Odporúča sa homogenizovať v sterilnom fyziologickom roztoku 1:10, homogenizát treba nechať pred pipetovaním postáť 5 minút.. Vzorky po danom riedení vyočkujeme na povrch médií v množstve 0,2-0,5 ml v dvoch paralelných stanoveniach /2/.

Kultivujeme v tme, pri intenzívnej cirkulácii vzduchu, v neprevrátenej polohe bez premiestňovania misiek,v biologickom termostate za podmienok uvedených pri príprave kultivačných médií a bez prítomnosti kvasiniek v biologickom termostate.

Pri stanovení potencionálne toxinogénnych húb rodu Aspergillus použijeme selektívne médium AFPA(výrobca OXOID)/2,//5,/ ,alebo jeho náhradu GKCH s prídavkom citranu železitého a dichloranu. Doba kultivácie pri použití AFPA média sa skracuje na 42 hodín pri 30°C.Pri použití média GKCH na stanovenie plesní ,za prídavku citranu železitého a botranu je teplota kultivácie 25°C a doba kultivácie 3-5 dní.

Pozitívna reakcia toxinogénnej plesne rodu Aspergillus je žltooranžová až hrdzavá farba spodiny kolónie na selektívnom kultivačnom médiu.Pôda je určená na izoláciu alebo identifikáciu kmeňov Aspergillus flavus,Aspergillus parasiticus,ktoré rastú na tejto pôde vo forme kolónií s bielym ,sterilným a k pôde pritisnutým vzdušným mycéliom .Zafarbenie spodnej časti kolónie je viditeľné ešte pred tvorbou typických olivovozelených konídií.Takmer rovnaký pigment spodiny kolónií produkujú niektoré kmene Aspergillus ochraceus. Pozitívnu reakciu z rodu Aspergillus dávajú nasledovné druhy:

Aspergillus flavus
Aspergillus parasiticus
Aspergillus guercinus
Aspergillus oryzae
Aspergillus ochraceus
Aspegrillus wentii
Aspergillus melleus

Pri stanovení rodu Penicillium použijeme selektívne média PRYES a DRYES .Doba kultivácie je 5-7 dní pri 20°C.Pozitívna reakcia fialovo hnedá až hnedo červená spodina kolónie indikuje možnosť produkcie ochratoxínu a citrinínu kmeňmi Penicillium viridicatum/4,//6,/ Kolónie so žltou spodinou indikujú prítomnosť potenciálnych producentov xanthomegninu a viomelleninu, kmeńmi Penicillium veridicatum a Penicillium aurantiogriseum /6//5//10,/.

Kombináciou týchto techník, kultiváciou na médiu AFPA (prípadne na GKCH s prídavkami daných substancií) a kultiváciou na médiách PRYES a DRYES, môže byť detegovaná prítomnosť toxinogénnych plesní /5/.

Keď po uplynutí daného času na miskách nie je pozitívna reakcia vykultivovaných kolónií, nechá sa v biologickom termostate kultivovať ešte do 21 dní na potvrdenie negatívnej reakcie /2/.

Pri pozitívnej reakcii danú kolóniu vyočkujeme na Czapek Doxov agar. Necháme kultivovať pri 20°C 5 dní a porovnáme na sklíčkovom preparáte s laktofenolom pri zväčšení 40 x morfologické vlastnosti daných rodov a druhov s morfologickými vlastnosťami z vlastnej zbierky trvalých preparátov, pripravených zo zbierkových kultúr, alebo fotografických materiálov, ktoré slúžia ako porovnávací materiál.

5. Vyjadrenie výsledkov

Pri práškových vzorkách sa udáva prítomnosť potencionálnych toxinogénnych plesní ako **pozitívna na 1 g vzorky**, neprítomnosť potencionálnych toxinogénnych plesní ako **negatívna na 1 g vzorky.**
Pri vzorkách tuhých kusových sa udáva prítomnosť potencionálnych toxinogénnych plesní ako **pozitívna na 10 g vzorky** a neprítomnosť potencionálnych toxinogénnych plesní ako **negatívna na 10 g vzorky.**

6. Prílohy
6.1. Použitá literatúra:

/1,/ Fassatiová ,O.;Plísne a vláknité houby v technickej mikrobiologii, Praha 1979,s.96-149,s.27
/2,/Jesenská,Z.; Mikroskopické huby v poživatinách a v krmivách , Alfa1987 ,s.176-202,s.216
/3,/STN 560100 Mikrobiologické skúšanie poživatín ,predmetov bežného užívania a prostredia potravinárskych prevádzok
/4,/FRISVALD,J.C.;Evaluation of media based on yast extract,sucrose or glycerol for enumeration of Penicillium verrucosum in fluor,A collaborative study ,June 25-30,1994,Copenhagen,Denmark,p.10-11
/5,/ Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3Rd Edition,American Public Health Association Washington, 1992 Liewen,B.M.,Bullerman,B.L.,Toxigenic fungi and fungal toxins,p.814-815,
/6,/ Compendium of methods for the mikrobiological examination of foods,3 Rd Edition American public Health Association Washington, 1992,Media reagents and stains,p.1109,p.1160
/11,/Javorský,P.,Krečmer,F.,Uhnák,J.;Chemické rozbory v zemědělských laboratořích,Praha 1987, II.diel-3,časť,s.444-449
/7,/ Tvrdoň,M.;Školský atlas mikroorganizmov,s.126-159, ALFA 1979
/8,/ Arpai,J.,Bartl,V.;Potravinárska mikrobiológia,1977,s.262-264
/9,/Betina,J.;Mikrobiologické laboratórne metódy,1987
/10,/FRISVALD,J.C.;A selective and indicative medium for groups of Penicillium viridicatum producing different mycotoxins in cereals,Journal of applied bacteriology ,p.54,p.409-416,1983

6. 2 Kultivačné a morfologické vlastnosti

Penicillium viridicatum

kultivačné vlastnosti
kolónie na Czapek Doxovom agare dosahujú priemer 2,5-3,5 cm za 12-14 dní pri teplote 22-25 ^{o}C.Farba kolónie je v mladosti žltozelená až malachitovozelená, neskôr sivohnedá./7,/,Lem má biely ,široký 1-2 mm.Kolónia u niektorých kmeňov ryhovaná paprskovito.Výpotok číry až nažltlý.Spodná strana bezfarebná ,žltá až svetlo hnedá.
morfologické vlastnosti

huba patrí podľa rozvetvenia a súmernosti konidiofórov do skupiny Asymmetrica.Konidioféry sú obvykle zdrsnené alebo bradavičnaté.Fialidy sú usporiadané praslenovito ,inokedy rozličnými stupňami priklonené k hlavnej osi:Konídie sú v štádiu tvorby oválne,neskôr guľovité,usporiadané do rovnobežných retiazok pritlačených k sebe.

Aspergillu flavus

kultivačné vlastnosti
kolónie na Czapek Doxovom agare rastú veľmi rýchlo,sú najprv vločkovité ,alebo vlnaté a biele alebo zafarbené svetlo žlto,v dobe zrelosti kolónie slamovo žlté,citrónovo žlté, žltozelené i tmavšie žltozelené, niekedy ako staršie hnedožlté,mávajú zrnitý vzhľad.Spodina je spočiatku žltá, neskôr hnedá./1,/Niektoré kmene tvoria sklerócia červenohnedej až čiernej farby po dlhšom čase kultivácie.
morfologické vlastnosti
z mycélia vyrastajú bezfarebné konidioféry so zdrsnenou stenou,ktoré pozvoľna prechádzajú do fľaškovitých vezikúl.Sterigmi sú primárne aj sekundárne.Konídie sú guľaté ostnité.

Aspergillus parasiticus

kultivačné vlastnosti
kolónie na Czapek Doxovom agare rastú v priemere 2,5-5 cm, nízke, zrnité,niekedy paprskovite ryhované, žlotozelené, trávovo zelené až hnedozelené. Spodná strana svetlo hnedá.Výpotok sa netvorí./1/
morfologické vlastnosti
Konidiálna hlavica paprskovitá,konidioféry dlhé, bezfarebné, hladké.Vezikula je takmer gulovitá, fialidy v jednej rade po celom povrchu vezikuly. Konídie gulovité, jemne ostnité, jasne žltozelené/1/.

Aspergillus oryzae

kultivačné vlastnosti
Kolónie na Czapek Doxovom agare rasú pomerne rýchlo a dosahujú priemer 5-6 cm.Vzdušné mycélium tvorí vatovitý povlak, najprv biely,citrónovo žltý, potom žltozelený a prechádza do olivovo hnedej farby. Spodná strana je bezfarebná /1/.
morfologické vlastnosti
konidiálne hlavice sú paprskovité.Stena konidioféru býva drsná alebo hladká,,Vezikula býva guľovitá,do 3/4 pokrytá fialidmi,fialidy sú v jednej rade. Niekedy sa tvoria aj dve rady fialidov. Konídie sú hruškovité, alebo elipsovité. Väčšinou sú zelené, alebo žltohnedé, s povrchom hladkým, alebo zdrsneným, niekedy aj ostnitým /1/.

Aspergillus ochraceus

kultivačné vlastnosti
Na Czapek Doxovom agare rastú nízke, zrnité, spravidla so sústredenou vrstevnatosťou, žlté, okrovo žlté, oranžovo červené, spodná strana bezfarebná, oranžová až purpurová.
morfologické vlastnosti
konidiofór je variabilnej vlastnosti, v dolnej časti žltý, so zúbkovitým povrchom,vezikuly guľovité až elipsoidné, plodné po celom povrchu, prítomné primárne aj sekundárne fialidy. Konídie guľovité, aj elipsoidné, viacmenej drsné, alebo ostnité /1/.

Aspergillus wentii

kultivačné vlastnosti

Kolónie na Czapek Doxovom agare rastú rýchlo, najprv vytvárajú vlnité biele alebo žlté mycélium,v dobe zrelosti konídií sa povrch mení od žltej až k olivovo hnedej ,niekedy bronzovo hnedej, pri niektorých kmeňoch až čokoládovo hnedej.Spodná strana pri starších kultúrach je červenohnedá /1/.

morfologické vlastnosti

Konidiofór hladký alebo slabo zdrsnený,vezikuly guľovité, prítomné fialidy primárne aj sekundárne, konídie sú elipsoidné /1/.