

TEÁRÓL IZOLÁLT FEKETE ASPERGILLUS
TÖRZSEK FAJSZINTŰ JELLEMZÉSE

¹ SZTE Eötvös Loránd Kollégium

² SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék

³ BCE Élelmiszertudományi Kar, Mezőgazdasági és
Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye

Bevezetés

A fekete *Aspergillus* nemzetséget 1729-ben Pier Antonio Micheli, egy firenzei lelkész és mikológus jegyezte fel először. A nemzetség nevét a jellegzetes konídiumtartó képletéről kapta, mivel formája a liturgiában használatos szenteltvíz hintőre (latinul aspergillum) emlékeztet a leginkább [1].

Az *Aspergillus* nemzetség *Nigri* szekciójába jelenleg 26 fajt sorolnak [2], amelyeket szinte kizárólag csak molekuláris módszerekkel lehet elkülöníteni, és amelyeket gyakran a kétarcúság jellemez. Ennek alátámasztására az egyik legjobb példa az *Aspergillus niger*, amely citromsavtermelése révén az élelmiszeriparban ma már nélkülözhetetlenné vált, ugyanakkor az is elmondható róla, hogy fontos mikotoxin termelő és humán patogén.

A fekete *Aspergillusok* vagy kannapeneszkek között számos fajról elmondható, hogy olyan gombatoxinokat termelnek, mint az ochratoxinok vagy a fumonizinek [3], melyek közvetlen vagy közvetett úton a szervezetbe kerülve az egészséget súlyosan károsíthatják.

Az ochratoxinok közül a legtoxikusabb hatással az ochratoxin A (OTA) bír, melyet a legnagyobb mennyiségben az *Aspergillus ochraceus* állít elő. A fekete *Aspergillus* fajok közül az *A. carbonarius*, *A. sclerotioniger*, *A. niger* és az *A. welwitschiae* is képes még jelentős mennyiségben OTA-t termelni [2,4]. A kannapeneszkek mellett a *Penicillium verrucosum*, és *P. nordicum* faj OTA-termelése sem elhanyagolható. A nefrotoxikus és karcinogén tulajdonsággal rendelkező OTA-t [5] már kimutatták talajból, zöldség- és gyümölcsfélékből, gabonafélékből, kávé- és kakaóbabból, olajos magvakból, sörből, fűszerekből, chiliből, fűszerpaprikából, szójababból, földimogyoróból, rizsből, kukoricából, vérből és anyatejből is.

Az OTA az emberi és állati szervezetekben a vesébe kerülve válik aktívvá. A proximális tubulusokon megkötődve, a vesében egy állandóan magas OTA-szintet tart fenn, ami nefropátia kialakulásához vezethet. Az OTA vélhetően szerepet játszik a balkáni endémikus nefropátiában is [6].

A fumizinek, melyek közül a legjelentősebb a fumonizin B₁ és B₂, elsősorban a *Fusarium* fajokhoz köthetőek (*F. verticilloides*) [7], azonban az *A. niger* genomjában is megtalálható az a gén kluszer, amely a toxin előállításáért felel [8,9]. Továbbá az elmúlt években az *A. welwitschiae*-ről is bebizonyosodott, hogy az OTA mellett a másodlagos anyagcseretermékei között a fumizinek is megtalálhatóak.

Jóllehet a fumizinek által okozott toxikózis következtében minden emlősben májkárosodás is egyaránt megfigyelhető, az egyes állati és emberi szervezetekben a toxin eltérő tüneteket produkál. Lovakban agylágyulás, sertésekben tüdőödéma, kísérleti egerekben és patkányokban hepatokarcinóma, embereknél nyelőcsőrák volt megfigyelhető, megjelenésükért bizonyíthatóan ugyanaz a toxin tehető felelőssé [6].

Ahogy a legtöbb élelmiszer és fogyasztási cikk, úgy a tea is kontaminálódhat különböző toxintermelő penészgombákkal. Mivel bizonyos teafajták erjesztését is fekete *Aspergillus* fajokkal végzik, és a gombamérgek egy bizonyos fokig hőstabilak, így különösen fontos annak kiderítése, hogy a konzorciumban előfordulhatnak-e olyan gombák, amelyek az egészségre káros metabolitok termelésére is képesek lehetnek. Korábbi vizsgálatok már fényt derítettek arra, hogy a Puerh't és a fekete teákon szinte kizárólag az *A. luchuensis* fordul elő, amelynek anyagcseretermékei közt sem az OTA, sem a fumonizin B₂ nem található meg [10]. Ezzel szemben, például a herbateákról az *A. niger* és az *A. welwitschiae* (= *A. awamori*) fajok is azonosításra kerültek [11].

Ezen ismeretek fényében célul tűztük ki a hazai boltokban beszerezhető különböző teafüvek vizsgálatát, hogy választ kaphassunk arra a kérdésre, hogy a különböző teák fogyasztása milyen rizikót rejthet magában.

Anyagok és módszerek

A vizsgálat során összesen 39 különböző teáról vettünk mintát, és ezekről összesen 43 fekete *Aspergillus* törzset azonosítottunk. A kapott izolátumokat DRBC lemezekben tenyésztettük 4 napig, majd ismét Rose Bengale lemezekre oltottuk. Ezt követően YPD ferde agarra oltottuk át, 4–5 napig 25°C-on inkubáltuk, majd 4°C-on tároltuk.

A micélium felszaporítását a DNS kivonáshoz mikrocentrifuga csövekben végeztük. A tiszta tenyészetekből 1 ml YPD tápoldatba egy kacsnyi mintát oltottunk, amit 3 napig 25°C-on inkubáltunk. 10 percre 13000 rpm-es fordulatszámra

centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, és 1 ml steril bidesztillált vízzel 15 percig 3000 rpm-es fordulatszámom ismét centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után 300 µl 3%-os N-Lauryl-sarcosin és kevés steril homok hozzáadása után mikropisztilus segítségével szétroncsoltuk a sejteket. Ezután 20 percre 70°C-os vízfürdőbe tettük, majd 10 percig 4°C-on tartottuk. 150 µl protein immunoprecipitációs reagens (5 M Na-acetát) hozzáadása után vortexeltük és 13000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk. A felülúszóból 350 µl-t átpipettáztunk egy steril mikrocentrifuga csőbe. Ehhez 450 µl izopropanolt adtunk és 10 percig 13000 rpm-en, majd a felülúszó leöntése után két lépésben 450 µl 70%-os etanollal 5 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk. Az etanolt leöntöttük és a DNS-t beszárítottuk, majd 30 µl bidesztillált vízben vettük fel és -20 °C-on tároltuk. A tömény genomi DNS-t horizontális gélelektroforézis készülék segítségével 1%-os agaróz gélen futtattuk meg. A kalmodulin gén egy szakaszának amplifikációjához a *cmd5* és *cmd6* indító primereket alkalmaztuk [13]. A filogenetikai analízist a szomszédösszevonó (neighbor-joining) módszerrel végeztük, illetve a szekvenciákat összevetettük a Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázissal és a saját adatainkkal.

Eredmények és értékelés

Munkánk során olyan, a hazai boltokban is beszerezhető teamintákról származó fekete *Aspergillus* izolátumok fajszerűtű azonosítását végeztük el, amelyek a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar, Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származnak.

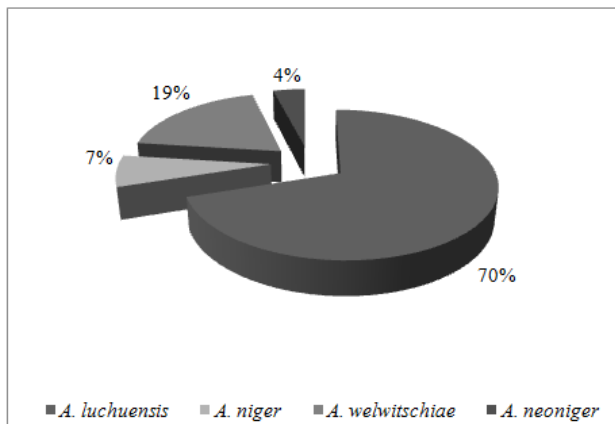
Összesen 12 zöld-, 16 gyümölcs-, 6 fekete-, és 4 herbateából, valamint 1 teakeverékből vettünk mintát; ezekből összesen 43 fekete *Aspergillus* törzset azonosítottunk (1. táblázat). A gombák fajszerűtű azonosításhoz a kalmodulin gén egy szakaszát amplifikáltuk és szekvenáltuk meg.

1. táblázat: A kalmodulin szekvenciák alapján azonosított izolátumok.

Sorszám	Laboratóriumi szám	Fajnév
1.	TZJ 7-3	<i>A. welwitschiae</i>
2.	TGYJ 26-4	<i>A. welwitschiae</i>
3.	TZJ 8-1 B	<i>A. luchuensis</i>
4.	TZJ 10-1	<i>A. neoniger</i>
5.	TZJ 11-1	<i>A. luchuensis</i>
6.	THJ 22-2	<i>A. welwitschiae</i>
7.	TGYJ 18-1 A	<i>A. niger</i>
8.	TFJ 1-1	<i>A. luchuensis</i>
9.	TZJ 5-1 A	<i>A. luchuensis</i>
10.	TFÜJ/TFJ 2-5	<i>A. luchuensis</i>
11.	TZJ 9-2	<i>A. luchuensis</i>
12.	TZJ 1-1	<i>A. luchuensis</i>
13.	TZJ 5-1 B	<i>A. welwitschiae</i>
14.	THJ 8-2	<i>A. luchuensis</i>
15.	TGYJ 7-1	<i>A. luchuensis</i>
16.	TGYJ 27-2	<i>A. luchuensis</i>
17.	TFJ 1-4	<i>A. luchuensis</i>
18.	TGYJ 21-1	<i>A. luchuensis</i>
19.	TGYJ 30-2	<i>A. luchuensis</i>
20.	TMIX 1	<i>A. luchuensis</i>
21.	TGYJ 6-1	<i>A. luchuensis</i>
22.	TZJ 12-2	<i>A. luchuensis</i>
23.	TZJ 2-3	<i>A. luchuensis</i>
24.	TZJ 1-2	<i>A. luchuensis</i>
25.	TZJ 8-1 C	<i>A. welwitschiae</i>
26.	TGYJ 4-2	<i>A. luchuensis</i>

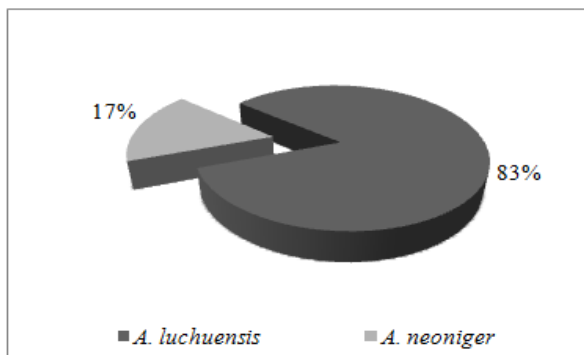
Sorszám	Laboratóriumi szám	Fajnév
27.	TGYJ 14-3	<i>A. niger</i>
28.	TGYJ 18-1 B	<i>A. luchuensis</i>
29.	TGYJ 29-4	<i>A. luchuensis</i>
30.	TFÜJ/TFJ 8-2	<i>A. luchuensis</i>
31.	THJ 2-2	<i>A. luchuensis</i>
32.	THJ 18-2	<i>A. luchuensis</i>
33.	TZJ 3-1	<i>A. luchuensis</i>
34.	TGYJ 8-1	<i>A. luchuensis</i>
35.	TFJ 8-1	<i>A. neoniger</i>
36.	TGYJ 31-3	<i>A. luchuensis</i>
37.	TZJ 8-1 A	<i>A. welwitschiae</i>
38.	TFJ 1-2	<i>A. luchuensis</i>
39.	TGYJ 12-7	<i>A. niger</i>
40.	TGYJ 25-1	<i>A. welwitschiae</i>
41.	TGYJ 22-1	<i>A. luchuensis</i>
42.	TGYJ 31-1	<i>A. welwitschiae</i>
43.	TZJ 4-1	<i>A. luchuensis</i>

Az eredmények alapján elmondható, hogy az izolátumok 70%-a az *A. luchuensis*, 19%-a az *A. welwitschiae* (= *A. awamori*), 7%-a az *A. niger* és 4% -a az *A. neoniger* fajba tartozott, amelynek ez az első előfordulása hazánkban (1. ábra). Az izolált fekete *Aspergillus* fajok közül az *A. niger* és az *A. welwitschiae* (= *A. awamori*) fajokról írták le, hogy ochratoxinokat, valamint fumonizineket is termelnek [12].



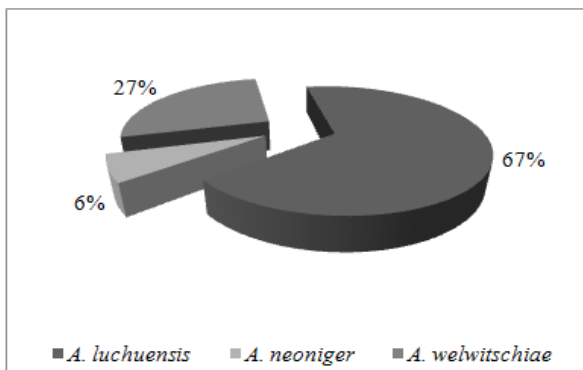
1. ábra: A különböző teákon található fekete *Aspergillus* fajok százalékos megoszlása.

Míg az *A. welwitschiae* (= *A. awamori*) a herba-, gyümölcs- és zöldteákból is egyaránt kimutatható volt, addig az *A. neoniger* a fekete- és a zöldteákban fordult elő, illetve az *A. niger* csak a gyümölcssteákból volt izolálható. Az egyes teákról azonosítható fekete *Aspergillus* fajok eloszlása is különbözött egymástól. A fekete teákon az izolátumok 83%-át az *A. luchuensis*, míg a fennmaradó 17%-ot az *A. niger* tette ki (2. ábra)



2. ábra: A fekete teákon található fekete *Aspergillus* fajok százalékos megoszlása.

A zöldteák esetén az azonosított fajok 67%-a *A. luchuensis*, 27%-a *A. welwitschiae* és 6%-a *A. neoniger* volt (3. ábra). A gyümölcssteákon előforduló fekete *Aspergillus*ok százalékos eloszlása a következőképpen alakult: *A. luchuensis*: 65%, *A. welwitschiae*: 18% és *A. niger*: 17% (4. ábra). A herbateákon az *A. luchuensis* 75%-ban és az *A. welwitschiae* 25%-ban volt jelen (5. ábra).



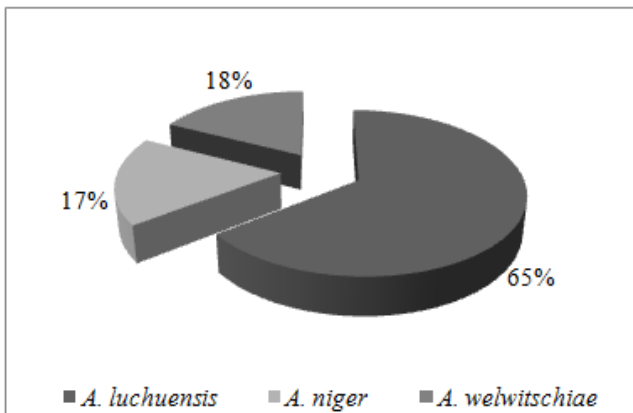
3. ábra: A zöld teákon található fekete *Aspergillus* fajok százalékos megoszlása.

Az *A. luchuensis* az összes teafajtán domináns mikroorganizmusnak tekinthető attól függetlenül, hogy az előállítás során történik-e fermentáció vagy sem. A fekete teákról származó izolátumok 83%-át, zöldteák esetében 67%-át, míg a gyümölcssteákról származó minták 65%-át és a herbateákról izolált összes *Aspergillus* faj 75%-át teszi ki (6. ábra). A kísérletben szereplő egy darab teakeverékről csak ez a faj volt azonosítható.

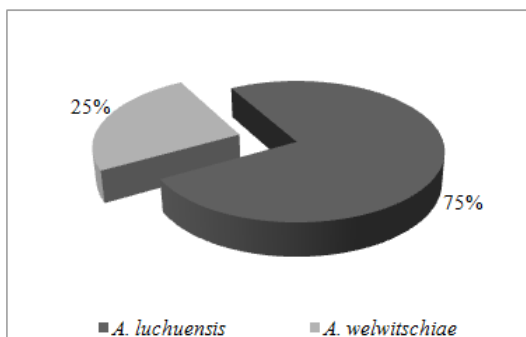
Munkánk során amellett, hogy sikerült fényt deríteni arra, hogy az egyes teaféleségeken milyen fekete *Aspergillus* fajok fordulnak elő, azt is megtudhattuk, hogy a különféle teákon található toxintermelő törzsek milyen százalékban vannak jelen, a nem termelőkhöz képest (7. ábra).

Összegzés

Összefoglalásként elmondható, hogy a fekete teákról nem tudunk mikotoxin termelő fajokat kimutatni, ugyanakkor a zöld-, a gyümölcs-, és a herbateán is egyaránt megtalálhatóak voltak olyan toxintermelő *Aspergillus* fajok, amelyekről elmondható, hogy képesek mind a fumonizinek, mind az ochratoxin A előállítására.

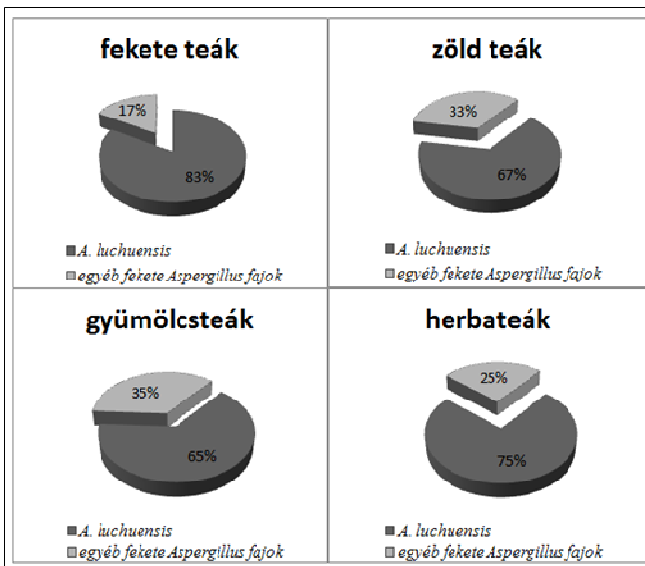


4. ábra: A gyümölcssteákon található fekete *Aspergillus* fajok százalékos megoszlása.

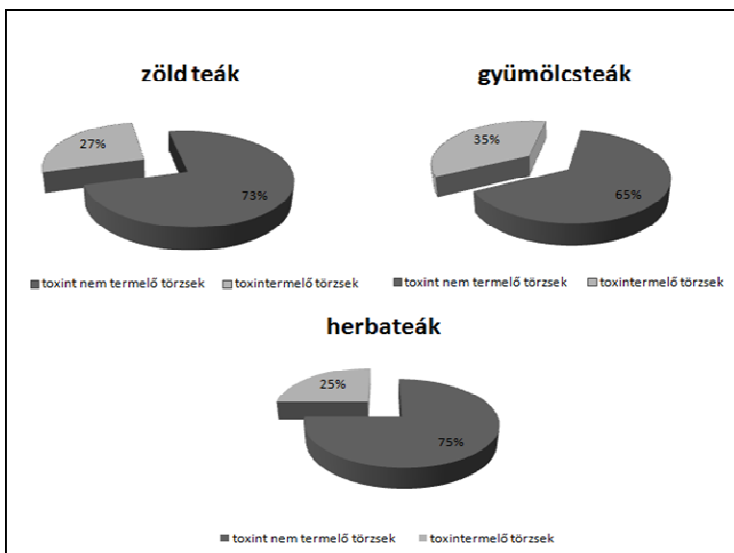


5. ábra: A herbateákon található fekete *Aspergillus* fajok százalékos megoszlása.

Azonban további vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy a szennyezett teák milyen mértékben jelenthetnek veszélyt azok számára, akik rendszeresen fogyasztják ezeket. Emellett azt sem téveszthetjük szem elől, hogy jelen vizsgálatunkban csak a fekete *Aspergillusok* kerültek előtérbe, azaz nem vizsgáltuk sem más *Aspergillus* fajok, sem más penészgombák jelenlétét, amelyek lehetséges toxintermelő képességgel bírhatnak. Ezek felderítésével, valamint a gombák toxintermelő képességének, illetve a teában ténylegesen megjelenő mikotoxin mennyiségének pontos meghatározásával kaphatunk csak teljes képet arról, hogy az egyes teák fogyasztása mennyiben lehet káros a szervezetünkre.



6. ábra: Az *A. luchuensis* megjelenése a különféle teákon.



7. ábra: A toxintermelő képességgel rendelkező, illetve nem rendelkező *Aspergillus* fajok százalékos megoszlása.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Csernus O.: Romlást okozó, potenciálisan toxinképző penészgomba fajok növekedésének modellezése a hőmérséklet és a vízaktivitás függvényében (doktori értekezés), 2014
- [2] Varga J., Frisvad J. C., Kocsubé S., Brankovics B., Tóth B., Szigeti G. *et al.*; *Studies in Mycology* **69**, 1–17., 2011
- [3] Nielsen K. F., Mogensen J. M., Johansen M., Larsen T. O., Frisvad J. C.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395**, 1225–1242., 2009
- [4] Frisvad J. C., Larsen T. O., Thrane U., Meijer M., Varga J., Samson R. A., *et al.*; *PLoS ONE* **6**, e23496, 2011
- [5] Bennett J. W., Klich M.; *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 497–516., 2003
- [6] Varga J., Téren J., Rigó K., Tóth B., Kocsubé S.: *Gombák másodlagos anyagseretermékei: mikotoxinok, gombamérgek*; JATE Press, Szeged, 30–34., 2009
- [7] Scott P. M.; *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–7., 2011
- [8] Frisvad J. C., Smedsgaard J., Samson R. A., Larsen T. O., Thrane U.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 9727–9732., 2007
- [9] Pel H. J., de Winde J. H., Archer D. B., Dyer P. S., Hofmann G., Schaap P. J., *et al.*; *Nature Biotechnology* **25**, 221–231., 2007
- [10] Mogensen J. M., Varga J., Thrane U., Frisvad J.C.; *International Journal of Food Microbiology* **132**, 141–144., 2009
- [11] Storari M., Dennert F. G., Bigler L., Gessler C., Brogгинi G. A. L.; *Food Control* **26**, 157–161., 2012
- [12] Hong S. B., Lee M., Kim D. H., Varga J., Frisvad J. C., Perrone G., Gomi K., Yamada O., Machida M., Houbraken J., Samson R. A.; *PLoS ONE* **8**, DOI: 10.1371/journal.pone.0063769., 2013
- [13] Hong S. B., Cho H. S., Shin H. D., Frisvad J. C., Samson R. A.; *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **56**, 477–486., 2006