
Kísérletek szálastakarmányok penészfertőzöttségének minősítő vizsgálatára alkalmas táptalajösszetétel kialakítására

Sipiczki Bojána

Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,
Mezőgazdaságtudományi Kar,
Állattenyésztés- és Takarmányozástani Tanszék, Debrecen

ÖSSZEFOGLALÁS

Takarmányok penészfertőzöttségének vizsgálata során a minták mintegy felében a *Mucor* (kisebb mértékben a *Trichoderma*) fajok expanzív fejlődésének indulnak és ezzel a lassabban fejlődő fajokat elnyomják és a vattaszerűen szétkúszó légmécium a telepkezdeményeket letakarja. Ez a toxinogének – így a lassan fejlődő és nagy jelentőségű *Fusariumok* – észlelhetőségét húsítja meg, de a tényleges összpenészsám sem állapítható meg. Kísérleteinkben az abraktakarmányok penészflórájának vizsgálatára szabványosított MSZ-ISO 7954 talaj tulajdonságaihoz viszonyítva vizsgáltuk a) a Rose Bengal inhibitor hatását (ISO 7954-RB), b) a Rose Bengal és a Dichloran (diklóromononitroanilin) kombinált inhibitor hatását (DRBC), c) a Dichlorán inhibitor hatását (ISO 7954-Dichlorán), d) a tápanyagszint csökkentésének (negyedelésének) hatását (1/4 N ISO 7954, 1/4 N-DRBC és 1/4 N-DC) és e) kísérletet végeztünk redukáló monoszaccharidokat kötő dinitro-szalicilsav (DSA) adalékkal (RBC-DSA). Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy 1) A takarmányok penészsámának meghatározására előírt MSZ ISO 7954 szabványtalaj szálastakarmányok vizsgálatára nem alkalmas, mert az esetek mintegy felében a *Mucor* túlnövése mind a TKE leolvását mind a toxinogén telepek felismerését megnehezíti. 2) Az inhibitorokat tartalmazó DRBC összetétel (King és mtsai, 1979) korai TKE leolvást tesz lehetővé (egyenletesebb telepméret), ugyanakkor a *Mucor* visszaszorítja. Ugyanakkor a talaj alapszíne a konídium-képződmények – különösen a toxinogén *Fusariumok* – színének megítélését megnehezíti. Az Rose Bengal hífefestő hatása nem nagy előny. 3) Vizsgálataink jelenlegi fázisában az ISO 7954-Dichlorán kombinációt találtuk a legmegfelelőbbnek, és ajánlhatónak, amelyen a TKE korán leolvasható, a *Mucor* a DRBC-ével egyenértékűen visszaszorítja és szintelen, ezért a telepszínek jól megfigyelhetők. 4) A 2-4-dinitroszalicilsav (DSA), mint inhibitor intenzív alapszíne és csekély hatékonysága miatt nem vált be.

SUMMARY

At evaluating mould contamination of hay samples in more than the half of the cases *Mucor* spp. (and *Trichoderma* spp. in a smaller extent) overgrew slower developing moulds, spoiling the assessment of total mould CFU and the detection of fastidious organisms, among others the toxinogenic *Fusaria*. In parallel microbiological evaluation of hay samples comparing to the ISO 7954 medium as reference a) the overgrowth inhibiting effect of Rose Bengal (ISO 7954-RB); b) the combined inhibiting effect of Rose Bengal and Dichloran (dichloro-mononitroaniline) in DRBC; c) the inhibition of Dichlorane in ISO 7954 (ISO 7954-DC); d) the lowering of nutrient levels to 1/4 (1/4 N ISO 7954, 1/4 N-DRBC and 1/4 N-DC); e) the inhibiting effect of dinitro – salicylic – acid (DSA), a reducing sugar binding compound, as a potential growth inhibitor (RBC-DSA) were studied. The results

showed, that 1) MSZ-ISO 7954 medium codified by the official method was unsuitable for the determination of mould count and for the detection of toxinogenic spp. in hay samples. In half of the cases the overgrowth of *Mucor* has spoiled CFU enumeration and recognition of toxinogenic moulds; 2) Inhibitor supplemented DRBC medium (King et al., 1979) enabled early CFU enumeration by uniforming colony sizes and by efficient suppression of *Mucor*, but the pink background colour of the medium was disturbing the observation of tints of conidia, which were characteristic to toxinogenic moulds like *Fusaria*. The hypha-staining property of Rose Bengal did not prove very important; 3) According to the recent stage of our studies, the ISO 7954-Dichloran combination can be recommended for the mycological evaluation of hays and dried roughages. CFU can be enumerated early, *Mucor* suppressed in the same extent as with DRBC and colours are easily observable; 4) 2-4-Dinitrosalicylic-acid (DSA) proved unsuitable as inhibitor, for its poor efficiency and for its intense yellow background colour.

1. BEVEZETÉS

Takarmányok penészfertőzöttségének vizsgálata során a) a fertőzöttség mértékét az összpenészsám meghatározásával állapítjuk meg, ezen felül következtetünk b) a további tárolás során gyors romlást okozó fajok jelenlétére, c) a flóra genus- és fajösszetétele alapján az esetleges mikotoxin-fertőzöttség kockázatára.

Tenyésztéssel korábbi penész-invázió kiszáradt, csíráképtelen vagy esetleg hőkezeléssel elölt nyomait nem tudjuk kimutatni.

Abraktakarmányok penészflórájának vizsgálatában a táptalajtól megkövetelhetjük, hogy a) a közel végleges TKE számot minél hamarabb leolvashassuk, b) az abraktakarmányokban előforduló raktári és toxinogén fajok telepei az azonosítás érdekében hamar és a telep valamint a konídiumképzés morfológiai jellegzetességei gyorsan megjelenjenek. A különböző fajok telepeinek egyenlőtlen fejlődéséből adódó nehézség már itt is jelentkezik. Ennek kiküszöbölése érdekében a) vagy minimál ill. szintetikus talajokat (pl. Czapek-Dox, MSZ 6977-1987) használunk, amelyek azonban az összpenész TKE leolvását csak hosszú idő után teszik lehetővé, vagy b) bőséges tápanyagszintek mellett inhibitor (dichlorán, bizonyos fokig a Rose Bengal) alkalmaznak.

A hazai szénák penészfertőzöttségének felmérő vizsgálata során (Sipiczki és mtsai, 2002) jelentkezett az a módszertani probléma, hogy a minták mintegy felében a *Mucor* (kisebb mértékben a *Trichoderma*) fajok expanzív fejlődésének indulnak és ezzel a

lassabban fejlődő fajokat elnyomják és a vattaszerűen szétkúszó légmicélium a telepkezdeményeket letakarja. Ez a toxinogének – így a lassan fejlődő és nagy jelentőségű *Fusariumok* – észlelhetőségét hiusítja meg, de a tényleges összpenészsám sem állapítható meg. Hasonló a helyzet az erjesztett tömegtakarmányoknál gyakori élesztős fertőzöttség esetén is.

A szálastakarmányok bírálata során az *Aspergillus*, *Penicillium* és *Fusarium* genuszokon felül a *Stachibotrys* és a *Phoma* genuszok felismerése a mikotoxin képzésük miatt lényeges, kockázatjelző értékű.

Maga a *Mucor* viszont toxikológiai szempontból nem tartozik a veszélyes penészgombák közé.

1.1. A mikológiai minősítésben használatos talajok

MSz 6977-1987 szabványban előirt talaj (lényegében Czapek-Dox féle szintetikus talaj, szacharóz szénforrással és ammóniumsó nitrogénforrással) 1998-ig volt használatos. Lassúsága és a nemzetközi szabványosítás miatt azonban az MSZ-ISO 7954 horizontális szabványnak megfelelően áttértünk a glukóz – élesztőkivonat – klóramfenikol (továbbiakban: ISO 7954) összetételre, amelyen a gabonaipari penészek lényegesen gyorsabban fejlődtek. Jelenleg ez a takarmányvizsgálatban előirt hivatalos vizsgálati módszer.

Az eltérő fejlődési sebességű fajok növekedésének egyöntetűvé tételére Martin már 1950-ben javaslatot tett az általa inhibitornak ítélt Rose Bengal (RB) használatára. Kifejlesztette a Rose Bengal Agart (35 mg RB és 30 mg sztreptomycin/1000 ml), amelyet baktériumok növekedését biztosan gátló, gombák talajból való kitenyésztesére és izolálására alkalmas talajként ajánlott.

A Rose Bengal (RB), mint adalék csak kis mértékben inhibitor hatású, viszont a telepkezdemények micéliumaihoz szelektíven kötődik, így a telepkezdemények korai észlelhetőségét a lemez hátoldala felől megkönnyíti.

Schmidt (1981) Rose Bengal adalékolást Marlophennel (tenzidhatású adalék) kombinálta. Ez az összetétel (IAG-talaj) a LUFA takarmánymikrobiológiai laboratóriumaiban több évtized óta használatos abraktakarmányok vizsgálatában (EFMO, European Feed Microbiologist's Association).

A Dichloránt inhibitorként Rose Bengal-Chloramfenikol (DRBC) kombinációjában javasolták King és mtsai (1979) számos penészgomba és élesztőgomba kimutatására. A talaj különlegessége, hogy 25 mg/kg RB mellett további inhibitorként 2 mg/kg dichloránt (D, diklór-nitro-anilint) tartalmaz. Az inhibitorok kombinálása a populáció növekedését egyenletessé teszi és még inkább visszaszorítja a gyorsan növekvő *Mucor*, *Rhizopus* és *Trichoderma* genuszokat.

Szokásos még a talajok vízakaktivitásának csökkentése glicerinnel adalékolásával. Ez főleg abraktakarmányok vizsgálatában és a gabonaipari

mikrobiológia gyakorlatában terjedt el, abból a megfontolásból, hogy a xerofil gombákat – így elsősorban a raktári *Aspergillusokat* – a magas vízakaktivitáson gyorsan növekvő fajok nem nyomják el (DG 18, Dichloran – glicerinnel talaj, EFMO). Szálastakarmányok vizsgálatában viszont a populáció zöme magas vízakaktivitást igénylő faj.

Az összpenészsám korai értékelhetősége és az egyenletes telepfejlődés érdekében a biztos növekedést biztosító, heterotróf fajok igényeit is kielégítő tápanyagellátás és a túlnövekvők lassítását célzó alacsony tápanyagszintek vagy inhibitorok alkalmazása egymásnak ellentmondóak. A takarmányvizsgálat gyakorlatában nyilvánvalóan kompromisszumra van szükség.

A vázoltak alapján a tömegtakarmányok penészfertőzöttségének minősítésére ideális talaj tulajdonságai a következők:

1. A beoltott propagulum-szám maximális csirázási aránya
2. Minden faj igényét kielégítő tápanyag ellátás
3. *Mucor* visszaszorítása
4. A telepkezdemények korai megjelenése révén az összpenész TKE gyors megállapíthatósága
5. Lehetőleg korai konídiumképzés
6. Jól megfigyelhető színárnyalatok és morfológiai képletek, ennek eredményeként a telep morfológia biztos felismerhetősége

Tömegtakarmányok penészfertőzöttségének vizsgálatára módszertani tanulmány, előírás sem a nemzetközi, sem a hazai irodalomban nem jelent meg.

1.2. Kísérleti elrendezés

Kísérleteinkben az abraktakarmányok penészfertőzöttségének vizsgálatára szabványosított MSZ-ISO 7954 talajt vettük alapul. Ehhez hasonlítva vizsgáltuk meg:

- a) a Rose Bengal inhibitor hatását (ISO 7954 RB),
- b) a Rose Bengal és a Dichloran (diklór-mononitroanilin) kombinált inhibitor hatását (DRBC),
- c) Dichlorán inhibitor hatását (ISO 7954-Dichlorán),
- d) a tápanyagszint csökkentésének (negyedelésének) hatását (1/4 N ISO 7954, 1/4 N DRBC és 1/4 N DC),
- e) kísérletet végeztünk redukáló monoszacharidokat kötő dinitro-szalicilsav (DSA adalékkal) (RBC-DSA).

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

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

2.1. Alapszuspenzió és hígítási sor készítése

Az előkészített mennyiségeket 90 ml steril desztillált vízzel 20 percig rázógéppel ráztuk. Ebből az alapszuspenzióból kémcsövekben decimális hígítási sort készítettünk. A hígítási sor tagjaiból

(általában a 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} hígításokból) lemezöntést végeztünk a felsorolt táptalajokkal.

2.2. Táptalajok összetétele és készítése

ISO 7954

Glukóz 20 g, élesztőkivonat 5 g, klóramfenikol 0,1 g, agar 12-15 g 1000 ml talajban.

ISO 7954-RB

Mint ISO 7954, 25 mg/1000 ml Rose Bengal kiegészítéssel.

DRBC

Glukóz 10 g, pepton 5 g, KH_2PH_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, agar 15-20 g, Rose Bengal 25 mg, Dichloran 2 mg 1000 ml talajban (King és mtsai, 1979).

ISO 7954-DC

Glukóz 20 g, élesztőkivonat 5 g, klóramfenikol 0,1 g, agar 12-15 g, dichloran 2 mg 1000 ml talajban.

1/4 N ISO 7954

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

1/4 N DRBC

Glukóz 2,5 g, pepton 1,25 g, KH_2PH_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, agar 15-20 g, Rose Bengal 25 mg, Dichloran 2 mg 1000 ml talajban.

1/4 N DC

Itt a tápanyagkoncentráció a King-féle összetétel egynegyede, viszont inhibitorként csak Dichlorant tartalmaz: glukóz 2,5 g, pepton 1,25 g, KH_2PH_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, agar 15-20 g, dichloran 2 mg 1000 ml talajban.

RBC-DSA

Ebben a kísérleti talajváltozatban a DRBC összetételben a Dichloránt semlegesre puffertalt dinitro-szalicilsavval (DSA) cseréltük le: Glukóz 10 g, pepton 5 g, KH_2PH_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, agar 15-20 g, Rose Bengal 25 mg, DSA 10 mmól 1000 ml talajban.

2.3. Lemezöntés

A hígítási sor tagjaiból 1-1 ml-t a Petri-csészékbe (10 cm átmérőjű) pipettáztunk. Ezután a megolvasztott majd 43-45 °C-ra lehűtött táptalajból 15-15 ml-t öntöttünk rá és az asztal lapján körkörös csúszató mozgással elkevertük. Kidermedés után a csészéket 25 °C inkubátorba helyeztük.

2.4. TKE leolvasása

A *Mucor* növekedését 24 óra után naponta ellenőriztük. A 4-5 napos tenyésztési idő után

megszámoltuk a lemezeken kifejlődött összes penésztelepet, és morfológiai bírálatot végeztünk.

2.5. Morfológiai tájékozódás

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

3. EREDMÉNYEK, MEGFIGYELÉSEK

14 minta összehasonlító feldolgozása során az MSZ-ISO 7954, 1/4 N MSZ-ISO 7954, MSZ-ISO 7954-DC, 1/4 DRBC, DRBC-DSA és 1/4 N DC talajokon kinőtt TKE állományt és a párhuzamosok eltéréseit az 1. táblázat mutatja.

A különböző talajokon kimutatható TKE-szám eltérései az MSZ-ISO 7954 talajon meghatározott TKE-számhoz viszonyítva (%) és a párhuzamos „a” és „b” csészék eltérései (%) az 1. ábrán láthatók.

A tömegtakarmányok vizsgálata szempontjából lényeges megfigyeléseket a 2. táblázat foglalja össze.

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

4. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A takarmányok penészszámának 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.
2. Inhibitorok alkalmazása vagy a talaj tápanyagszintjeinek csökkentése esetén a mintákból kimutatható TKE az összehasonlítás alapjául vett ISO 7954 szabványtalajon kapott TKE-értékkel gyakorlatilag megegyezik a feldolgozásnál szokásos hibahatárok mellett.
3. Az inhibitorokat tartalmazó DRBC összetétel (King és mtsai, 1979) korai TKE leolvasást tesz lehetővé (egyenletesebb telep méret), ugyanakkor a *Mucort* visszazorítja. Ugyanakkor a talaj alapszíne a konidium-képződmények – különösen a toxinogén *Fusariumok* – színének megítélését megnehezíti. Az Rose Bengal hifafestő hatása nem előny.
4. Vizsgálataink jelenlegi fázisában az ISO 7954-Dichlorán kombinációt találtuk a legmegfelelőbbnek, amelyen a TKE korán leolvasható, a *Mucort* a DRBC-ével egyenértékűen visszazorítja és szintelen, ezért a telepszínek jól megfigyelhetők.
5. A 2-4-dinitroszalicilsav (DSA), mint inhibitor intenzív alapszíne és csekély hatékonysága miatt nem vált be.

Szénaminták párhuzamos feldolgozása során a vizsgált talajokon kimutatott penész – TKE értékek aránya (ISO 7954:100%) és a párhuzamosok közötti eltérés (%)

	ISO 7954	1/4 N DRBC	
1.	5,2 x 10 ⁴ (5,7%)	5,54 x 10 ⁴ (106%) (3,6%)	
2.	1,8 x 10 ⁶ (7,9%)	1,85 x 10 ⁶ (102%) (2,1%)	
3.	7,5 x 10 ⁵ (8%)	7,95 x 10 ⁵ (106%) (16,7%)	
4.	9,35 x 10 ⁶ (28,8%)	9,7 x 10 ⁶ (103%) (0%)	
			1/4 N DC
5.	3,4 x 10 ⁵ (10,8%)	3,36 x 10 ⁵ (98%) (19,7%)	3,36 x 10 ⁵ (98%) (6%)
6.	6,1 x 10 ⁴ (4,87%)	7,72x 10 ⁴ (126%) (8,45%)	7,4 x 10 ⁴ (121%) (4,25%)
7.	1,34 x 10 ⁵ (25%)	1,39 x 10 ⁵ (103%) (10,07%)	1,6 x 10 ⁵ (119%) (23,68%)
8.	6,8 x 10 ⁶ (5,8%)	1,6 x 10 ⁵ (2%) (7,1%)	7,85 x 10 ⁶ (115%) (6,3%)
9.	2 x 10 ⁵ (0%)	2,63 x 10 ⁵ (131%) (3,74%)	
10.	7,09 x 10 ⁵ (8,8%)	7,8 x 10 ⁵ (110%) (9,1%)	
11.	1,28 x 10 ⁶ (7,59%)	1,62 x 10 ⁶ (126%) (3,23%)	
		1/4 N ISO 7654	ISO 7954-DC
12.	3,5 x 10 ⁵ (8%)	3,4 x 10 ⁵ (97%) (2,89%)	3,5 x 10 ⁵ (100%) (13,69%)
13.	3,6 x 10 ⁴ (2,7%)	3,9 x 10 ⁴ (108%) (33,7%)	2,9 x 10 ⁴ (80%) (22,9%)
		DRBC-DSA	
14.	6,9 x 10 ⁵ (11%)	5,9 x 10 ⁵ (85%) (5%) !!!	

Table 1: Comparison of CFU values optailed by different media related to ISO 7954 (100%) and differences of parallels (%)

1. ábra: Különböző talajok hatékonysága a penész TKE kimutathatóságára nézve az MSz-ISO 7954-hez (100%) viszonyítva és a párhuzamosok eltérései (%)

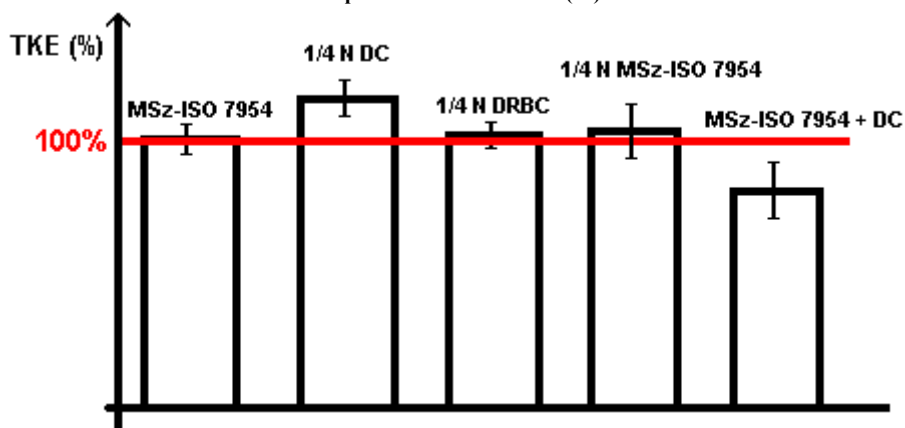


Figure 1: Efficiencies of different media related to ISO 7954 (100%) and differences of parallels (%)

A vizsgált talajkombinációk alkalmassága a szénák analízisére

	ISO 7954	1/4 N-ISO 7954	1/4 N-DRBC	1/4 N-DC	ISO 7954-DC	DRBC-DSA
Telepezdemények fejlődése(1)	72 h	Nehezen indul. 96 h után kisebb átmérőjű telepek. Számuk valós.	72 h	72 h	72-96 h	72-96 h
A kimutatott TKE után a konidiumok megjelenése(2)	Genusztól függő. 5-7 nap után.	Genusztól függő. 10 nap után.	Genusztól függő. 5-7 nap után.	Genusztól függő. 5-7 nap után.	Genusztól függő. 5-7 nap után.	Genusztól függő. 7-10 nap.
Színek észlelhetősége(3)	Kiváló.	A színek nem tipikusak.	Nehézkés, a talaj színe zavaró.	Lassan kialakuló színek.	Kiváló.	Nehézkés, a talaj színe zavaró.
Mucor légmicélium megjelenése(4)	48 h	48 h	-	96 h	96 h	48-72 h
Mucor gátlás mértéke(5)	Nem gátol.	Nem gátol.	Teljes gátlás.	Csaknem teljes.	Késleltető gátlás.	Késleltető gátlás.

Table 2: Comparison of different media and comparisons in terms of suitability for hay evaluation

Colony growth(1), Appearance of conidia after CFU counting(2), Observability of colours(3), Appearance of aeral hyphae (Mucor)(4), Inhibition of Mucor(5)

IRODALOM

- King, D. A.-Jr. Hocking, A. D.-Pitt, J. I. (1979): Dichloran-Rose Rose Bengal medium for enumeration and isolation of moulds from foods. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 37. 959.
- Martin, I. P. (1950): Use of acid, rose bengal and Streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.*, 69. 215.
- Schmidt, H. L.-Bucher, E.-Spicher, G. (1981): Keimgehaltbestimmung von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen in Futtermitteln. *Nährboden und Method. Landwirtschaftliche Forschung*, 34. 4.
- Sipiczki B.-Mátrai T.-Kókai Zs. (2002): Szénák penészfertőzöttsége és a penészedést befolyásoló tényezők kísérletes vizsgálata. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 52. 1. 69-76.
- EFMO – Test Methods (1999): *Microbiological Analysis of Feedstuffs and Interpretation of the Feed Quality*, 1999.
- Magyar Szabvány MSZ 6977-87 (1987): *Takarmányok Mikrobiológiai Vizsgálata*.
- Magyar Szabvány MSZ ISO 7954 (1998): *Mikrobiológia – Általános útmutató élesztők és penészek számlálásához – Telepszámlálási technika 25 °C-on*.