

POTENCIÁLIS AFLATOXIN TERMELŐ *ASPERGILLUS FLAVUS* IZOLÁTUMOK AZONOSÍTÁSA HAZAI BÚZÁN

BARANYI Nikolett¹, BERKI Adrienn¹, TÓTH Beáta², TÖRÖK Orsolya², KÓTAI Éva², VARGA János¹

¹ Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék, 6726 Szeged, Közép fasor 52.
² Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft., 6726 Szeged, Alsó kikötő sor 9.



BEVEZETÉS

A mikotoxinok a fonalas gombák másodlagos anyagcseretermékei, amelyek egyaránt ártalmasak az emberekre és az állatokra nézve is (Varga és mtsi 2009). Az aflatoxinok a legjelentősebb mikotoxinok, melyeket az *Aspergillus* nemzetség fajai állítanak elő. A számos ismert aflatoxin közül az aflatoxin B₁ a leginkább mérgező. Erős mutagén rákkeltő hatást mutattak ki laboratóriumi állatoknál, és sok bizonyíték utal arra, hogy emberek esetén a máj rákos elváltozását okozhatja (Wild és Turner 2002). Az aflatoxin B₁ a természetben előforduló legerősebb rákkeltő anyag, melynek hatására májkárosodás és májrák alakulhat ki.

Az *Aspergillus flavus* a legjelentősebb aflatoxin termelő faj, emellett fontos mezőgazdasági kártevő. Különböző mezőgazdasági termények esetében (kukorica, gyapot és földimogyoró) súlyos hozamvesztést okoz világszerte. Az aflatoxin termelésnek a kedvező környezeti feltételei a nedvesség és a magas hőmérséklet, ezért az *A. flavus* melegebb, trópusi és szubtrópusi területeken képes aflatoxinokat előállítani (Varga és mtsi 2009). Következésképpen, a közép-európai országokban (Magyarország, Szerbia, Szlovénia, Horvátország, Románia, Ukrajna), melyek a mérsékelt éghajlati övben helyezkednek el, a mezőgazdasági termékek aflatoxin -szennyezettsége nem jelent komoly egészségügyi kockázatot.

Azonban a globális felmelegedés által okozott klímaváltozás jelentős változásokat idézett elő. Az utóbbi időben több tanulmány is foglalkozott az éghajlatváltozás hatására megjelenő aflatoxin termelő gombákkal és az aflatoxinok élelmiszerekben történő előfordulásával (Paterson és Lima 2010, Tirado és mtsi 2010). Ezen vizsgálatok alapján a klímaváltozás miatt az aflatoxin termelő gombák, és következtésképpen az aflatoxinok is, várhatóan egyre inkább elterjednek a mérsékelt éghajlattal rendelkező országokban is. Sőt, a legújabb vizsgálatok jelezték az aflatoxin termelő gombák előfordulását és ezzel együtt a mezőgazdasági termékek aflatoxin- szennyezettségét több olyan európai országban, ahol eddig még nem találkoztak ezzel a problémával. Magyarországon Richard és mtsi (1992) a toxintermelő képességet 22 különböző forrásból származó izolátum esetében vizsgálták, és egyik izolátum sem bizonyult aflatoxin termelőnek. Azonban az utóbbi időben, Borbély és mtsi (2010) kelet-magyarországi gabona és kevert takarmány mintákban vizsgálták a mikotoxin szintet, és találtak olyan mintákat, melyekben az aflatoxin B₁ meghaladja az uniós határértéket. Dobolyi és mtsi (2011) Magyarország különböző régióiból gyűjtött kukoricaszemekben azonosítottak aflatoxin termelő *Aspergillus flavus*-t. Ezek a megfigyelések vezettek bennünket arra, hogy vizsgáljuk a potenciális aflatoxin termelő fajok előfordulását magyar gabonaféléken.

1. táblázat Az *Aspergillus flavus* előfordulása hazai gabonaféléken

(2010-2011)

Gabonafélék	Izolációs helyek száma	A vizsgált hibridek/fajták száma	A vizsgált magminták száma	Azonosított <i>A. flavus</i> izolátumok száma	Azonosított <i>A. flavus</i> izolátumok %-os értékei
Kukorica	18	6	2160	18	0.83
Búza	6	4	1200	38	3.17
Árpa	3	1	150	3	2.00



1. ábra Az *Aspergillus flavus* előfordulása Alakor búzán

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Mintavétel

A mintákat 2010 és 2011-ben gyűjtöttük hazánk különböző gabonatermő területein aratás után. A vizsgált gabonafélék közé tartozott a kukorica, a búza és az árpa. A mintákat felszínsterilizést követően diklorán tartalmú bengálvörös (DRBC) táptalajra helyeztük (King és mtsi 1979). A lemezeket 25°C-on sötétben inkubáltuk és időszakosan ellenőriztük a magokról növekvő micéliumokat. A kinőtt micéliumot tisztítás után malátás (MEA) táptalajra oltottuk. Az izolátumok szubkultúrát alkottak, egyedülálló konídiumokkal MEA, PDA, és CYA táptalajokon (Samson és mtsi 2004).

Fajazonosítás

A DNS kivonáshoz YPD (élesztő, pepton, D-glükóz) tápoldatban tenyésztett kultúrát használtunk, melyet 4 napig 25°C-on rázattuk 120-150 rpm-en. Az így kapott micéliumtömeget centrifugálással választottuk el a tápoldattól. A DNS kivonáshoz az Epicentre Biotechnologies MasterPure™ Yeast DNA Purification készletet használtuk a gyártó utasítása szerint. A fajazonosítást a kalmódulin gén egy szakaszának amplifikálása és szekvencia analízise révén végeztük el (Pildain és mtsi 2008). A kapott kalmódulin szekvenciákat nukleotid-nukleotid BLAST (blastn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>; Altschul és mtsi 1990) segítségével hasonlítottuk össze a Genbank-ban található szekvenciákkal és a saját adatbázisunkkal is.

Aflatoxin termelő képesség vizsgálata

Az Alakor ősi búzafajtáról származó *Aspergillus flavus* izolátumokat 2,5 ml YES (2% élesztő, 20% szacharóz) tápoldatba oltottuk és 25°C-on sötétben inkubáltuk 7 napig. Az aflatoxin extrakciót 2 ml diklór-metánnal végeztük el. Az izolátumok aflatoxint ermelő képességét vékonyréteg kromatográfiával (TLC) és HPLC-vel is elvégeztük.

EREDMÉNYEK

Az utóbbi időben számos *Aspergillus* fajt azonosítottak, melyek képesek aflatoxinokat előállítani (Varga és mtsi 2009). Ezek a fajok könnyen elkülöníthetőek a β-tubulin vagy kalmódulin gén szekvencia analízise révén (Varga és mtsi 2011). Munkánk során a potenciális aflatoxin termelő gombák előfordulását vizsgáltuk hazai gabonaféléken. A felszínsterilizett gabonaszemeket szelektív táptalajra helyeztük, és az izolált gombatörzseket morfológiai, valamint szekvencia alapú módszerek segítségével azonosítottuk. A legtöbb izolátum telep morfológia és mikroszkopikus jellemzőik alapján az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába volt sorolható (**1. és 2. ábra**). A fajazonosítás a kalmódulin gén egy szakaszának szekvencia analízise alapján történt. Annak ellenére, hogy nagy a morfológiai variabilitás a telepek színét, a sporulációt, a szklerócium képzést és a konidiofor struktúrákat illetően, az összes izolátum az *Aspergillus flavus* fajba tartozott a kalmódulin szekvencia adatok alapján. Aránya a pozitív minták esetében 0,38% és 3,17% közé esett a vizsgált gabonától függően (**1. táblázat**). Munkánk során nagyszámú *Aspergillus flavus* izolátumot azonosítottunk az ország különböző régióiból származó búzaszemeken. A legfertőzöttebbnek az Alakor (egyszemű búza, *Triticum monococcum*) bizonyult. Az Alakor ősi diploid búzafajta, mely igen ellenálló gombabetegségekkel szemben. A búzamintákban nem tudtunk aflatoxinokat kimutatni. Az izolátumok aflatoxin termelő képességének vizsgálatát vékonyréteg kromatográfiával és HPLC-vel is elvégeztük. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy az izolátumok sem voltak képesek aflatoxinokat előállítani. Vizsgáltuk továbbá az Alakor búzáról izolált törzsekben a párosodási típus (MAT- mating type) gének előfordulását specifikus primerpárokkal (Ramirez-Prado és mtsi 2008). A legtöbb vizsgált törzs a MAT-1 párosodási típus gént hordozta.



2. ábra Az *Aspergillus flavus* telep morfológiája CYA táptalajon (balra) és a konídiumtartójáról készült mikroszkópos felvétel (jobbra)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Jelen kutatási eredmények megjelenését „Az SZTE Kutatóegyetemi Kiválósági Központ tudásbázisának kiszélesítése és hosszú távú szakmai fenntarthatóságának megalapozása a kiváló tudományos utánpótlás biztosításával” című, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 azonosítószámú projekt támogatja. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. Továbbá a K84122 és K84077 számú OTKA pályázatok és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (Tóth B.) tették lehetővé a kutatási munkát



SZÉCHENYI TERV



MAGYARORSZÁG MEGÚJUL



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Magyarországon 2010-ben és 2011-ben gyűjtött gabonaminták esetében vizsgáltuk a potenciálisan aflatoxin termelő penészgombák előfordulását. A kukorica, búza és árpa minták 0,8%- 3,17% -ában mutattuk ki az *Aspergillus flavus* fajt. Egyéb mezőgazdasági termékek mikrobiotájának alaposabb vizsgálata szükségesnek tűnik az éghajlatváltozás következtében a potenciális mikotoxin termelő *Aspergillus* fajok megjelenésének becslésére. Vizsgálataink során mindeztidáig a búzamintákban és az Alakor fajtáról származó izolátumokban nem sikerült aflatoxinokat kimutatni. Az izolátumok genetikai variabilitásának vizsgálata UP-PCR technikával folyamatban van.