

## Оценка на методи за скрининг на плесенни гъби, продуценти на охратоксин А

Анелия Георгиева, Емил Филипов, Ангел Ангелов

**A method for screening of fungal isolates producing ochratoxin A:** *Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin that possess a risk to human health. The method that was used in this paper is based on medium with coconut cream, on which the action of ultraviolet light induced fluorescence only in mycotoxigenic fungal isolates. Results showed that the method provides quick and clear evidences of the ability of isolates to produce OTA and allows its quantification.*

**Key words:** *Ochratoxin A, Coconut cream, Molds, Ultraviolet light*

### ВЪВЕДЕНИЕ

Охратоксин А (ОТА) е вторичен метаболит на плесенните гъби и има нефротоксично, имунотоксично, тератогенно и канцерогенно действие [2]. Той е един от най-важните микотоксини от гледна точка на човешкото здраве [3]. Представлява естествен контаминант в редица храни, като зърнените продукти, бирата, виното, какаото, кафето, стафидите и подправките, а също и в храните от животински произход, в резултат от контаминацията на фуражите [5]. Негови продуценти са представителите на род *Aspergillus* и род *Penicillium*. Поради лесното разпространение на техните спори и при подходяща температура и водна активност, попадайки върху хранителните продукти, могат бързо и лесно да се развият и да продуцират ОТА. От друга страна не всички представители на род *Aspergillus* и род *Penicillium* могат да синтезират този токсин. За да се докаже способността на плесенните изолати да продуцират охратоксин А е необходимо да се извърши скрининг, който ясно и категорично да определи кои от тях са микотоксикогенни. През 2008г. Varga и Samson използват кокосов агар за провеждането на скрининг на плесенни гъби, основаващ се на способността на продуциращите ОТА изолатите да флуоресцират под действието на ултравиолетова светлина [6,7]. Но тъй като плесенните гъби могат да продуцират различни видове микотоксини, а всеки вид микотоксин може да бъде продуциран от няколко вида плесенни гъби, за да може категорично да се твърди, че изследваните изолати са продуценти на охратоксин А е необходимо след провеждането на този първоначален скрининг, получените резултати да бъдат потвърдени чрез друг метод. Това наложи създаването на метод, с помощта на който от една страна категорично да се докаже качествено способността на изолатите да продуцират охратоксин А, а от друга да позволява и неговото количествено определяне.

### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### Изолати

В проведеното изследване бяха анализирани общо 122 чисти култури, от които 62 принадлежат към род *Aspergillus*, а останалите 60 към род *Penicillium*. До момента на анализа всички култури са съхранявани в епруветки с наклонен агар МЕА в хладилни условия при 4 – 6 °С. Преди провеждането на изследването всяка от културите беше активирана върху свежа хранителна среда МЕА и инкубирани 7 дни на 25°С.

#### Стандарти и реактиви

За провеждане на изследването бяха използвани охратоксин А (Romer Labs, Австрия), имуноафинитетни колонки (VICAM, САЩ) и разтворители - ацетонитрил и метанол с хроматографска чистота. За подобряване ефективността на екстракцията на ОТА от културалните среди, беше използвана 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> с необходимата

химична чистота. Със същата чистота бе и  $\text{NaHCO}_3$  необходим за провеждането на течно – течната екстракция.

#### **Хранителни среди**

- МЕА (Malt extract agar): Малцов екстракт (Fluka, Франция) - 20 g/l, Агар - 20 g/l за съхранение на чистите култури
- ССМ (Coconut cream medium): Кокосова сметана (THAI, Тайланд) - 500 g, дестилирана вода – 500 ml
- ССА (Coconut cream agar): Кокосова сметана (THAI, Тайланд) - 500 g, дестилирана вода – 500 ml, 15g – Агар

#### **Определяне на микотоксикогенния потенциал на плесенните изолати с твърда хранителна среда ССА**

В петриевите блюда с проверена за стерилност твърда хранителна среда ССА беше извършен точков посев, след което културите бяха инкубирани 7 дни при 25°C на тъмно. След приключване на култивирането, качествено определяне на способността на плесенните култури да продуцират охратоксин А беше осъществено с ултравиолетова лампа (Spectroline® ENF – 260C/FE, САЩ) излъчваща светлина с дължина на вълната 365 nm. Като продуценти на охратоксин А бяха определени само онези изолати, които при облъчване на петриевите блюда с ултравиолетова светлина флуоресцират в синьо.

#### **Определяне на микотоксикогенния потенциал на плесенните изолати с течна хранителна среда ССМ**

##### *Получаване на посевен материал и условия на култивиране*

След активирането на плесенните изолати, към всяка от епруветките бяха прибавени по 10 ml стерилна вода и с йозе беше извършен смив за получаване на хомогенна суспензия. От всяка епруветка беше взето по 0,5 ml спорова суспензия ( $1.8 \times 10^8$  -  $2.3 \times 10^8$  КОЕ/ml) и прехвърлена в ерленмайеровите колби, в които предварително стерилно бяха разлети по 50 ml от хранителна среда ССМ. Концентрацията на споровата суспензия бе определена микроскопски с камера на Тома. Развитието на културите е проведено в два варианта: с разбъркване на клатачка и статично, като и в двата случая е било с продължителност 7 дни при 25°C на тъмно.

##### *Качествено определяне способността на плесенните изолати да продуцират охратоксин А*

Качествено определяне на способността на плесенните култури да продуцират охратоксин А отново беше извършено с ултравиолетова лампа (Spectroline® ENF – 260C/FE, САЩ) излъчваща светлина с дължина на вълната 365 nm. Като микотоксикогенни бяха определени онези изолати, които при облъчване на колбите флуоресцират в син цвят.

##### *Количествено определяне на охратоксин А в културални среди*

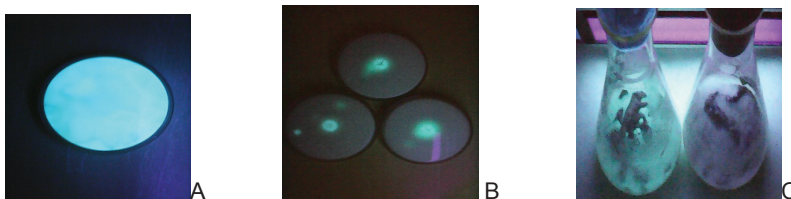
Културалните среди на всеки изолат определен качествено, като микотоксикогенен при проведения скрининг, бяха екстрахирани с хлороформ (Fisher Chemical, Великобритания). За подобряване екстракцията на ОТА от културалните среди, към целия обем на всяка една от тях бяха добавени по 0,8 ml 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  и в последствие хомогенизирани в рамките на 1 минута с блендер. След хомогенизирането им, бяха добавени 50 ml хлороформ и отново с помощта на блендера беше извършена екстракцията с продължителност 2 минути при максимална мощност. Получените хлороформни екстракти бяха отделени от водната фаза и мицела чрез центрофугиране за 5 минути/3000 оборота. Десет милилитра от отделения хлороформен екстракт беше подложен на течно – течна екстракция с 10 %  $\text{NaHCO}_3$ . Отделената чрез центрофугиране водната фаза се

пропуска през имуноафинитетни колони (VICAM, САЩ) със скорост 1 капка/секунда. Колонката се промива с 3 ml дейонизирана вода и охратоксин А се елуира с 2 ml метанол (Fisher Chemical, Великобритания). Събраните елуати бяха анализирани чрез хроматографска система (Thermo Surveyor), снабдена с флуоресцентен детектор ( $\lambda_{exc}$  - 333nm,  $\lambda_{em}$  - 460nm). Хроматографското разделяне беше извършено чрез хроматографска колона Nucleodur C18 4.6 mm x 250 mm (Macherey – Nagel, Германия). Използваната подвижна фаза има състав ацетонитрил /дейонизирана вода/ ледена оцетна киселина в съотношение (99 : 99 : 2), а скоростта на потока е 0,6 ml/ min. Инжекционният обем е 50  $\mu$ l.

### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Сто двадесет и два изолата бяха анализирани върху твърда и течна хранителна среда, за да бъде определена способността им да продуцират охратоксин А. Развитието на културите в течна хранителна среда беше проведено в два варианта: чрез разбъркване на клатачка и статично. Приложените методи се основават на способността на микотоксикогенните плесенни гъби да флуоресцират под действието на ултравиолетова светлина, когато културите се развиват в кокосова среда. Тези методи освен за определяне способността на плесенни гъби да продуцират охратоксин А, се прилагат и при определянето на афлатоксини и цитринин [1,4,6]. Съставките на кокоса предизвикват в микотоксикогенните плесенни гъби синтез на флуоресциращи пигменти в кокосовата среда [7].

Първоначално всички 122 изолата бяха анализирани върху петриеве блюда с твърда хранителна среда ССА. Проверка способността на изолатите да флуоресцират започна още от първия ден на тяхното развитие, като при 5 от тях флуоресценцията беше наблюдавана още на третия ден, а до седмия ден при други 3 изолата [фиг.1].



Фигура 1: Флуоресценция при плесенни изолати върху ССА - А (117R), В(104R,105R,101R) и ССМ ( флуоресценция при117R R и нефлуоресциращ изолат в дясно)

Всички 8 изолата принадлежат към род *Penicillium*, като в тях влизат и изолатите от същия род, определени в предишно наше изследване върху течна хранителна среда YES (Yeast extract sucrose), чрез тънкослойна хроматография. Интерес представлява факта, че качествено определения на по-ранен етап изолат от род *Aspergillus* не флуоресцира под ултравиолетова светлина. Подобно явление наблюдава и Yazdani et al. (2010) при проведено от него изследване върху род *Aspergillus*, като това той обяснява с голямата чувствителност на представителите от този род към съставките на кокоса и ще бъде обект на наши бъдещи проучвания.

Независимо от наличието на синя флуоресценция при облъчване с ултравиолетова светлина на петриевите блюда е необходимо допълнително потвърждение с друг метод, за да бъде определен даден изолат като продуцент на ОТА. Това наложи да развием този метод, така че получените от нас резултати, категорично да потвърждават способността на изследваните изолати да продуцират

този токсин. За тази цел беше създаден нов подход, при който се използва течна хранителна среда, която позволява съчетаването на качествено определяне на изолатите, като продуценти на ОТА с количествено определяне на синтезираните от тях токсини.

И при двата приложени варианта на култивиране в течна хранителна среда, отново проверката на способността на колбите да флуоресцират под действието на ултравиолетова светлина започна още от първия ден на развитието на културите. Флуоресценцията беше наблюдавана при някои от пробите с разбъркване на клатачка от втория ден на развитие на културите. При същите култури, но със статично развитие флуоресценцията беше установена до седмия ден.

При сравнително разглеждане на приложените техники за качествено определяне на микотоксикогенните изолати се наблюдават съществени различия. Докато при използването на YES само 3 от изолатите са определени като продуценти на ОТА, то при използването на среди на кокосова основа положителните резултати са значително повече. Разнообразни са и резултатите получени при проведеното изпитване върху твърда и течна хранителна среда, както и при двата вида култивирането в течната хранителна среда. Всички резултати получени чрез различните техники за качествено определяне на микотоксикогенни изолати са представени в табл. 1

Таблица 1: Сравнително разглеждане на техниките за доказване способността на плесенните изолати да продуцират охратоксин А

№	Изолат	Използвани хранителни среди			
		YES	ССА	ССМ Статично култивиране	ССМ Култивиране чрез разбъркване
1	<i>Penicillium spp.</i> 117 R	++	+	+	+
2	<i>Penicillium spp.</i> 113 R	++	+	+	+
3	<i>Penicillium spp.</i> 104 R	-	+	+	+
4	<i>Penicillium spp.</i> 105 R	-	+	+	-
5	<i>Penicillium spp.</i> 106 R	-	+	-	-
6	<i>Penicillium spp.</i> 103 R	-	+	+	+
7	<i>Penicillium spp.</i> 116 R	-	+	-	-
8	<i>Penicillium spp.</i> 101 R	-	+	+	+
9	<i>Aspergillus spp.</i> 27CG	++	-	-	-

+ - флуоресценция

- липсва флуоресценция

++ наличие на ОТА

При използването на твърда хранителна среда, 8 от културите с изключение на *Aspergillus spp.* 27CG са положителни. За разлика от тях при статично култивиране в течна хранителна среда положителните резултати са шест, а при култивирането чрез разбъркване са пет. Всички флуоресциращи в синьо колби, заедно с нефлуоресциращия *Aspergillus spp.* 27CG, бяха подложени на количествено определяне, а получените резултати бяха обобщени в таблица 2:

Таблица 2: Количествено определяне на продуцирания охратоксин А

№	Изолат	Съдържание на ОТА в ng/ml	
		Статично култивиране	Култивиране чрез разбъркване
1	<i>Penicillium spp.</i> 117 R	5,51 ± 0,53	1,62 ± 0,43
2	<i>Penicillium spp.</i> 113 R	14,53 ± 0,59	1,51 ± 0,08
3	<i>Penicillium spp.</i> 104 R	1,45 ± 0,29	0,17 ± 0,01
4	<i>Penicillium spp.</i> 105 R	3,52 ± 0,11	0,57 ± 0,00
5	<i>Penicillium spp.</i> 106 R	0,11 ± 0,04	ND
6	<i>Penicillium spp.</i> 103 R	20,44 ± 0,75	3,15 ± 0,01
7	<i>Penicillium spp.</i> 116 R	0,55 ± 0,06	0,05 ± 0,01
8	<i>Penicillium spp.</i> 101 R	0,79 ± 0,05	0,24 ± 0,03
9	<i>Aspergillus spp.</i> 27CG	14,62 ± 2,11	0,36 ± 0,01

ND – не е установено наличие на ОТА

Стойностите на получените концентрации на ОТА силно варират – от 0,1 ng/ml до 20,44 ng/ml при статичното култивиране и от 0,05 ng/ml до 3,15 ng/ml при култивирането с разбъркване. От така получените резултати за съдържанието на ОТА в културалните среди и по-малкия брой положителни резултати от качествено им определяне, може да се заключи, че култивирането с разбъркване е неподходящо за провеждането на подобен скрининг. От друга страна голямото разнообразие в съдържанието на ОТА е пряко обвързано и със силата и способността на продуцентите на ОТА. Колкото по-силни са те, толкова по-вероятно е да бъде наблюдавана по-интензивна флуоресценция и да се получат по-високи концентрации на ОТА в сравнение с по-слабите продуценти, при които флуоресценцията може дори да не се наблюдава. Получените количествени резултати при статичното култивиране корелират и с резултатите получени с YES и тънкослойна хроматография. Изолатите, които са по-силни продуценти на ОТА при култивирането в YES, са силни продуценти и в течна кокосова среда. Но понякога се наблюдават и изключения, каквото е 103R. То може да се обясни с изискванията на отделните изолати към вида на хранителната среда.

С помощта на предложения метод за екстракция може да се потвърди категорично наличието на ОТА, тъй като се използват имуноафинитетни колонки. При тях имаме специфична реакция на принципа на взаимодействието антиген-антитяло, а при HPLC анализа се получава много добра хроматографска картина, за разлика от други методи с директно инжектиране на екстракт от хранителна среда ССА, върху която са развити продуценти на ОТА.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На базата на получените резултати може да се заключи, че предложения от нас метод позволява бързо и лесно качествено определяне на продуцентите на ОТА, но също така дава възможност и за неговото количествено определяне, при което използването на имуноафинитетни колонки осигурява специфичност и добра хроматографска картина. За разлика от по-дългото култивиране върху YES,

плесенните култури се развиват бързо върху кокосовата среда. Методът се характеризира и с по-голяма чувствителност спрямо други методи и поради това може да бъде отчетен микотоксикогенния потенциал и при по-слабите продуценти на ОТА.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

- [1] Davis, N., S. Iyer, U. Diener, Improved method of screening for Aflatoxin with a Coconut Agar Medium, Applied and Environmental Microbiology, 1987, 1593 - 1595
- [2] Khalesi, M., N. Khatib, The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production, Environmental toxicology and pharmacology, 2011, 113 – 121
- [3] Magan, N., D. Aldred, Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities, Food Additives and contaminants, 2005, 10 – 16
- [4] Mohamed, S., S. Flint, J. Palmer, G. Fletcher, J. Pitt, An extension of the Coconut cream agar method to screen Penicillium citrinum isolates for citrinin production, Letters of Applied Microbiology, 2013
- [5] Sarigiannis, Y., J. Kapalos, A. Koliadima, T. Tseggenidis, Ochratoxin A levels in Greek retail wines, Food control, 2014, 139 – 143
- [6] Varga, J., R. Samson, Aspergillus in the Genomic Era, Wageningen Academic Publisher, The Netherlands
- [7] Yazdani, D., M. Zainal Abidin, H. Tan, S. Kamaruzaman, Evaluation of the detection techniques of toxicogenic Aspergillus isolates, African Journal of Biotechnology, 2010, 7654 - 7659

#### **За контакти:**

Анелия Георгиева Георгиева, Катедра “Биотехнология”, Университет по хранителни технологии гр. Пловдив, тел.: 0897972008, e-mail aneliya@uft-bio.com  
Проф. д-р Ангел Иванов Ангелов Катедра “Биотехнология”, Университет по хранителни технологии гр. Пловдив, тел.: 0887475763, e-mail angelov@uft-bio.com

#### **Докладът е рецензиран**