VLIV DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ NA RŮST FUSARIÍ A TVORBU TOXINŮ

Dana Hrubošová[1,2], Petra Moťková[2] a Jarmila Vytřasová[2]

[1]*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 95, 532 10 Pardubice, +420 466 037 775, dana.hrmova@student.upce.cz*

[2]*Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 95, 532 10 Pardubice*

Abstrakt

Cílem práce bylo zjistit vliv vybraných dezinfekcí na růst a produkci deoxynivalenolu a T-2 toxinu. Živná média byla připravena s různou koncentrací testovaných dezinfekcích (Desanal A plus, ProCura sprej a Guaa - Pool) a zaočkována plísní rodu *Fusarium* o denzitě 10^5 spor/ml. Stanovení obsahu T-2 toxinu a deoxynivalenolu bylo provedeno pomocí komerčně vyráběných kitů. Jednotlivé kmeny vykazují velkou odlišnost v tvorbě toxinů. Použití nízkých koncentracích dezinfekčních prostředků nezamezilo nárůstu fusarií a tudíž ani produkci T-2 toxinu a deoxynivalenolu.

Klíčová slova: *Fusarium; dezinfekce; T-2 toxin; deoxynivalenol*

Úvod

Mykotoxiny jsou metabolické produkty patogenních plísní, které kontaminují krmiva a potraviny. V současnosti je známo více jak 300 mykotoxinů. Jsou chemicky různorodé s nízkou molekulovou hmotností v rozmezí od 200 do 500. Výskyt toxinogenních plísní v potravinách ještě neznamená přítomnost mykotoxinů [1]. D Mello [2] prokázal produkci a výskyt více mykotoxinů současně v jednom vzorku. Ty potom mohou působit toxičtěji než jednotlivé mykotoxiny.

Deoxynivalenol a T-2 toxin se řadí do skupin trichothecenových mykotoxinů, které produkují plísně rodu *Fusarium* (Obr. 1). Deoxynivalenol, jehož maximální přípustné množství ve sladu je 1,25 mg/kg, způsobuje technologické problémy ve sladařském a pivovarnickém průmyslu. Limitní hodnota pro DON činí podle zákona 298/1997 Sb., vyhlášky MZ 294/97 v zrnu 2 mg/kg; v mouce 1 mg/kg; pro dětskou výživu 0,5 mg/kg [3]. Pro T-2 toxin zatím není stanoven maximální přípustný obsah v potravinách, ale v krmivu je 0,5 mg/kg [4]. Intoxikací trichothecenových toxinů může dojít k poškození endokrinního a nervového systému. Akutní toxicita se projevuje zvracením, střevními potížemi, hemoragií nebo teratogenními účinky [5].

Stanovení mykotoxinů při velmi nízkých koncentracích vyžaduje spolehlivé a citlivé metody pro jejich detekci. Pro stanovení mykotoxinů se mohou používat jak analytické, tak i imunochemické metody. Z analytických metod se často používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie nebo chromatografie na tenké vrstvě. Z imunochemických metod se nejčastěji používá ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) [6].

Obr. 1. Plísně rodu *Fusarium* spp. – rohlíčkovité makrokonidie, sklíčková kultura, zvětšení 400x

Materiál a metody

Použité kmeny plísní: Pro produkci fusariových mykotoxinů byly použity tyto plísně: *Fusarium poae* CCM F – 584, *Fusarium graminearum* CCM F – 683, *Fusarium* spp.- izolát ze vzduchu ve sladovně a *Fusarium* spp.- izolát z ječmene. Sbírkové kmeny označené CCM F jsou z České sbírky mikroorganismů Brno.
Kultivace: MALT agar - výrobce HI-MEDIA při 25 a 15 °C, 7 dní.
Použité dezinfekční přípravky a jejich koncentrace

Desanal A plus: 3; 5; 7; 10 % doporučená koncentrace výrobcem: 7 - 10 %
ProCura spray: 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 % doporučená koncentrace výrobcem: 1 - 2 %
Guaa - Pool: 5; 10; 20; 30; 40 % doporučená koncentrace výrobcem: 4 - 12 %

Izolace fusariových mykotoxinů

2O g vzorku bylo extrahováno pomocí 100 ml směsi acetonitril:voda (84:16). Poté byl odpipetován 1 ml extraktu a přečištěn přes imunoafinitní kolonku pro T-2 toxin: EASI-EXTRACT® T-2 HT-2 (R-Biopharm, Německo) a pro DON: DON test ™ HPLC (Vicam, USA) a odpařen do sucha. Pro analýzu mykotoxinu byl k odparku přidán 1 ml destilované vody pro získání původního objemu extraktu. Dále bylo postupováno dle návodu v Agra Quant® Deoxynivalenol Test kitu (limit detekce 0,2 ppm) a Agra Quant® T-2 toxin Test kitu (limit detekce 35 ppb). 200 µl konjugátu bylo smícháno 100 µl vzorku nebo standardu v přípravné testovací mikrodestičce. Okamžitě po promíchání bylo přeneseno 100 µl do měřící jamky a inkubováno při laboratorní teplotě 15 minut. Obsah jamek byl vyprázdněn do odpadu a pětkrát promyt promývacím roztokem. Zbytek promývacího roztoku byl vyklepnut a osušen filtračním papírem. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl substrátu (inkubace při laboratorní teplotě 5 minut), a potom 100 µl stop roztoku. Strip byl vložen do ELISA readru Multiskan RC (Labsystem Ltd. Oy, Finsko) a byla měřena absorbance při vlnové délce 450 nm.

Výsledky a diskuse

Pro tento experiment byly vybrány kmeny, které produkují ve velké míře pouze jeden toxin (T-2 toxin nebo deoxynivalenol). V přítomnosti různých dezinfekcí došlo ke zvýšené

produkci T-2 toxinu i deoxynivalenolu, a proto je velice nutná aplikace správné koncentrace dezinfekce, kterou doporučuje výrobce. Ke stejnému závěru došli ve studii vlivu fungicidů na produkci fusariových toxinů [7]. Jak byla ovlivněna hladina T-2 toxinu ve vzorcích ošetřených Desanalem A plus v porovnání s neošetřeným vzorkem, je vidět v tabulce č. 1. Stejně takto se chovaly ostatní testované kmeny fusarií při produkci T-2 toxinu a deoxynivalenolu v přítomnosti ostatních dezinfekcích.

V letech 2002 – 2003 bylo testováno 65 vzorků zemědělských plodin na přítomnost a koncentraci pěti nejčastějších mykotoxinů: aflatoxin, deoxynivalenol, fumonisin, T-2 toxin a zearalenon. Nejčastějšími toxiny ve vzorku byly: deoxynivalenol > T-2 toxin > zearalenon. Pro jejich kvantitativní stanovení byla také použita ELISA metoda. [8]. Tato metoda poskytuje dostatečně přesné výsledky pro analýzu mykotoxinů.

Tabulka 1. Produkce T-2 toxinu v přítomnosti dezinfekce (Desanal A plus) u kmenů *Fusarium poae* CCM F – 584 a *Fusarium* spp. - izolát ze vzduchu ve sladovně.

koncentrace (*)	**podmínky kultivace**	**průměrná hodnota T-2 toxinu ve vzorku (µg/kg)**
Fusarium poae	**25°C, 7 dní**	**13,6**
Fusarium poae + D3	25°C, 7 dní	59,4
Fusarium poae + D5	25°C, 7 dní	56,73
Fusarium poae + D7	25°C, 7 dní	-
Fusarium poae	**15°C, 7 dní**	**93,7**
Fusarium poae + D3	15°C, 7 dní	77,6
Fusarium poae + D5	15°C, 7 dní	84,55
Fusarium poae + D7	15°C, 7 dní	37,1
Fusarium poae + D10	15°C, 7 dní	-
***Fusarium* spp.**	**25°C, 7 dní**	**71,6**
Fusarium spp. + D3	25°C, 7 dní	82,7
Fusarium spp. + D5	15°C, 7 dní	80,0
Fusarium spp. + D7	15°C, 7 dní	-
***Fusarium* spp.**	**15°C, 7 dní**	**13,0**
Fusarium spp. + D7	15°C, 7 dní	69,4
Fusarium spp. + D10	15°C, 7 dní	-

(*) D = dezinfekce Desanal A plus, koncentrace: D3 = 3 %, D5 = 5 %0, D7 = 7 % a D10 = 10 %.

Závěr

Byly testovány 2 sbírkové kmeny fusarií (*Fusarium poae* CCM F – 584 a *Fusarium graminearum* CCM F – 683) a 2 divoké kmeny fusarií (*Fusarium* spp. - izolát ze vzduchu ve sladovně a *Fusarium* spp. - izolát z ječmene) na růst a tvorbu toxinů za různých podmínek.

Bylo zjištěno, že použití nesprávné koncentrace dezinfekčních prostředků může způsobit zvýšenou tvorbu toxinů.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Univerzity Pardubice SGFChT07/2013.

Literatura

[1.] NELSON, P.E., DESJARDINS A.E., PLATTNER R.D., *Fumonisins, mycotoxins produced by Fusarium species: Biology, chemistry and signifikance.*, Annual Review of Phytopatholgy. 1993, vol. 31, 233 – 249.

[2.] D'MELLO, J.P.F., PALCINTA, C.M., MACDONALD, A.M.C., *Fusarium mycotoxins: A reviewof global implications for animal health, welfare and productivity*. Animal Feed Science and Technology,1999, vol. 80, 183-205.

[3.] BÁRTOVÁ, Š. , SÝKOROVÁ, S., PAPOUŠKOVÁ, L., ŠÍP, V., CHRPOVÁ, J., HÝSEK, J., SYCHROVÁ, E., NOVOTNÁ, M., BEROVÁ, M., VLČKOVÁ, M., *Stav kontaminace potravinářských obilovin fusariovými mykotoxiny*, Sborník referátů z konference věnované otázkám jakosti sklizně 2002, legislativě k hodnocení jakosti a novým pohledům na užití produkce obilovin, Kroměříž, 2002, 54 – 65.

[4.] BETINA V., Mykotoxíny-chémia-biológia-ekológia, vydavatelství ALFA, Bratislava, 1990, 23 – 106.

[5.] CREPPY, E.E., Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters, 2002, vol. 127, 19–28.

[6.] PEMBERTON, R. M., PITTSON, R., BIDDLE, N., DRAGO, G. A., HART, J. P., *Studies towards the development of a screen-printed carbon electrochemical immunosensor array for mycotoxin: a sensor for aflatoxin B1*. Analytical Letters., 2006, vol 39, 1573.

[7].HRUBOŠOVÁ-HRMOVÁ, D., VYTŘASOVÁ, J. and MOŤKOVÁ, P., *Effect of selected fungicides on Fusarium growth and toxins production.* Czech Journal of Food Sciences, 2011, vol. 29, 69–75.

[8.] NEDĚLNÍK, J., MORAVCOVÁ, H., Mykotoxiny v krmivech. Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o. Troubsko, Veterinářství, 2005, č. 55, 214–219.

Abstract

The aim of the work was to examine the effect of selected disinfectants on the growth and production of deoxynivalenol and T-2 toxin. Nutritive media were prepared with different concentration of the tested disinfectants (Desanal A plus , ProCura spray and Guaa - Pool) and were inoculated with Fusarium moulds (density of 10^5 spores / ml). The quantification of T-2 toxin and deoxynivalenol was performed using commercially manufactured kits. Individual strains show a great difference in the formation of toxins. The using of low concentrations of disinfectants inhibit growth fusarium and ergo no production of T-2 toxin and deoxynivalenol.