

# *Penicillium expansum* és *Aspergillus niger* növekedési hőmérséklet- és vízakaktivitás- függésének vizsgálata, különös tekintettel a klímaváltozásra

Csernus Olivia<sup>a)</sup>, Andrásy Éva<sup>a)</sup>, Bata-Vidács Ildikó<sup>a)</sup>,  
Beczner Judit<sup>a)</sup> és Farkas József<sup>b)</sup>

<sup>a)</sup>Központi Élelmiszer-tudományi Kutató Intézet

<sup>b)</sup>Budapesti Corvinus Egyetem Hűtő- és Állatiermék Technológiai Tanszék  
Érkezett: 2011. november 11.

A korunkban észlelhető, a földtörténet korszakai folyamán végbement változásokhoz képest igen gyors klímaváltozás tudományosan megerősített tény, aminek régióinkban is legnyilvánvalóbb jelei közé tartozik az időjárási extrémítások (hőhullámok és a csapadék szélsőséges eloszlása mennyiségben, térben és időben) gyakoriságának növekedése (Bartholy et al., 2010). A klímaváltozás az előrejelzések szerint egyre növekvő mértékben kihat az élelmiszerellátás biztonságára („food security”) és az élelmiszerfogyasztás egészségügyi biztonságára („food safety”) (Farkas és Beczner, 2010).

A klímaváltozás és az élelmiszergazdasági jelentőségű penészgombák ökofiziológiai kapcsolata az előbbieken említett mindkét szempont szerint nagy figyelmet érdemel, mert a penészgombák, különösen a toxikus anyagcsere termékeket (mikotoxinokat) képzők, a terményeink romlási és tárolási veszteségein túlmenően meghatározó élelmiszer-biztonsági jelentőségűek is (Varga et al., 2005a, 2005b; Farkas és Beczner, 2009, Garcia et al., 2009; Russell et al., 2010). A klímaváltozás egyik lehetséges következménye a melegkedvelő toxinogén penészgomba fajok fokozott jelentkezése mérsékelt égövi országokban is. Ezzel a jelenséggel az utóbbi években már a hazánkkal szomszédos országokban is szembe kerültek (Torkar és Vengust, 2008; Tabuc et al., 2009). Dobolyi és szerzőtársai (2011) a közelmúltban publikáltak vizsgálatokat *Aspergillus flavus* törzsek gyakori előfordulásáról hazai kukorica szemtermésen. Mindezek miatt és a megelőzésre/védekezésre jobb felkészülés érdekében fontos feladat a penészgombák szaporodási törvényszerűségei ökofiziológiai összefüggéseinek elmélyült ismerete. Nagyszámú kvantitatív adat összegyűjtése szükséges ahhoz, hogy az azokra épülő matematikai modellek segítségével eredményes kockázat-megelőző munka legyen végezhető

(Gibson et al., 1994; Garcia et al., 2009). Célszerű tehát első közelítésben laboratóriumi, reprodukálható körülmények között a penészgombaszaporodás hőmérséklet- és vízáktívitás- (egyensúlyi relatív páratartalom-) függésének tanulmányozása. Az itt bemutatandó vizsgálataink két olyan penészgombafajjal folytak, amelyek a mérsékelt égövi gyümölcstermesztés körülményei között is elterjedt kórokozók közé tartoznak: a *Penicillium* nemzetség *P. expansum* faja, amely az almás termésűek és a citrus-félék romlását okozza, továbbá elsősorban felelős a patulin mikotoxin termeléséért (FAO, 2001) hazánkban is (Taczman-Brückner et al., 2005). A másik vizsgált penészgombafaj a fokozottabban meleg-kedvelő *Aspergillus* nemzetség igen elterjedt, romlást okozó képviselője, az *Aspergillus niger* („fekete penész”). Az aszpergillusz fajok közé tartoznak a hírhedt aflatoxinokat képző fajok, de a mi éghajlati viszonyaink között igen fontosak az ochratoxin-képző *Aspergillus* fajok is. Az utóbbi időkben ilyenek közé számítanak az *A. niger* egyes törzsei is (Varga et al., 2005a).

## Anyagok és módszerek

### Penészgomba törzsek

A vizsgált penészgomba törzsek: *Penicillium expansum* F.00811, amely a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származik és eredetileg rothadt almáról lett izolálva, illetve *Aspergillus niger*, amely a KÉKI Mikrobiológiai Osztályának Törzsgyűjteményéből való.

### Inokulum készítés és telepképzés vizsgálata

A penészgomba törzsek ferde maláta agaron (Merck Gmb, Darmstadt) 25 °C-on 7 napig növesztett, bspórázott tenyészetekről steril desztillált vízzel a konidiumokat lemostuk és e szuszpenziók konidium koncentrációjának Bürker kamrás mikroszkópi számlálással való megállapítása után további steril desztillált vizes hígítással kb.  $10^6$  konidium  $\text{ml}^{-1}$  koncentrációjú törzs-szuszpenziókat állítottunk elő. A 9 cm átmérőjű műanyag Petri-csészékben megszilárdított, és kb. 3 mm vastagságú maláta agar (pH 7) lemezek közepén 4,5 mm átmérőjű dugófúróval kutacsát képeztünk, amibe a törzs-szuszpenzióból 100  $\mu\text{l}$ -t pipettáztunk. A maláta agar vízáktívitasát az elkészítéskor glicerinnel adagolásával állítottuk be a közepes és a nagy nedvességtartalmú termékeket reprezentálva, 0,90 és 0,98 vízáktívitas értékekre. (A szakirodalom ezeknek a penészgomba fajoknak a szaporodását illetően  $a_w=0,82-0,84$  minimális vízáktívitas igényt jelez (Pitt

& Hocking, 1997; Parra & Magan, 2004)). A pontos glicerín tartalmat refrakció méréssel állítottuk be. Mindegyik vízaktivitási szintből 4-4 Petri-csészét (párhuzamos leoltásokat) polietilén tasakokba csomagoltan inkubáltunk 10, 15, 25, 30 és 35 °C hőmérsékleten. Inkubáció közben a beoltott kutacsok körül a hifanövekedés révén koncentrikusan megjelenő penészgomba-telepek átmérőjét tolmércével mm-es pontossággal időről-időre megmértük, és regisztráltuk azt is, hogy mikor jelentek meg a telepeken a konidiumok. Ezt a kísérlet-sorozatot még egyszer megismételtük a penészgomba tesztorganizmusaink hőmérséklettől és vízaktivitástól függő növekedési „válaszreakciói” reprodukálhatóságának megfigyelésére.

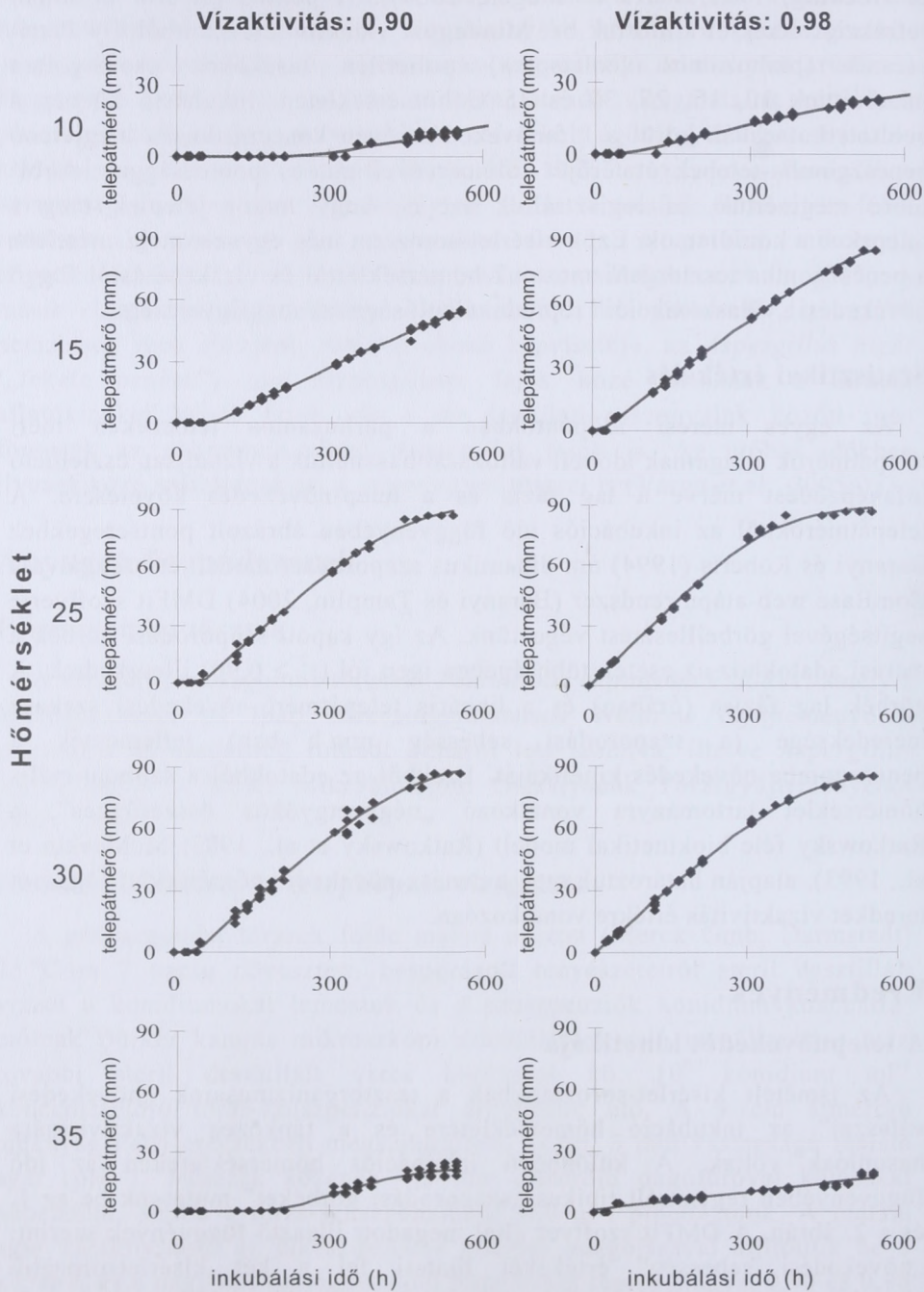
## Statisztikai értékelés

Az egyes mérési időpontokban a párhuzamos lemezeken mért telepátmérők átlagainak időbeli változását használtuk a vizuálisan észlelhető hifaképződést mérve a lag fázis és a telep-növekedés követésére. A telepátmérőkből az inkubációs idő függvényében ábrázolt pontseregekhez Baranyi és Roberts (1994) ún. dinamikus szaporodási modelljét használva a ComBase web-alapú rendszer (Baranyi és Tamplin, 2004) DMFit szoftverje segítségével görbeillesztést végeztünk. Az így kapott szaporodási görbék a mérési adatokhoz az esetek többségében igen jól ( $r^2 > 0,90$ ) illeszkedtek. A görbék lag fázisa (órában) és a lineáris telepátmérő-növekedési szakasz meredeksége (a szaporodási sebesség  $\text{mm h}^{-1}$ -ban) jellemezték a penészgomba növekedés kinetikáját. Ezekből az adatokból a szuboptimális hőmérséklet tartományra vonatkozó „négyzetgyökös összefüggés”, a Ratkowsky féle biokinetikai modell (Ratkowsky et al., 1983; McMeekin et al., 1993), alapján határoztuk meg a penész-növekedés hőmérséklet függését mindkét vízaktivitás értékre vonatkozóan.

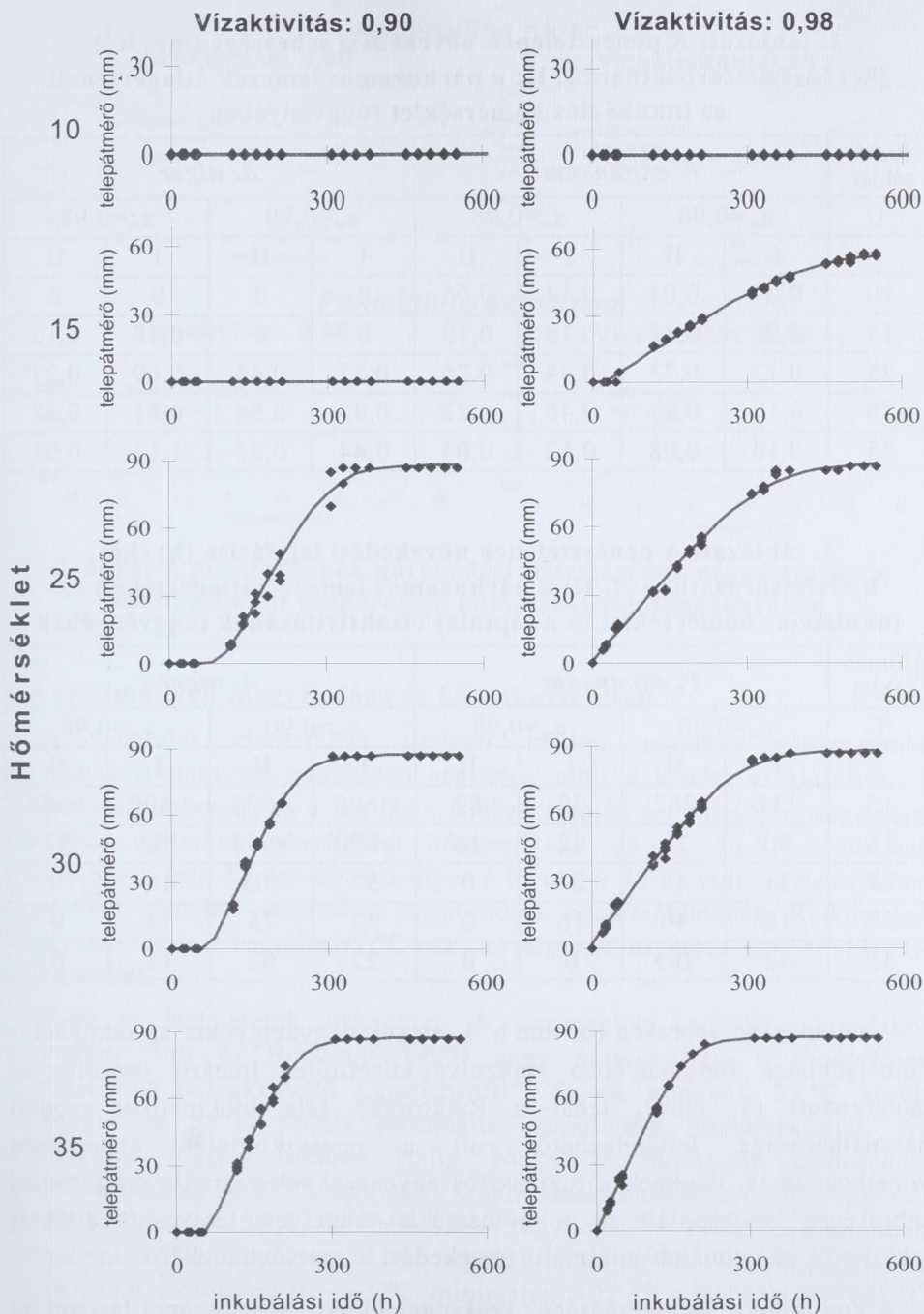
## Eredmények

### A telepnövekedés kinetikája

Az ismételt kísérlet-sorozatokban a tesztorganizmusaink „növekedési válaszai” az inkubáció hőmérsékletére és a tápközeg vízaktivitására hasonlóak voltak. A különböző inkubációs hőmérsékleteken az idő függvényében regisztrált tipikus „szaporodási görbéket” mutatunk be az 1. és a 2. ábrán. A DMFit szoftver által megadott illesztő függvények szerinti „növekedési sebesség” értékeket tünteti fel a két kísérletsorozatra vonatkozóan az 1. táblázat. A lag fázisok becsült időtartalmát mutatja a 2. táblázat.



1. ábra: *Penicillium expansum* telepek növekedése az inkubációs hőmérséklet és a táptalaj vízaktivitásának függvényében



2. ábra: *Aspergillus niger* telepek növekedése az inkubációs hőmérséklet és a táptalaj vízaktivitásának függvényében

**1. táblázat: A penésztelepek növekedési sebessége (mm h<sup>-1</sup>) (két kísérletsorozatban: I, II; a párhuzamos lemezek átlagértékei) az inkubációs hőmérséklet függvényében**

Hőmérséklet °C	<i>P. expansum</i>				<i>A. niger</i>			
	a <sub>w</sub> =0,90		a <sub>w</sub> =0,98		a <sub>w</sub> =0,90		a <sub>w</sub> =0,98	
	I	II	I	II	I	II	I	II
10	0,07	0,04	0,14	0,05	0	0	0	0
15	0,08	0,12	0,18	0,19	0	0	0,16	0,15
25	0,17	0,23	0,44	0,26	0,33	0,44	0,69	0,27
30	0,17	0,22	0,46	0,22	0,35	0,54	0,81	0,32
35	0,16	0,08	0,12	0,03	0,44	0,53	1,13	0,51

**2. táblázat: A penésztelepek növekedési lag fázisa (h) (két kísérletsorozatban: I, II; a párhuzamos lemezek átlagértékei) az inkubációs hőmérséklet és a táptalaj vízaktivitásának függvényében**

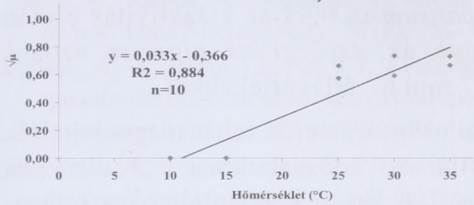
Hőmérséklet °C	<i>P. expansum</i>				<i>A. niger</i>			
	a <sub>w</sub> =0,90		a <sub>w</sub> =0,98		a <sub>w</sub> =0,90		a <sub>w</sub> =0,98	
	I	II	I	II	I	II	I	II
10	132	262	39	63	>600	>600	>600	>600
15	80	71	42	18	>600	>600	153	21
25	31	49	24	0	57	103	18	0
30	18	40	16	0	32	75	13	0
35	42	205	0	0	22	62	11	0

A növekedési sebesség ( $\mu$ , mm h<sup>-1</sup>) értékek négyzetgyökét az inkubációs hőmérsékletek függvényében ábrázolva közelítőleg lineáris összefüggés mutatkozott (3. ábra), tehát a Ratkowsky féle biokinetikai modell használhatósága feltételezhető volt a penészkolóniák alakulására vonatkozóan is. Ezeknek a regressziós egyeneseknek a „nulla szaporodási sebességre” extrapolált és a hőmérséklet-tengelyen leolvasott értékeit tekintettük az „elméleti minimális növekedési hőmérsékletnek”.

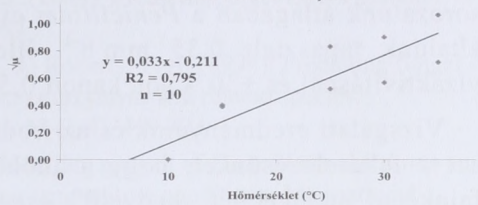
A konidiumok megjelenéséhez szükséges időtartam is függeni látszott az inkubációs hőmérséklettől, de erre vonatkozóan konkrétabb törvényszerűség megállapítását a viszonylag kisszámú észleletünk még nem tette lehetővé.

## *Aspergillus niger*

Vízaktivitás: 0,90

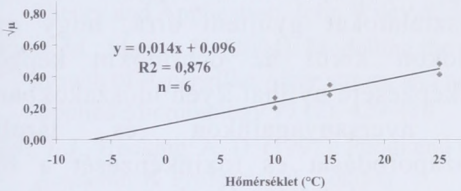


Vízaktivitás: 0,98

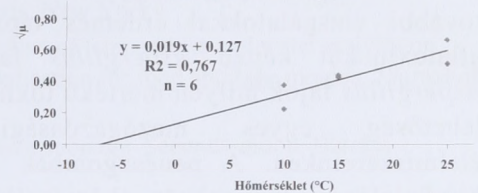


## *Penicillium expansum*

Vízaktivitás: 0,90



Vízaktivitás: 0,98



3. ábra: A penésztelepek növekedési sebességének négyzetgyöke a szuboptimális szaporodási hőmérsékletek függvényében

### Az eredmények megvitatása és következtetések

A nagyobb vízaktivitás várható módon mindkét penészgomba növekedését nagyobb mértékben segítette, mint a kisebb vízaktivitás. A szaporodási sebesség és a lag fázis értékek alapján a *Penicillium expansum* törzsünk optimális növekedési hőmérséklete 25 és 30 °C közöttinek mutatkozott, míg az *Aspergillus niger*-é legalább 35 °C volt. A *Penicillium expansum* elméleti minimális szaporodási hőmérsékletének Ratkowsky-függvény szerinti becslése -7 °C-nak, az *Aspergillus niger*-é +7...+11 °C-nak adódott.

Ezek az észleleteink viszonylag jó összhangban vannak szakirodalmi adatokkal: Pitt és Hocking (1997) nagy monográfiája a *Penicillium expansum*-ot hidegkedvelő („pszichrofil”) fajnak minősíti, 25 °C körüli optimális és 35 °C körüli maximális szaporodási hőmérséklettel. Az *Aspergillus niger*-t illetően pedig +6...+8 °C minimális szaporodási hőmérsékletet és 35-37 °C optimális szaporodási hőmérsékletet ír. Gougouli és Koutsomanis (2010) modellezéssel egybekötött és a közelmúltban megjelent közleményükben 0,997 vízaktivitású maláta extrakt agaron a *Penicillium expansum*-ra -5,7 °C minimális, +22 °C optimális és +31 °C maximális szaporodási hőmérsékletet adnak meg, az *Aspergillus niger*-re pedig ezek az értékek rendre +10, +31 és +43 °C. A telepátmérő növekedési sebességére vonatkozó becslésük a *Penicillium expansum* esetén az általuk

optimálisnak jelzett +22 °C-on 0,22 mm h<sup>-1</sup>, az *Aspergillus niger*-é +31 °C-on 0,84 mm h<sup>-1</sup>. Ezek az értékek is kellően közeliek a két kísérlet-sorozatunk átlagában a *Penicillium expansum*-ra 0,98-as vízakktivitás esetén általunk tapasztalt 0,35 mm h<sup>-1</sup>, illetve az *Aspergillus niger*-re azonos vízakktivitásnál és +30 °C-on kapott 0,57 mm h<sup>-1</sup> átlagértékekkel.

Vizsgálati eredményeink és az irodalmi információk tehát megerősítették azt a feltételezésünket, hogy a „hőhullámos” időszakokban a *Penicillium* fajokénál melegebbet „kedvelő” *Aspergillus* fajok a hőhullámokra („heat-waves”) jellemző hőmérsékletek időszakában a nagy vízakktivitású élelmiszer-nyersanyagokon jelentős mértékű szaporodásra képesek. Emiatt további vizsgálatokkal érdemes tapasztalatokat gyűjteni arra, hogy az aflatoxinokat képző *Aspergillus* fajokon kívül az ochratoxin képző *Aspergillus* fajok milyen mértékű toxinképzésére nyíthat ilyen időszakokban lehetőség egyes mezőgazdasági nyersanyagainkon és tárolt élelmiszereinken. A penészgombák szaporodását és toxinképzését a fő ökofiziológiai tényezőkön (hőmérséklet, vízakktivitás, légtér-összetétel) a szóba jövő termékek egyéb összetételi jellemzői és például a növényi anyagok fitoimmunitását segítő tényezők is befolyásolhatják, az ilyen termékeknek megfelelő közegeken, mintákon végzett „validálási vizsgálatok” is nélkülözhetetlenek (Baert et al., 2007).

## Irodalom

- Baert, K., Valero, A., De Meulenaer, B., Samapundo, S., Ahmed, M. M., Bo, L., Debevere, J., Devlieghere, F. (2007): Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. *International Journal of Food Microbiology* **118** (2), 139-150
- Baranyi J., Roberts, T. A. (1994): A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* **23** (3-4), 277-294
- Baranyi J., Tamplin, M. (2004): ComBase: a common database on microbial responses to food environments. *Journal of Food Protection* **67** (9), 1967-1971
- Bartholy J., Pongrácz R., Torma Cs. (2010): A Kárpát-medencében 2021-2050-re várható regionális éghajlatváltozás RegCM-szimulációk alapján. „Klíma-21” Füzetek **60**, 3-13
- Dobolyi Cs., Sebők F., Varga J., Kocsubé S., Szigeti Gy., Baranyi N., Szécsi Á., Lustyik Gy., Micsinai A., Tóth B., Varga M., Kriszt B., Kukolya J. (2011): Aflatoxin termelő *Aspergillus flavus* törzsek előfordulása hazai kukorica szemtermésben. *Növényvédelem* **47** (4), 125-133
- FAO (2001): Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Rome, Italy FAO Food and Nutrition Paper **74** 281-415
- Farkas J., Beczner J. (2009): A klímaváltozás és a globális felmelegedés várható hatása a mikológiai élelmiszerbiztonságra. „Klíma-21” Füzetek **56**, 3-17

- Farkas J., Beczner J. (2010): A klímaváltozás lehetséges hatásai az élelmiszer-biztonságra. Élelmiszervizsgálati Közlemények **56** (4), 219-230
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marin, S. (2009): Predicting mycotoxins in foods: A review. Food Microbiology, **26** (8), 757-769
- Gibson, A. M., Baranyi J., Pitt, J. I., Eyles, M. J., Roberts, T. A. (1994): Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. International Journal of Food Microbiology **23** (3-4), 419-431
- Gougouli, M., Koutsoumanis, K. P. (2010): Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. International Journal of Food Microbiology **140** (2-3), 254-262
- McMeekin, T. A., Olley, J., Ross, T., Ratkowsky, D. A. (1993): Predictive Microbiology: Theory and Application. John Wiley & Sons, New York
- Parra, M., Magan, N. (2004): Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and application for food spoilage moulds. Journal of Applied Microbiology **97** (2), 429-438
- Pitt, J. J., Hocking, A. D. (1997): Fungi and food spoilage. Second edition, Blackie Academic & Professional, London
- Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., McMeekin, T. A., Stokes, A. N., Chandler, R. E. (1983): Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. Journal of Bacteriology **154** (3), 1222-1226
- Russell, R., Paterson, A. J., Lima, N. (2010): How will climate change affect mycotoxins in food? Food Research International **43** (7), 1902-1914
- Tabuc, C., Marin, D., Guerre, P., Sesan, T., Bailly, J. D. (2009): Molds and mycotoxin content of cereals in Southeastern Romania. Journal of Food Protection **72** (3), 662-665
- Taczman-Brückner A., Mohácsi-Farkas Cs., Balla Cs., Kiskó G. (2005): Comparison of biocontrol activity of *Kluyveromyces lactis* with other yeast strains against *Penicillium expansum*. Acta Alimentaria **34** (1), 71-80
- Torkar, K. G., Vengust, A. (2008): The presence of yeasts, molds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. Food Control **19** (6), 570-577
- Varga J., Tóth B., Téren J. (2005a): Mycotoxin producing fungi and mycotoxins in foods in Hungary in the period 1994-2002. Review. Acta Alimentaria **34** (3) 267-275
- Varga J., Kiss R., Mátrai T., Téren J. (2005b): Detection of ochratoxin A in Hungarian wines and beers. Acta Alimentaria **34** (4) 381-392

## ***Penicillium expansum* és *Aspergillus niger* növekedési hőmérséklet- és vízaktivitás-függésének vizsgálata, különös tekintettel a klímaváltozásra Összefoglalás**

Glicerinnel 0,90 és 0,98 vízaktivításra beállított maláta extrakt agar lemezek középpontját *Penicillium expansum* és *Aspergillus niger* konidiumaival oltottuk be és 10, 15, 25, 30 és 35 °C hőmérsékleten inkubáltuk. Háromheti izotermikus inkubáció során rendszeres időközönként

megállapítottuk a képződő penésztelepek átmérőjét. Ezekhez az adatokhoz a ComBase rendszer DMFit szoftverjével szaporodási modellt illetve lag fázis időtartam és telepátmérő növekedési sebesség értékeket nyertünk. Az utóbbiakból Ratkowsky négyzetgyökös regressziós modellje segítségével becsültük a vizsgált penészgombák szaporodás-kinetikáját jellemző sebesség-értékeket és az elméleti minimális szaporodási hőmérsékletüket. Az eredmények szerinti minimális és optimális szaporodási hőmérséklet értékek jó egyezésben vannak irodalmi adatokkal. Eredményeink azt mutatják, hogy az *Aspergillus niger* lényegesen nagyobb hőmérsékletigényű, mint a *Penicillium expansum*. Mindezek alapján a nyári hőhullámok gyakoriságának és intenzitásának feltételezett várható növekedése az élelmiszerek fokozott mikológiai kockázatát idézhetik elő a régiókban, nemcsak a most is elterjedt *Penicillium* fajok szaporodását stimulálva, hanem lehetőséget teremtve a „melegkedvelő” *Aspergillus* fajok fokozott megtelepedésének és kertészeti terményeink és tárolt élelmiszereink velük való erőteljes szennyeződésének is.

## **Investigations on Effect of Temperature and Water Activity on Growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger*, with Special Reference to the Climate Change**

### **Abstract**

Malt extract agar plates set by glycerol to water activities of 0.90 and 0.98, respectively, have been centrally inoculated with conidia of either *Penicillium expansum* or *Aspergillus niger* and incubated at 10, 15, 25, 30 and 35 °C. Development and growth of the colony diameters were observed periodically during 3 weeks isothermic incubation. Curve fitting of these data as a function of the incubation temperature were performed by the DMFit software of the ComBase database and the duration of the apparent lag phase of mycelium growth and the increase of the colony diameters were recorded. Effect of the temperature on the growth rate were evaluated by the square root regression model of Ratkowsky estimating theoretical minimal temperatures of these moulds. Our results on minimal and optimal growth temperatures were in good agreement with data from literature. The results demonstrated that *Aspergillus niger* has significantly higher temperature requirement than *Penicillium expansum*. Therefore, the projected increasing frequency and intensity of summer heat waves may cause an increased risk of mycological safety of food in our region, not only by stimulating the growth of the presently also common *Penicillium* species but create an increased opportunity for „warm-loving” aspergilli to establish themselves and contaminate intensely our horticultural products and stored foods.