

DEBRECENI EGYETEM  
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM  
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR  
ÁLLATTENYÉSZTÉS- ÉS TAKARMÁNYOZÁSTANI TANSZÉK

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
Doktori Iskola vezető: Dr. Kovács András

*Témavezető:*  
**Dr. Gundel János**

*Szakmai konzulens:*  
**Dr. Mátrai Tibor**

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Hazai szénák penészfertőzöttségének vizsgálata és a vizsgálati  
módszerek fejlesztése**

*Készítette:*  
**Sipiczki Bojana Nóra**  
doktorjelölt

**Debrecen**  
**2006**

## **1. A kutatás előzményei**

### **1.1. A téma elméleti és gyakorlati jelentősége**

Szénák készítése és használata a gazdasági állatfajok háziasításával egyidős. Eurázsia északi területein a nyári fűtermés feleslegének levágása, szárítása és tárolása tette lehetővé a szarvasmarhák és a juhok átteleltetését, valamint a lovak takarmányozását.

A szénák, a gazdasági állatok takarmányozásában, napjainkban is nélkülözhetetlenek a következők miatt:

- 1) Magyarország éghajlati viszonyai nem teszik lehetővé a legeltetést egész éven át. A tömegtakarmányt (rostot) igénylő állatok (szarvasmarha, juh, kecske, ló) a téli időszakban tartósított (szárított, erjesztett) takarmányt fogyasztanak, de ezen kívül az egészséges bendőműködés elősegítés érdekében, a széna etetése nélkülözhetetlen.
- 2) a szénák magas rosttartalmával a kérődző állatok rostigényét a legtermészetesebb formában lehet kielégíteni.
- 3) a széna többi táplálóanyagai közül, a fehérje, a karotin, az ásványianyagok és a magas D-vitamin tartalom tekinthető az állat szükségleteinek kielégítéséhez hozzájáruló faktornak.

A gazdasági állatok elvárható termelési szintjeinek biztosítása érdekében szükséges, hogy az ember által nyújtott takarmány táplálóanyag-tartalma és mikrobiológiai állapota romlás, károsodás nélkül jusson el az állatokhoz.

A takarmány-alapanyagok minősítése általánosságban a következő tulajdonság-csoportokra terjed ki:

- 1) táplálóanyag-tartalom (kémiai vizsgálatok alapján számítható: emészthető, hasznosítható, nettó), makro- és mikrokomponensek.
- 2) nem kívánatos anyagok (tiltott anyagok), toxikumok (környezeti, feldolgozásból származó), nehézfémek, toxikus vegyi anyagok, mikotoxinok
- 3) minőségromlást okozó tényezők (mikrobiológiai állapot, mikotoxinok, zsíroxidáció)

A hivatalos magyar mikrobiológiai takarmányminősítést, a vizsgálandó paramétereket és a jellemző értékeket, valamint határértékeket (a disszertáció fogalmazásának időpontjában) a 44/2003. (IV. 26) FVM rendelet 2. számú melléklete határozza meg, illetve szabályozza. Ennek nagy fogyatéka, hogy a penész- és élesztőszám vizsgálatát nem irányozza elő, továbbá határértéket sem állít. Ugyanígy a szálás- és tömegtakarmányok minősítését is figyelmen kívül hagyja.

A szénák osztályba sorolása, az eddigi magyar gyakorlatban, kizárólag a kémiai összetevők alapján történt (II. Takarmány Kódex táblázatos adatai.). A széna organoleptikus tulajdonságaira (szín, szag, szálhossz, állag), de főleg a mikrobiológiai romlás szemmel látható jeleire nézve, objektív minősítő módszert és ennek megfelelően, osztályba sorolást sem találunk.

Az MSz 17671-1988 szabvány, ami a szénákat kémiai összetevők alapján minősíti, csupán egy mondatot tartalmaz a mikrobiológiai követelményekre vonatkozóan: „a széna nem lehet mikrobiológiailag és toxikológiailag kifogásolható”. Így a penészedés mértéke, vagy annak hiánya, objektíve nem kvantifikálható, ezért nem írható elő és főleg nem kérhető számon.

Ugyanakkor a szénák penészek inváziójának minden más takarmány-alapanyagnál fokozottabban vannak kitéve készítésük közben. Ennek okai: a) aratás idején jelentős a talajról, a romló növényi részekről származó spórafertőződés (terméktipikus gombafertőzöttség); b) innen kiindulva a technológiától függően a learatott fű  $a(w) = 0,75$  feletti vízáktívásnak lehet kitéve, ami az elhalóban lévő növény biológiai hőtermelése, a gyorsan gradációnak induló élesztők és aerob spórás baktériumok mellett, a penészek hirtelen felszaporodásának is optimális feltételeket biztosíthat; c) ezen kívül, a penészek olyan, viszonylag alacsonyabb vízáktíváson is szaporodnak, amelyen a baktériumok (aerob spórások) és az élesztők gradációja még nem indulhat meg.

A szabványerejű előírások jelenleg is fennálló hiányossága, hogy nem állítanak fel határértékeket, irányszámokat, pedig ezek nélkül a szénák objektív mikrobiológiai minősítése lehetetlen. Ha a szénákat csak kémiai összetevők alapján minősítjük, és nem vesszük figyelembe a mikrobiológiai jellemzőket, a tényleges használati értéket tekintve félrevezető eredményhez juthatunk.

Az előbbiekben vázolt helyzet határozta meg munkám kiinduló helyzetét és célkitűzéseit:

- a hazai szénák penészflóráját jellemezni, és a penészedés számszerű mértékét a szokásos szenzorikus bírálattal összevetve értékelni,
- a szénán előforduló penészek toxikológiai kockázati szerepét mérlegelni,
- a penészek felszaporodását befolyásoló egyes feldolgozási tényezők hatását vizsgálni, és
- olyan mikrobiológiai vizsgálati módszereket adaptálni, illetve fejleszteni, amelyek a széna sajátosságaihoz igazodnak.

## **2. A kutatás célkitűzései**

1) **A hazai szénák penészflórájának kvalitatív és kvantitatív reprezentatív vizsgálata a szenzorikus bírálattal összefüggésben.** A vizsgálat célja a leggyakoribb terméktipikus flóraelemek és az átlagos minőségre jellemző terméktipikus penészs szám (TKE) megállapítása, az átlagos (tipikus) minőség mikrobiológiai leírása.

2) **A szénán előforduló penészek toxikológiai kockázati szerepének értékelése.** A vizsgálati anyag alapján, a toxinogén flóraelemek előfordulásának értékelése, kiemelt esetekben kísérletek mikotoxin szennyezettség kimutatására, irodalmi tájékozódás a szénák toxin-szennyezettségének hivatalos szabályozására és a kazuisztikai adatokra nézve.

3) **A penészek tömeges felszaporodásáért (gradációjáért) felelős feldolgozási tényezők hatásának kísérletes vizsgálata.** Kísérletek alapján határozzuk meg, hogy a széna betakarításakor a különböző tényezők közül melyik felelős leginkább a penészedésért, vagyis a terméktipikus mikoflóra gradációjáért. Tekintettel a szenázs gyakorlati jelentőségére, és a kitérés utáni másodlagos penészedés előfordulására, vizsgáljuk az erjedés során keletkező savak, és pH hatását a terméktipikus penészflóra másodlagos aerob felszaporodására.

#### 4) A széna sajátosságaihoz igazodó penészvizsgálati módszerek adaptációja.

Az 1) célkitűzés vizsgálatának megkezdésekor nyilvánvalóvá vált, hogy az abraktakarmányok vizsgálatára előírt tenyésztéses módszerek a szénák esetében nem válnak be, mert néhány, a szénán honos expanzív faj befutja a tenyészeteket és megakadályozza a többi flóraelem értékelését. Ezért inhibitorral kiegészített, a telepek alaktani elbírálására alkalmasabb talajösszetételt kell kikísérletezni. Emellett a korábbi munkák kapcsán abraktakarmányok *Aspergillus* fertőzöttségének kimutatására kifejlesztett *Aspergillus*-invertáz teszt (MÁTRAI és mtsai, 2000) alkalmasságát vizsgáltuk szénák penészfertőzöttségének jelzésére. Ugyancsak a penészkimutató vizsgálati idejének lerövidítésének reményében vizsgáltuk azt, hogy penész-DNS kinyerése és RT-PCR vizsgálata az AllFunTaq gombaspecifikus primerrel, mennyiben szolgáltató együttfutó eredményt a takarmányvizsgálatban mindeddig autentikusnak elfogadott élőcsíra-tenyésztéses TKE meghatározással. A szénák penészszenyezettségének gyors, tájékoztató elbírálására felmerülhet a szénamintákból készített alapszuspenzió mikroszkópos vizsgálata. Ennek kapcsán kísérleteket végeztünk olyan szelektív festési módszer kidolgozására, amivel könnyen megkülönböztethetők a penész eredetű képletek, a szuszpenzióban előforduló más növényi és állati eredetű mikroképletektől, és számlálhatók is.

5) A penészes tömegetakarmányokról ezidáig nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. A mikológia, a takarmányhigiéna, és a laboratóriumi gyakorlat területéről kell olyan publikációkat gyűjteni, amelyek segítik a „szénamikológia” problémájának megértését. Céлом volt a szénákon élő penészgombákkal, azok kimutatásával, életfeltételeivel kapcsolatos irodalom összegyűjtése is.

### **3. A kutatás módszerei**

#### **3.1. Szénák terméktipikus csíraszámának megállapítása**

##### *• Reprezentatív minták begyűjtése*

Szénák penészfertőzöttségének (penészsám, TKE) meghatározását 76 db (41 db lucerna és 35 db fű), Hajdú-Bihar és Pest megye eltérő adottságú területeiről gyűjtött, reprezentatív szénamintán végeztük el. A mintavételek során semmiféle minőségi preferenciát nem érvényesítettünk, felhasználói panaszra vagy kifogásra nem voltunk

tekintettel azért, hogy a minták gyakorlati átlagként legyenek elfogadhatók. Ezekben a vizsgálatokban mintavételi helyként mindig a tétel legnagyobb mennyiségét képviselő részét jelöltük ki. A bálák belsejéből, mintegy 10 cm vastag külső szénaréteg lefejtése után, kb. 1 kg tételt gyűjtöttünk fóliazsákokba. A bálák kiválasztása véletlenszerű volt, mind pajta alól, mind szabadban tárolt tételeknél. Feljegyeztük a sorszámot, a mintázás időpontját a bála elhelyezkedését, illetve kitettségét az időjárási viszonyoknak, továbbá, ha ismert volt, a múltját (“egyszer megázott”, “renden megázott”,...stb.). A zsákokat a mintázás napján a laboratóriumba szállítottuk, majd azonnal feldolgoztuk.

• *Érzékszervi vizsgálat*

A mintákat, először érzékszervi bírálatnak vetettük alá. Megállapítottuk a minták jellemző botanikai összetételét, színét, szagát, porosságát és penészesedésre utaló nyomok előfordulását.

• *Mikológiai vizsgálat*

Az alapszuszenziót, manuálisan aprított (3 mm-es átlagos szecskaméretű) minta 10 grammjának, 90 ml vízzel történő 20 perces rázatásával készítettük. A decimális hígítási sort lemezöntéses technikával, az MSz ISO 7954 horizontális vizsgálati szabványban előírt táptalajra vittük. A minta  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  és  $10^{-5}$  hígításaiból 1,0-1,0 ml-t Petri-csészébe adagoltunk, majd 15 ml MSz ISO 7954 táptalajjal (5,0 g élesztőkivonat, 20,0 g glükóz, 0,01 g kloramfenikol, 12-15 g agar / 1000 ml deszt. víz, pH 6,6-ra beállítva) terítettük. A csészéket 25°C hőmérsékletű termosztátba helyeztük. Az inkubálás 5. napján a TKE-eket azokon a hígításokon számoltuk meg, amelyeken a telepek száma 100 és 200 közé esett. A mikrobiológiai gyakorlatnak megfelelően, az adatok értékelésében, és azok szemléltetésében, a mintatömegre visszszámított TKE érték decimális logaritmusait használtuk.

### **3.2. A szénák terméktipikus flóraelemeinek és a toxinogén fajok előfordulásának vizsgálata**

A szénaminták TKE kiértékelése után, további 1-5 napos inkubálás alatt a toxinogén *Aspergillus*, *Penicillium* és *Fusarium* fajok telepeit vizsgáltuk. A konídiumképletek megjelenése után e fajok telepeit mikroszkópos azonosítással lemezenként értékeltük. A toxinogén fajok előfordulását összevetettük a szénák érzékszervi és TKE szám eredményeivel.

### 3.3. A penészek tömeges felszaporodásáért felelős fizikai tényezők vizsgálata szénákon

A terméktipikus penészflóra szaporodáskinetikáját különböző víztartalmú fűmintákon (17,65, 37,5, 52,64 %) különböző relatív páratartalmakon (75, 84, 95, 100%) és hőmérsékleteken (15, 25°C) konstans vízakaktivitású pára kamrákban vizsgáltuk.

#### • *A konstans páratartalom kialakítása*

Az általunk használt konstans páratartalmat (ERP, %-ban kifejezve) biztosító pára kamrák azon alapulnak, hogy a szervesetlen kristályok telített sóoldatai, zárt rendszerben, az oldat fölötti térben szigorúan állandó, és az egyes sókra jellemző, relatív ERP-t biztosítanak. Az ebbe a térbe behelyezett takarmányminta így állandó páratartalomra tartható, és ezen keresztül, vízakaktivitása a kiválasztott értékre beállítható. Pára kamraként mikrohullámú főzésre gyártott műanyag fedeles dobozt használtunk, amelynek fenekén a telített oldat, állványán pedig a minta foglal helyet. A kamrákat, a légcserét megakadályozására, műanyag ragasztószalaggal zártuk le. Ezek a kamrák könnyen elhelyezhetők a különböző hőmérsékletet biztosító inkubátorokban. A penészgombák életfeltételeinek kielégítéséhez és szaporodásához, legalább 0,7  $a_{(w)}$ -ra van szükség. Ezért az erre a célra alkalmas (VAS és CSONTOS, 1956) szervesetlen kristályok közül hármát választottunk ki: NaCl –  $a_{(w)}=0,75$ , amely fölött 75%, KCl –  $a_{(w)}=0,84$ , amely fölött 84% és  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  –  $a_{(w)}=0,95$ , amely fölött 95% RH értékű páratartalmat biztosíthattunk.

A beállított pára kamrákba, azonos mennyiségű, különböző mértékben előfonnyadt, 17,65%, 37,5%, 52,64% nedvességtartalmú, kaszált fűmintákat (*Lolium sp.* 80%, *Festuca sp.* 10%, *Bromus sp.* 10% keveréke) helyeztünk el és 15 és 25°C-on inkubáltuk.

#### • *Mikológiai vizsgálat*

A penésznövekedést, a TKE szám meghatározásával, a 0., 4., 8. és 14. napon állapítottuk meg MSz ISO 7954 szabvány szerinti lemezöntéses módszerrel.

### 3.4. Szénák, és a kukoricamag terméktipikus penészflórájának valamint az *Aspergillus parasiticus*-nak az érzékenysége erjedési savak (laktát, acetát) jelenlétére

#### • *Mintaelőkészítés*

a) Szénából, a terméktipikus penészflóra vizsgálatára, országos felmérés keretében végzett vizsgálatsorozatban, átlagos minőségű, dominánsan *Lolium perenne*-t tartalmazó mintákból készítettünk alapszuspenziót, a 3.1. pontban leírt mikológiai vizsgálati módszer szerint.

b) kukorica (mag) vizsgálatára, 2002-es termésű, egészséges tételek vegyes örleményéből készítettünk alapszuspenziót;

c) modell-organizmusként, a laboratóriumunk törzsgyűjteményében fenntartott, a Magyar Nemzeti Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény által hitelesített (1999), *Aspergillus parasiticus* friss tenyészetéből,  $10^9$ /ml koncentrációjú konídium-szuspenziót készítettünk.

#### • *Standard táptalaj (kontroll) készítése*

Standard talaj: MSz ISO 7954 szerinti összetétel (20,0 g glukóz, 5,0 g élesztőkivonat, 0,01 g klóramfenikol, 12-15 g agar / 1000 ml deszt. víz); pH 6,6.

#### • *Kísérleti táptalaj-variánsok készítése*

1. Laktát hatásának vizsgálatára: a fenti talajhoz 1,0 vagy 2,0 % (töm/térf. %) mennyiségben semlegesített Na-laktátot adtunk.

2. Tejsavas erjedés közegének vizsgálatára: 80 °C-on, 20 percig előlt, *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*)  $10^9$ /ml nagyságrendű szubmerz tenyészetéből, az MSz ISO 7954-nek megfelelő táptalajösszetételt állítottuk elő, az előlt *Lactobacillusok* és metabolitjaik feltételezett inhibitor hatásának vizsgálatára.

3. Az acetát hatásának vizsgálatára: az alaptalajba 2 % laktáttal ekvimoláris 1,5 % koncentrációjú semlegesített acetátot adtunk.

4. pH hatásának vizsgálatára: 1 % laktátnak megfelelő tejsavat, az alaptalajban, NaOH-val pH 6,5; 5,5 és 4,5-re állítottuk be.

#### • *Kísérleti tenyészközegek:*

Az MSz ISO 7954 talajösszetételt alapul véve (a továbbiakban a komponensekre utalva: glu-ye-chlo stb. formában rövidítve), a növekedést a 1. táblázatban bemutatott kísérleti táptalajokon vizsgáltuk.

1. táblázat: A kísérleti táptalajok összetétele

tenyészközeg sorszáma	MSz ISO 7954 komponensek	kezelés
1.	glu-ye-chlo	kontroll, pH 6,5
2.	glu-ye-chlo	+ 1,0 tömeg/térfogat % Na-laktát
3.	glu-ye-chlo	+ 2,0 tömeg/térfogat % Na-laktát
4.	0-ye-chlo	szénforrás nélkül
5.	0-ye-chlo	+ 2,0 % Na-laktát, mint szénforrás
6.	glu-ye-chlo	penésztalaj előlt szubmerz <i>Lactobacillus</i> tenyészetten
7.	glu-ye-chlo	+ 1,5% acetát
8.	glu-ye-chlo	+ 2% Na- laktát + 1,5% acetát
9.	0-ye-chlo	+ 1,5% acetát
10.	glu-ye-chlo	+ 1% Na-laktát pH 5,5
11.	glu-ye-chlo	+ 1% Na-laktát pH 4,5
12.	0-ye-chlo	+ 1% Na-laktát pH 4,5

• *Inokuláció, inkubálás*

A kísérleti és kontroll talajokkal, valamint az inokulumokkal, 10 cm átmérőjű Petri-csészékbe, Koch-szerint, lemezöntést végeztünk, majd azokat 25 °C-on, vízköpenyes, bakteriológiai termosztátban inkubáltuk.

• *A mikrobanövekedés gátlásának elbírálása és mérése*

Valamennyi kísérleti talaj esetében a tenyészetekben, a telepek elbírálása alapján meghatároztuk

- a numerikus gátlást - a TKE százalékos aránya a kontrollhoz képest;
- a miceliális növekedés ütemét - telepek átlagos átmérője a kontroll százalékában kifejezve az inokuláció során, azonos időpontban;
- a konídium képződés megindulását - inkubálási napokban, és ezen felül,
- a jellegzetes telepképleteket.

### 3.5. Kísérletek a szénák mikológiai vizsgálatára alkalmas táptalajreceptúra összeállítására

Tömegtakarmányok penészfertőzöttségére jellemző a *Mucor* faj gyakori jelenléte. A fajra jellemző a táptalajt hamar befutó, gyors növekedés és az erőteljes légmicéliumképzés, ezért a kiértékelést nehezkesé, gyakran lehetetlenné teszi. A cél, egy olyan táptalajreceptúra összeállítása, ami visszaszorítja a *Mucor* növekedését a többi flóraelem gátlása nélkül. Kiinduló táptalajként, a gabonák mikológiai vizsgálatára alkalmas MSz ISO 7954 szabványtalajt használtuk.

Vizsgálatainkban, származási helyre és minőségre nézve, vegyes fű- és lucernaszéna mintákat dolgoztunk fel. A széna mintákat 0,5-1 cm-es darabokra vágtuk, majd, az alapszuspenzió készítéséhez, 10,0 grammot mértünk be.

#### • Alapszuspenzió és hígítási sor készítése

A bemért mennyiségeket, 90 ml steril desztillált vízzel, 20 percig rázógéppel rázattuk. Ebből az alapszuspenzióból, 200 x 16 mm kémcsövekben, decimális hígítási sort készítettünk. A hígítási sor tagjaiból (általában a  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  hígításokból) lemezöntést végeztünk a kísérleti táptalajokkal.

#### • Táptalajok összetétele

##### MSz ISO 7954

*Horizontális módszer a penész és élesztőszám meghatározására. A szabványban előírt talajösszetétel:*

20,0 g glukóz, 5,0 g élesztőkivonat, 0,1 g kloramfenikol, 12-15 g agar, 1000 ml talajban.

##### DRBC

*Általánosan használt receptúra, King és mtsai (1979) szerint.*

Összetétele: 10,0 g glukóz, 5 g pepton, 1,0 g  $\text{KH}_2\text{PH}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 12-15 g agar, 25,0 mg Rose Bengal, 2 mg dichloran, 1000 ml talajban

##### MSz ISO 7954 + DC

*A szabványtalaj kiegészítése a DRBC talajban alkalmazott mennyiségű dichlorannal (2,6-dichlor-4-nitroanilin) feltételezve annak gátló hatását az expanszív fajokra.*

Összetétele: 20,0 g glukóz, 5,0 g élesztőkivonat, 0,1 g kloramfenikol, 12-15 g agar, 2,0 mg dichloran, 1000 ml talajban

#### 1/4 N MSz ISO 7954

*A szabványtalaj tápanyagszintjeinek csökkentése egynegyedére, abból a feltételezésből kiindulva, hogy ez az expanszív fajok miceliális növekedését viszonylag jobban hátráltatja, mint a lassúbb fejlődésű fajokét.*

Az ISO 7954 összetétel előírt tápanyagkoncentrációinak egynegyede: 5,0 g glukóz, 1,25 g élesztőkivonat, viszont a teljes mennyiségű, 0,1 g kloramfenikol, 12-15 g agar, 1000 ml talajban.

#### 1/4 N DRBC

*A DRBC receptúra tápanyagkomponenseinek csökkentése egynegyedére az inhibitorok megtartása mellett.*

Összetétele: 2,5 g glukóz, 1,25 g pepton, 1,0 g  $\text{KH}_2\text{PH}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 12-15 g agar, 25,0 mg Rose Bengal, 2,0 mg dichloran, 1000 ml talajban.

#### 1/4 N DC

*Ebben a tápanyagkoncentráció a King-féle DRBC összetétel egynegyede, viszont inhibitorként csak dichlorant tartalmaz.*

Összetétele: 2,5 g glukóz, 1,25 g pepton, 1,0 g  $\text{KH}_2\text{PH}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15-20 g agar, 2 mg dichloran, 1000 ml talajban

#### DRBC + DSA

*Az aromás dinitroszármazékok (dinitro-orto-krezol, DNOC növényvédőszer) fungicid hatásának analógiájára ebben a kísérleti talajváltozatban a DRBC összetételben a dichloránt semlegesre puffert, a DNOC-nál polárosabb dinitro-szalicilsavval (DSA) egészítettük ki.*

Összetétele: 10,0 g glukóz, 5,0 g pepton, 1,0 g  $\text{KH}_2\text{PH}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15-20 g agar, 25,0 g Rose Bengal, 2,0 mg dichloran, 10 mmól DSA, 1000 ml talajban

#### *• Törzsoldatok:*

- Rose Bengal törzsoldat: 5,0 % -os vizes oldat (0,5 ml 1000 ml talajban)
- dichloran törzsoldat (2,6-dichlor-4-nitroanilin (Merck)): 0,2 %-os etanolos oldat (1,0 ml / 1000 ml talaj)

#### *• Lemezöntés*

A hígítási sor tagjaiból, 1,0-1,0 ml-t, a Petri-csészékbe (100 mm átmérőjű) pipettáztunk. Ezután a megolvasztott, majd 43-45 °C-ra lehűtött táptalajból, 15,0-15,0 ml-t öntöttünk rá és a laminár-box lapján körkörös csúsztató mozgással elkevertük. Kidermedés után a csészéket 25 °C-os inkubátorba helyeztük.

#### *• TKE leolvasása*

A *Mucor* növekedésének megjelenését, 24 óra eltelté után, naponta ellenőriztük.

A különböző talajverziókon 4-5 napos tenyésztési idő után számoltuk meg a lemezeken kifejlődött összes penésztelepet, és morfológiai bírálatot végeztünk.

• *Morfológiai tájékozódás*

A telepek színe, felülete és a konídiumképletek alakja (mikroszkóp) szerint.

### **3.6. Kísérletek szelektív propagulum-festési technika kidolgozására**

Kísérleteinkben a szénák alapszuspenzióinak mikroszkópos vizsgálatára olyan színezéket kerestünk, ami

- a hífát és a spórákat egyaránt erősen festi,
- a növényi rostokhoz, szőrökhöz, mikroszkópikus állati szervezetekhez és képletekhez gyengébben kötődik,
- nagyon jó vízdoldhatóságú, ami vizes kimosással lehetővé teszi a lebegő elemek festék-kötődés szerinti differenciálását,

A kialakított technika szerint, az alapszuspenziót agar-mátrixba visszük, festék oldattal hőkezeljük, majd tárgylemezre visszük. Az agar-mátrix kidermedése után vizes áztatással differenciálunk. Feltételezésünk az volt, hogy a propagulumok a festéket mosás után is megtartják, míg a többi képletből a festék, jó vízdoldhatósága miatt, kimosódik.

• *Az alapszuspenzió elkészítése*

12 x 120 mm-es kémcsőben, 1,0 ml 15 %-os agaros vízbe, 1,0 ml széna, gabona vagy csak hífát tartalmazó szuszpenziót adagoltunk.

• *Festés*

Kísérleti festékoldatok:

Rose Bengal (RB) 5 %-os törzsoldatból 3 csepp (cca. 70 µl), (C<sub>20</sub>H<sub>2</sub>O<sub>5</sub>I<sub>4</sub>Cl<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>, CI: 45440)

Malachitzöld telített vizes oldatból 3 csepp (cca. 70 µl), (C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>Cl, CI: 42000)

Amido black (AB) (3,4-re pufferált, 0,6%) oldatból 6 csepp (cca. 140 µl), (C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>, CI: 20470)

Sudan III, (C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O, CI: 26100)

A kémcsövek tartalmát Vortex-szel többszörösen felkevertük, borszeszégőn 3-szor felforraltuk, majd még forró állapotban tárgylemezre kiszélesztettük mintegy 0,5 mm vastagságban. Dermedés után a tárgylemezeken lévő agarréteget vízszintes helyzetben deszt. vizes fürdőben 5, 30 és 60 percig differenciáltuk. Sudan III festés esetében, víz helyett etilén-glikolban áztattunk 10 percig, majd vízzel öblítettünk.

• *Elbírálás, vizsgálat*

Fénymikroszkóppal, áteső fényben, 250x nagyítással, a

- friss rétegben, vagy
- száradás után (ebben az esetben a beszáradt agarréteg még nem torzít jelentősen).

**3.7. Kísérletek az invertáz-teszt alkalmazhatóságára néhány, a szénákon előforduló jellemző genus esetében**

Az invertáz-teszt alkalmazása felmerülhet szénák penészfertőzöttségének gyors jelzésére is. Gabonafélék terméktipikus és raktári penészeivel ellentétben, a szénák terméktipikus flórájában, a *Mucor* és a *Trichoderma* kivételével, lassan növekedő 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.

• *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*, *Trichoderma viridae* és *Trichotecium roseum*.

• *Az Aspergillus-invertáz teszt*

Ezt a vizsgálatot Mátrai és mtsai (2000) által kidolgozott módszer szerint végeztük

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 vízfürdőben hűlni hagytuk.

Alapsuszpenzió: 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 alapszuspenzióból kiindulóan decimális hígítási sort készítettünk. A hígítási sor minden tagjából 100-100 µl-el 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*

Ezt, 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.

### **3.8. DNS RT-PCR-rel az ALLFun-Taq penész-specifikus primer segítségével kapott kópiaszám és a tenyésztéses (szabvány) módszerrel meghatározott TKE összefüggésének vizsgálata**

Az összehasonlító vizsgálatokat 8, vegyes minőségű szénamintán (5 fű, 2 lucerna és 1 szalma) végeztük el.

#### Telepképző egység szám (TKE) meghatározása lemezöntéssel

A penész TKE-t a 3.1. pontban leírt mikológiai vizsgálati módszer szerint határoztuk meg (MSz ISO 7954 horizontális módszer)

#### A penészgombák kimutatása RT-PCR reakcióval

• *A szénminták előkészítése a DNS kivonására*

**Az első kísérletsorozatban** a szénmintákat, (a penészs szám meghatározáshoz végzett feldolgozással azonos módon), mintegy 0,8 cm méretűre szecskáztuk. A minták sorszáma: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49.

**A második kísérletsorozatban** a 42, 43, 45, 47 és 48 sz. minták előkészítésében fokozottabb, a sejtsztruktúrákat jobban feltáró feldolgozást végeztünk, mert az első kísérletsorozat eredményei nyomán azt feltételeztük, hogy a szénminta aprítottsága és mechanikai feltártsága elégtelen volt. A 0,8 cm méretűre szecskázott mintákat 1/1 tömegarányban, 0,1 mm és ennél kisebb szemcseméretű kvarchomokkal, Fritsch "Pulverisette" 02.102 típusú achát-malomban, 120 percig dezintegráltuk.

A 48-as számú penészes lucernaszéna minta dezintegrálása után, a nem aprózódó rostszálakat elkülönítettük, ezt 48R, a kiszitált por frakciót 48P megjelöléssel vizsgáltuk.

A 48P és 48R minták kópiaszámának összehasonlításával azt vizsgáltuk, hogy a nem aprózódó frakcióban visszamaradó DNS mennyisége mennyire jelentős a kiszitált porból izolálható DNS mennyiségéhez képest.

A szecskázott mintákat, majd a hatékonyabb DNS kivonás érdekében, a kvarchomokkal dezintegrált mintaörleményt, az együttműködő intézetbe, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel-be (BFEL), Karlsruhe küldtük.

Az előkészített minták AllfunTaq kópiaszámát, a németországi együttműködő laboratóriumban vizsgálták.

• *A DNS kivonása és izolálása a szénmintákból*

Az AllfunTaq bevizsgálása során a penész szintenyészetekből, és mesterségesen fertőzött élelmiszerekből, a DNS és RNS izolálásának technikai lépéseit, valamint az AllfunTaq primer fejlesztésének technikáját a disszertáció 3.5.2. fejezetében ismertetjük.

**Az első mintasorozatban** (42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 és 49 minta) a DNS izolálást, 0,1 g előkészített szénmintából, a "Dneasy Plant Mini Kit"-tel (Quiagen, Hilden, Germany) végezték a gyártó utasításai szerint, a sejtek mechanikus feltárását folyékony nitrogénben történő eldörzsöléssel, az együttműködő intézetben végezték. Az első mintasorozat kópiaszámainak értékelésekor felmerült a mechanikus dezintegrálás elégtelenségének kérdése.

**A második mintasorozatot** (42, 43, 45, 47, 48P, 48R), kvarchomokkal, Fritsch "Pulverisette" 02.102 típusú achát-malomban, 30 percig dezintegráltuk és így finom, 100 mikrométeres szemcsefrakciót, és mellette kevés 0,1–0,3 mm-es szál asztalfrakciót,

sejtfalfrakciót kaptunk. Ezt a 48. sz. minta esetében külön, 48R és 48P mintaszámmal, vizsgáltuk. Ezután az együttműködő intézet a folyékony nitrogénes kezelést egy félórás alumíniumoxidos rázatással is kiegészítette. Az utolsó mosási lépés után a DNS eluálását 2x100 µl eluáló pufferral hajtották végre. Az így kapott DNS oldat 1 µl-ét használták az AllfunTaq Real-Time PCR reakciókban.

#### **4. Az értekezés főbb megállapításai**

##### **4.1. A szénák terméktipikus csíraszámának megállapítása**

Az MSz ISO 7954 szabvány szerint vizsgálva, a jó minőségű minták TKE/g tartalma  $3 \times 10^3$  –  $2,7 \times 10^4$  között, míg a szenzorikusan penészesnek ítélt mintáké  $3,2 \times 10^4$  –  $3,45 \times 10^8$  között változott. Az organoleptikus vizsgálattal megállapítható penészség min.  $5,7 \times 10^5$  TKE-t, a Pálfy-féle határérték (Pálfy és Kupai, 1986) ( $3,0 \times 10^4$ ) felett 1,0 log-gal magasabb TKE -t valószínűsít.

A begyűjtött 76 (100%) szénaminta közül 70 (92,1%) bizonyult a Pálfy-féle határérték feletlinek és csupán 6 (7,9%) minta minősült jónak a TKE vizsgálat alapján. Ezzel szemben érzékszervi vizsgálattal 58 (76,3%) mintát találtunk jónak és csak 18 (23,7%) szénát romlottnak.

Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy a szűrőpróbaszerűen vett minták (gyakorlati átlag) döntő többségében, a korábban ajánlott Pálfy-féle határértéken felüli penésszámot mutattunk ki a mikrobiológiai vizsgálattal, annak ellenére, hogy szenzorikusan csak a minták egynegyedét jósoltuk rossznak. Ez a megfigyelés is indokolja, az organoleptikus bírálat mellett, a mikrobiológiai vizsgálat szükségességét.

Amennyiben a minták botanikai összetételét vetjük össze a mikológiai állapottal, akkor látható, hogy a megvizsgált 41 lucernaszéna-minta (100%) TKE/g tartalma közül 39 minta (95,1%) volt a Pálfy-féle határérték fölött. A 35 rétiszéna-minta (100%) TKE/g tartalma alapján 31 minta (88,5%) haladta meg a Pálfy-féle határértéket.

A két széna fajtában, mint szubsztrátban, nincs alapvető különbség a penésszámok tekintetében.

A szénák leggyakoribb penésszáma  $10^5$  (27,6%),  $10^6$  (25%) és  $10^4$  (23,6%) / gramm volt. A minták 15,7%-a volt  $10^7$  nagyságrendű. Szélsőségesen magas,  $10^8$  penésszám 5,2%-ban fordult elő. A TKE számok számtani átlaga pontosan  $1,987 \times 10^7$ , amely érték nem tükrözi a leggyakoribb penésszámot. Ezért ezzel a számtani átlaggal nem

jellemezhetjük a szénák átlagos fertőzöttségét. Felmérő munkánk során begyűjtött szénák átlagosan  $10^5$ , azaz százezres nagyságrendű penészszámot tartalmaztak.

#### 4.2. A szénák terméktipikus flóraelemeinek és a toxinogén fajok előfordulása

Toxinogén genusok előfordulására nézve a penészflórát 60 (57 Pálffy féle határérték feletti, 3 határérték alatti) mintában értékeltük.

Ezek közül *Aspergillus* fajokat 23 (38,3 %) mintában találtunk. 22 mintára a Pálffy-féle III. osztály határértékét meghaladó TKE volt jellemző. *Penicillium* fajokat 26 mintából (43,3 %) mutattunk ki. 24 minta fölötté, 2 minta alatta volt a fenti határértéknek. *Fusarium* fajokat 23 (38,3 %) mintából lehetett kitenyészteni, és valamennyi penészszáma meghaladta a határértéket. A három TKE alapján jónak minősített mintában tehát *Penicillium* vagy/és *Aspergillus* fordult elő.

Látható, hogy a toxinogének előfordulása a határérték alatti vagy az azt meghaladó össz-penészszámmal nincs összefüggésben.

A 23 db *Aspergillus*-os mintából 6 (26 %) volt organoleptikusan penészesnek ítéltető, 17 nem. A 26 db *Penicillium*-os mintából 3 (11,5 %) volt láthatóan penészes, a 23 db *Fusarium*-os mintából is csak 6 (26 %) volt szemre penészes.

A toxinogének előfordulása tehát nem valószínűsíthető a minta organoleptikus tulajdonságaival sem.

A magyar takarmány-mikrobiológiai vizsgálati gyakorlattal ellentétben, az *Alternaria* genus tagjait nem soroltuk a potenciális toxinogének közé. A hazai és nemzetközi irodalomban ugyanis nincs egyértelmű adat arra, hogy a szénafogyasztó állatfajok körében az alternariol-toxikózisnak gyakorlati jelentősége lenne.

Egyéb megfigyelések:

Száraz lucernaszénában, az *Aspergillus* genus tagjai, újranedvesedés hatására nagymértékben felszaporodtak (tároló többszöri beázása, esőverte bálák).

A *Fusarium* fajok előfordulása észrevehetően ősszel volt gyakoribb.

Az MSz ISO 7954 szabványban előírt talajon, a széna penészflóra tagjai a tömegvizsgálat igényeit kielégítő gyorsasággal fejlődnek. Problémát okoz viszont a *Mucor* és a *Trichoderma* fajok túlnövése és szétfutása, ami egy speciális, inhibitort tartalmazó talaj használatát indokolja.

#### 4.3. A penészek tömeges felszaporodásáért felelős fizikai tényezők hatása szénákon

A penészek szaporodáskinetikáját konstans páratartalmú kamrákban inkubált fűmintákban, a TKE/gramm változásán keresztül kísértük figyelemmel. Ez a növekedési ráta a  $\Delta \log \text{TKE}/\text{nap}$  értékkel fejezhető ki. Megállapítottuk, hogy az első 8 nap alatt a növekedési rátát elsősorban a minta kiinduló nedvességtartalma határozza meg. Ha a minta nedvességtartalma 40 % fölötti, a penészgombák növekedése intenzív volt, függetlenül a kiinduló fertőzöttségtől, a páratartalomtól és a hőmérséklettől, de 90% páratartalom alatt, 15 °C-on a növekedés csak a 4. nap után indult meg. Az alacsonyabb kiinduló nedvességtartalmú minták (40% alatt) kezdetben, a magasabb relatív páratartalmú atmoszférában, penész-szám csökkenést mutattak. A 8. nap után a 40%-nál alacsonyabb nedvességtartalmú mintákban a penész növekedését meghatározóan a relatív páratartalom befolyásolta. A minták nedvességtartalmától függően, a 84% és alacsonyabb páratartalomon, a penészgombák növekedése között nem találtunk jelentős különbséget. A penészgombák növekedése 15 °C-on 0,1-0,21 logTKE/nap-pal volt kevesebb, mint 25 °C-on. Ez a különbség nem számottevő.

Megállapítható, hogy a penészgombák növekedését a szénákon, az első 8 nap alatt, a kaszáláskori és betakarításkori nedvességtartalom határozza meg. A 8. nap után, a penészgombák növekedése már döntően a relatív páratartalomtól függ.

A magasabb hőmérséklet a penészgombák növekedését nem gyorsítja jelentősen.

#### 4.4. A szénák és kukoricamag terméktipikus penészflórájának valamint az *Aspergillus parasiticus* érzékenysége az erjedési savak (laktát, acetát) jelenlétére

A széna terméktipikus penészflórájára a laktát kimutatható germinációs gátlást gyakorol, azonban a micéliális fejlődést nem gátolja (1., 2. és 3. talajok). A laktát gátló hatása, a szénaflóra különféle fajaira nézve, valószínűleg szelektív.

A szénaflóra fajtái szénhidrátmentes, de laktátot tartalmazó közegben gyakorlatilag 100%-ban kinőnek, a telepfejlődés 100%-os, tehát a laktátot a szénhidrátokkal azonos mértékben hasznosítják. Szénhidrátot sem és laktátot sem tartalmazó talajban, a növekedés 55%-os (1. és 5. talajok).

A szénaflóra növekedését az elölt *Lactobacillus* tenyészet közege mind a TKE-re, mind a telepnövekedés sebességére nézve kimutathatóan gátolta, de nem erősebben, mint

egy magában a Na-laktát (1. és 6. talajok). A gátló hatás tehát a közeg laktáttartalmától függ.

Az *Asp. parasiticus* tenyészeiben, a Na-laktát, a vízterre számított 1,0 és 2,0 töm/térf.%-ban nem gátolta sem a spórák germinációját (numerikus gátlás), sem a telepek növekedését (miceliális gátlás) - 1., 2., 3. talajok. Ebből az következik, hogy leeresztés után aerob körülmények közé kerülő takarmány az aflatoxinogének felszaporodásának éppen úgy ki van téve, mint hasonló vízáktívitású, nem erjesztett tétel.

Szénhidrátmentes közegben is jelentős az *Asp. parasiticus* spórák germinációja, viszont tetemes a miceliális növekedés gátlása (1. és 4. talaj). Amikor a tejsavas erjedés a szénhidrátokat már felhasználta, a közegben laktát van jelen. Az 1. és 5. talajösszetételek összehasonlításából (TKE és telepátmérő %) kiderül, hogy az *Asp. parasiticus* a laktátot is képes hasznosítani.

Elölt szubmerz *Lactobacillus* tenyészet közege az *Asp. parasiticus*ra nézve nem gyakorol gátlást (1. és 6. talajok). Minthogy a laktátnak sincs gátló hatása, ebből következtethetően, az előlt *Lactobacillusok* közege a laktáton kívül más természetű inhibitorokat nem képez az *Asp. parasiticus*ra nézve.

Míg 2% laktát a szénaflórát kis mértékben gátolja, addig a 1,5%-os (a laktáttal ekvimoláris) koncentrációjú acetát azt teljesen gátolja. Az acetátot a szénaflóra egyetlen tagja sem hasznosítja.

1,5% acetát az *Asp. parasiticus* növekedésére teljes gátlást gyakorol. Ugyanez mutatkozik a laktát és az acetát ekvimoláris kombinációjában is. Az *Asp. parasiticus* valószínűleg nem hasznosít acetátot.

Csökkenő pH (6,5; 5,5; 4,5) a szénaflóra növekedését összességében valamennyire lassítja, és a flóra fajösszetételét szelektálja.

A pH csökkenése az *Asp. parasiticus* növekedését nem gátolja jelentősen. pH 4,5 közegében mutatkozik numerikus és növekedési gátlás, azonban a konídiumképződés gyorsabban indul meg.

A kukorica terméktipikus penészflórájára (zömmel *Aspergillusok*), a 2 % laktát semmilyen gátlást nem gyakorol. A flóra a laktátot csaknem egyenértékűen hasznosítja. Az ekvimoláris acetát viszont totálisan gátol.

#### 4.5. A szénák mikológiai vizsgálatára alkalmas táptalajreceptúra kialakításának eredményei

A Rose Bengal adalék a talaj alapszínét intenzív rózsaszínre festi. Ez a színek – különösen a rózsaszínű telepárnyalat – észlelését szinte lehetetlenné teszi, ugyanakkor a Rose Bengal inhibitor hatása egymagában jelentéktelen, csak az élesztőkre nézve intenzív. A korai telepkezdemények gyorsabb észlelése rózsaszín festékkötésük alapján nem jelentős előny.

A csökkentett tápanyag-koncentrációjú (1/4 N) talajon a *Mucor* fejlődése is lelassul, a teljes koncentrációjával gyakorlatilag azonos össz-TKE olvasható le, viszont a különböző fajok konídiumai általánosan lassabban fejlődnek ki és színük sokkal kevésbé kifejezett.

Kis mértékű gátló hatás esetén a *Mucor* elveszti intenzíven szétkúszó légmicélium képző képességét, azonban felületi terjeszkedése megmarad. Ekkor még nagy területeket képes elfoglalni, és ezzel a kimutatható TKE-számot rontja. Erősebb gátló hatás esetén szorul annyira vissza, hogy terjeszkedése a flóra többi tagjával körülbelül azonos.

A takarmányok penészszámaának meghatározására előírt MSz ISO 7954 szabványtalaj szálastakarmányok vizsgálatára nem alkalmas, mert az esetek mintegy felében, a *Mucor* túlnövése, mind a TKE leolvasását, mind a toxinogén telepek felismerését meggyúsítja. Inhibitorok alkalmazása vagy a talaj tápanyagszintjeinek csökkentése esetén, a mintákból kimutatható TKE, az összehasonlítás alapjául vett MSz ISO 7954 szabványtalajon kapott TKE-értékkel gyakorlatilag megegyezik, a feldolgozásnál szokásos hibahatárok mellett.

Az inhibitorokat tartalmazó DRBC összetétel (King és mtsai, 1979) korai TKE leolvasást tesz lehetővé (egyenletesebb telepméret), egyidejűleg a *Mucort* visszaszorítja. Ugyanakkor a talaj alapszíne, a konídium-képződmények – különösen a toxinogén *Fusariumok* - színének megítélését megnehezíti. Az Rose Bengal hífafestő hatása nem nagy előny.

Vizsgálataink jelenlegi fázisában, az MSz ISO 7954 - dichlorán kombinációt találtuk a legmegfelelőbbnek, amelyen a TKE korán leolvasható, a *Mucort* a DRBC-ével egyenértékűen visszaszorítja és színtelen, ezért a telepszínek jól megfigyelhetők.

A 2-4-dinitroszalícilsav (DSA), mint inhibitor, intenzív alapszíne és csekély hatékonysága miatt nem vált be.

#### 4.6. Szelektív propagulum-festési technika kidolgozásának eredménye

Szénák és abrakfélék alapszuszpenzióiban malachitzöld, amidoblack (AB) és Sudan III festéssel a propagulumképletekre nézve érdemleges szelektivitást nem lehetett észlelni. Ugyanakkor a Rose Bengalt (RB) a konídiumok (spórák) megkötik, és sötétvörös képletek alapján ismerhetők fel, míg más mikroképletekből a festék kioldódik. Az egyébként pigmentált (fekete) telepeket képző fajok RB-vel nem festődnek, de éppen a pigmentáltságuk révén ismerhetők fel. Az RB, a festés során kismértékben kötődik a keményítő-szemcsékhez. Gabonaőrlemények szuszpenziójában, a főzés miatt destrukturált keményítőszemcsék rózsaszín töredék-tömeg alakjában láthatók. Az RB a baktériumokat is festi, amelyek, az ajánlott 250x-es nagyítással, halvány porszemcsékként láthatók. Növényi rostok, szőrök, törmelékek és gyakran nematódák, az RB-t nem kötik, így a penész eredetű képletektől biztosan megkülönböztethetők.

A mintaszuszpenziókban az AB gyengén kötődött a propagulumokhoz, és kékeszöld színe jóval kevésbé feltűnő, mint az RB festés esetében. A spóraburok apoláros elemeire gondolva vizsgáltuk a Sudan lipidfestést. Szelektivitása nem megfelelő, a hifákban a szeptáltságot nem mutatja, ugyanakkor a keményítőszemcsékhez is kötődik.

Eljárásunk alkalmas száraz preparátum készítésére is. A lemezen beszárított agarrétegben a részecskék a széleken sem csapódnak össze, ugyanakkor a vizes készítményhez képest a száraz agar nagy törésmutatója miatt a fázistárgyak határvonalai gyengébbek. Ezen segít a festés, amelyben a színárnyalat lényegében a fázistárgyat amplitúdó-tárggyá alakítja át. A szárazkészítmény előnye az archiválhatóság, ami lehetővé teszi a vizsgálat objektív dokumentálását. Ennek alapján ugyanis – a szuszpenzió hígításának és a felvitt folyadékmennyiség ismeretében – a penészfertőzöttség mértékére jellemző spóraszám/gramm kiszámítható, ami egyrészt a TKE-vel szoros kapcsolatban van, másrészt a tétel előéletére nézve is jelzőértékű.

#### 4.7. Kísérletek az invertáz-teszt alkalmazhatóságára néhány szénákra jellemző genus esetében

A vizsgált terméktipikus penészfajok közül észlelhető **invertáz termelése a *Nigrospora*, *Alternaria* és *Cladosporium* fajoknak van.** 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.

Tekintettel arra, hogy a tapasztalatok alapján a "fekete penészek" a terméktipikus állomány mintegy felét teszik ki, és ebben is a *Cladosporium* dominál, az invertáz teszt nem tekinthető használhatónak szénák penészfertőzöttségének gyors megállapítására.

#### **4.8. DNS RT-PCR-rel az ALLFunTaq penész-specifikus primer segítségével kapott kópiaszám és a tenyésztés (szabvány) módszerrel meghatározott TKE összefüggésének vizsgálata**

A szénaminták mikológiai állapotát, az organoleptikus minőség és az autentikusnak tekintett TKE-hez képest az AllFunTaq primerrel mért gomba 18S rDNS kópiaszám még tendenciaszerűen sem jelzi. Összefüggést a molekuláris biológiai és hagyományos tenyésztéses technikával kimutatott penészsám között nem találtunk (a korreláció értéke nagyon alacsony:  $R=0,17$ ).

Magas PCR kópiaszámok viszonylag alacsony TKE értékek mellett, magyarázhatók lehetnek azzal, hogy a mintában régebbi penész-gradáció elhalt maradványait mutattuk ki. Azonban, ezek a minták organoleptikus, vizuális bírálatnál egészségesnek látszottak. (Ezen minták terméktipikus penészflórájukban zömében *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* fajokat tartalmaztak, amelyekre nézve az AllFun Taq specificitását Mayer (2002) modellkísérletben igazolta).

Egyes nyilvánvalóan penészes, magas TKE-jű mintákból nem sikerült kópiákat kimutatni. Szénamintában természetes körülmények között keletkezett gombatömeg kvantifikálását RT-PCR-rel nagymértékben bizonytalanná teszi az a tény, hogy a DNS kivonásának módja a kitinbe zárt micéliumsejtből, valamint a cellulóz-lignin strukturákból, alapvetően befolyásolja az ugyanazon mintából elérhető kópiaszámot.

A 48P számú (kvarchomokkal dezintegrált penészes lucernaszéna, porfrakció) és a 48R számú (ugyanennek rostfrakciója) minta RT-PCR vizsgálatában kapott log<sub>10</sub>-kópiaszámok (48P számú minta: 11,721; 48R számú minta: 11,491) hasonlósága arra utalhat, hogy a rostokra ránőtt micéliumtömeg ugyanolyan nagyságrendben tartalmaz penészgomba DNS-t, mint a vélhetően túlnyomóan konídiumokat tartalmazó porfrakció.

Szénák penészfertőzöttségének megállapítására az AllFunTaq RT-PCR módszer alkalmazása, vagy ennek ellenkezője akkor állapítható meg, ha valamilyen, - eddig még nem ismert úton, - a száraz vegetatív anyaggal deszikkált struktúrából, a DNS teljes kvantitatív kinyerése megoldhatóvá válik. A problémán nem segítene a DNS összmenyiségének meghatározása a feltárt mintában, mert a növényi sejtképletekből valószínűleg a teljes DNS tartalom nagyobb %-a nyerhető ki, mint a gomba-eredetű mikroképletekből.

Egyéb megfigyelés: A TKE adatok összehasonlításakor – 1. mintasorozat szecskezett szénák és a 2. mintasorozat örleménye – az örleményekből két nagyságrenddel kisebb penészsámot tudunk kimutatni. Ezt az elhalást az örlés folyamán keletkező hő, tehát az örlemény felmelegedése okozhatta.

#### **5. Az értekezés új, illetve újszerű eredményei**

- ◆ Hazai szénaminták feldolgozása alapján meghatároztuk a penészfertőzöttség terméktipikus értékét: ez  $1 \times 10^6$ , ami a minőségi osztályokba soroláshoz, és a penész TKE-határértékek meghatározásához szükséges.
- ◆ A szénák penészflórájában, a toxinogének előfordulása független a penészfertőzöttség mértékétől.
- ◆ Penészek felszaporodása szénákon elsősorban a betároláskori víztartalomtól, jóval kevésbé a tárolási tér eRH értékétől és még kevésbé a hőmérséklettől függ.
- ◆ Az erjedési termékek közül a laktát alig, míg az acetát jelentősen gátolja mind a terméktipikus szénaflóra, mind a toxinogén *Aspergillus parasiticus* felszaporodását.
- ◆ A takarmányok penésszámának meghatározására előírt MSZ ISO 7954 szabványtalaj szálastakarmányok vizsgálatára nem alkalmas, mert az esetek mintegy felében a *Mucor* túlnövése, mind a TKE leolvasását, mind a toxinogén telepek felismerését meggyújtja. Szénák mikológiai vizsgálatára a *Mucorales* elnyomása, a kielégítő telepnövekedés és a színes képletek elbírálhatósága szempontjából, az MSZ ISO 7954 szabványösszetétel Dichloran inhibitor kiegészítéssel ajánlható.

- ◆ Szénák penészfertőzöttségének tájékoztató mikroszkópos értékelésére agarmátrixos Rose Bengal differenciál-festési eljárást dolgoztunk ki.
- ◆ A  $\beta$ -D-fruktofurazonidáz (invertáz) enzimprodukción-teszt - szénaminták esetében - csak három terméktipikus genus esetében ad jelentős reakciót eltérően a gabonák toxinogén raktári genusaitól.
- ◆ RT-PCR-rel az AllFun-Taq penész-specifikus primer segítségével kapott kópiaszám és a tenyésztés (szabvány) módszerrel meghatározott TKE között az elővizsgálatban nem találtunk összefüggést, ezért az eljárás szénák vizsgálatára, ez idő szerint nem ajánlható.

### **Tudományos közlemények jegyzéke**

#### TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

SIPICZKI, B.; MÁTRAI, T.; KÓKAI, Zs. (2003): Szénák penészfertőzöttsége és a penészedést befolyásoló tényezők kísérletes vizsgálata. Állattenyésztés és Takarmányozás 2003. 52. 1. 69-76 (Studies of mould contamination of hays and experiments assessing influencing factors of spoilage processes)

SIPICZKI Bojana (2003): Kísérletek szalastakarmányok penészfertőzöttségének minősítő vizsgálatára alkalmas táptalajösszetétel kialakítására Acta Agraria Debreceniensis, Agrártudományi Közlemények 10, 34-38. (Studies on the Suitability of Different Mould Media Compositions for the Mycological Evaluation of Hay Samples)

SIPICZKI, B.; KÓKAI, Zs.; MÁTRAI, T (2004): Erjedési savak gátló hatása a kukorica és a széna terméktipikus penészflórájának valamint az *Aspergillus parasiticus* növekedésére Állattenyésztés és Takarmányozás 2004. 54. 6.

SIPICZKI, B.; KÓKAI, Zs.; MÁTRAI, T: A takarmányok penészfertőzöttségének gyors kimutatására használható invertáz-teszt és alkalmazhatósága szénákon. Állattenyésztés és takarmányozás (közlésre elfogadva, 2006. január 16.)

#### ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK NEMZETKÖZI RENDEZVÉNYEKEN

SIPICZKI, B.; MAYER, Zs.; MÁTRAI, T. (2001): Assesment of Microbiological Stability of Feeds and Forages in Constant Water Activity (A(w)) Moisture Chambers. Timisoara's Academical Days, Temesvár, 2001. május

MÁTRAI, T.; MAYER, Zs.; SIPIKZKI, B. (2001): Constant Water Activity Chambers for laboratory Using Saturated Solutions os Inorganic Crystals. Anual Conference of European Feed Microbiologists, Ljubljana, 2001. június

SIPICZKI, B.; MAYER, Zs.; MÁTRAI, T. (2001): Constant Water Activity (A(w)) Moisture Chambers as Tools in Measuring Aerobic Storability of Feed, 52<sup>nd</sup> Ann. Meeting of European Association for Animal Production (EAAP), Budapest, N6.11.

SIPICZKI, B.; MÁTRAI, T.; KÓKAI, Zs. (2002): Szénák penészfertőzöttségének felmérése és a penészedés körülményeinek laboratóriumi modellezése. Innováció, a tudomány és a gyakorlat egysége az ezredforduló agráriumban. Nemzetközi konferencia, Debrecen-Gödöllő, 2002. április 11-12.

## ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK HAZAI RENDEZVÉNYEKEN

SIPICZKI, B.; MAYER, Zs.; MÁTRAI, T. (2001): Penészgombák előfordulása szénákon és felszaporodásuk különböző vízakaktivitásokon pára kamrákban. Az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság Jubileumi Nagygyűlése. Balatonfüred, 2001.

SIPICZKI Bojana (2002): A széna-mikológia aktuális feladatai. Takarmányozástani Tanszékek és Osztályok Országos Találkozója. Kaposvár, 2002. június 20-21.

SIPICZKI Bojana (2002): Kísérletek szalastakarmányok penészfertőzöttségének minősítő vizsgálatára alkalmas táptalajösszetétel kialakítására, Debreceni Tudományos Napok 2002, „Tudósjelöltek a mezőgazdaságban”, Debrecen

SIPICZKI, B.; MÁTRAI, T.; KÓKAI, Zs. (2003): Laktát és acetát hatása szénák terméktipikus penészflórájának és az aflatoxinogén *Asp. parasiticus* szaporodására. Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak, Mikrobiológia és Biotechnológia Szekció, 2003. november 6-7, Budapest

SIPICZKI, B.; MÁTRAI, T.; KÓKAI, Zs. (2003): A laktát és acetát ionok hatása a takarmányok terméktipikus penészeinek felszaporodására, Tudományos Napok, Debrecen, 2003. november 15-20.

## EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

SIPICZKI, B.; MAYER, Zs.; MÁTRAI, T. (2001): Constant Water Activity (A(w)) Moisture Chambers as Tools in Measuring Aerobic Storability of Feed, Book of Abstract of the 52<sup>nd</sup> Conference of European Association for Animal Production (EAAP), Budapest, N6.11. p.130.

SIPICZKI, B.; MAYER, Zs.; MÁTRAI, T. (2001): Penészgombák előfordulása szénákon és felszaporodásuk különböző vízakaktivitásokon pára kamrákban. Az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság Jubileumi Nagygyűlése. Balatonfüred, p. 145.

SIPICZKI, B.; MÁTRAI, T.; KÓKAI, Zs. (2003): Laktát és acetát hatása szénák terméktipikus penészflórájának és az aflatoxinogén *Asp. parasiticus* szaporodására. Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak, Mikrobiológia és Biotechnológia Szekció, p. 158.

## Irodalomjegyzék

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. p.

MAYER ZS. (2002): A penészgomba kimutatás korszerű lehetőségei élelmiszerekből és takarmányokból. Ph. D. értekezés. Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar

PÁLFY K.K. - KUPAI J. (1986): Egészséges takarmányt az üzembe! Mezőgazd. Kiadó. Budapest

VAS K. - CSONTOS É.(1956): A hidratúra méréséről és jelentőségéről. Agrokémia és Talajtan. 5. 4. 411-425. p.