



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00242**

(22) Data de depozit: **31.03.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.10.2011** BOPI nr. **10/2011**

(41) Data publicării cererii:
30.09.2009 BOPI nr. **9/2009**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PROTECȚIA PLANTELOR,
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL. D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ȘTEFAN AURORA LILIANA,
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
ES 2162552 (A1); ES 2195771 (A1)

(54) **MEDIU DE CULTURĂ PENTRU DIFERENȚIEREA
CIUPERCILOR AFLATOXIGENE ȘI NON-AFLATOXIGENE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un mediu de cultură pentru diferențierea ciupercilor aflatoxigene și non-aflatoxigene, destinat utilizării în domeniul controlului siguranței alimentului. Produsul conform invenției este constituit din 0,45...0,55 părți K_2HPO_4 , 0,45...0,55 părți $MgSO_4$, 0,25...0,3 părți complex zinc : gelatin-peptonă 1 : 12, 0,25...0,3 părți peptonă, 0,45...0,55 părți extract de

drojdie, 28...32 părți zaharoză, 2,8...3,2 părți dime-til- β -ciclodextrină, 0,048...0,052 părți cloramfenicol, 0,00018...0,0022 părți dicloran, 18...22 părți agar, apă distilată până la 1000 părți, părțile fiind exprimate în greutate.

Revendicări: 1

Examinator: **biochimist CREȚU ADINA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 123355 B1

1 Inventția se referă la un mediu, pentru diferențierea ciupercilor aflatoxigene și non-
aflatoxigene, destinat utilizării în domeniul controlului siguranței alimentului, respectiv pentru:
3 (I) controlul prezenței ciupercilor aflatoxigene din grupul *Aspergillus section flavi* în alimente
și furaje și/sau (II) izolarea tulpinilor non-aflatoxigene de aspergillii din același grup, utile în
5 combaterea biologică a ciupercilor producătoare de aflatoxine.

Sunt cunoscute o serie de procedee și de produse care permit punerea în evidență
7 a prezenței ciupercilor aflatoxigene (din grupul *Aspergillus section flavi*) într-un substrat (ali-
mentar). **US 6623932** prezintă secvențele de primeri specifici pentru ciupercile aflatoxigene,
9 ca și procedeul de utilizare a acestor primeri (independent sau în combinație) pentru punerea
în evidență a ciupercilor microscopice aflatoxigene într-un sistem dat. Procedeul prezentat
11 implică următoarele etape: (I) prelevarea microflorei din substratul (alimentar); (II) extracția
ADN-ului din microflora prelevată din substrat; (III) amplificarea enzimatică a ADN-ului (PCR)
13 folosind primerii specifici; (IV) analiza ADN amplificat prin electroforeză și (V) identificarea
ciupercilor aflatoxigene. Procedeul propus este laborios și necesită aparatură specializată,
15 reactivi scumpi și personal înalt calificat. Procedeul descris nu permite identificarea și
izolarea tulpinilor de aspergillii non-aflatoxigene (care pot constitui componenta activă a unor
17 bioproduse cu un rol semnificativ în limitarea biologică a riscului contaminării cu aflatoxine -
US 5294442 și **US 6306386** sau **WO 2006/076245**).

19 Utilizarea unor aditivi de tip ciclodextrină (**ES 2162552**) pentru mediile de cultură
uzuale reprezintă o soluție ieftină, ușor de realizat cu personal de calificare medie și cu o
21 dotare simplă și care permite diferențierea între ciupercile aflatoxigene și non-aflatoxigene
și izolarea ulterioară a ciupercilor non-aflatoxigene. În brevetul citat la mediile uzuale:
23 Sabouraud + oxitetraciclină (10 g peptonă, 40 g glucoză, 15 g agar, 50 mg oxitetraciclină,
apă distilată până la 1000 ml); Sabouraud + oxitetraciclină + roșu bengal (10 g peptonă, 40 g
25 glucoză, 15 g agar, 50 g oxitetraciclină, apă distilată până la 1000 ml, adăugare 35 mg roșu
bengal înainte de sterilizarea prin autoclavare); agar - extract de drojdie - zaharoză (20 g
27 extract de drojdie, 150 g zaharoză, 20 g agar, apă până 1000 ml) au fost adăugate câte 3 g
de heptakis (2,6-*o*-di-metil)- β -ciclodextrină. Ciclodextrina în exces formează compuși de
29 incluziune care amplifică fluorescența aflatoxinelor și permite astfel identificarea rapidă a
tulpinilor de ciuperci producătoare de aflatoxine și diferențierea tulpinilor non-aflatoxigene.

31 În cazul procedurii de diferențiere care utilizează aditivul de tip ciclodextrină descris
prin brevetul spaniol dezavantajele sunt date de: (I) selectivitatea redusă a mediilor folosite
33 pentru ciupercile din grupul *Aspergillus section flavi* (grup în care sunt incluse majoritatea
tulpinilor de ciuperci cunoscute ca fiind producătoare de aflatoxine) și (II) lipsa ingredientilor
35 care să inducă o (supra)exprimare certă și sigură a genelor implicate în biosinteza
aflatoxinelor (gene care sunt puse în evidență prin amplificarea enzimatică a ADN cu ajutorul
37 primerilor descriși în **US 6623932**).

39 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față este stabilirea unei asocieri
optime de ingrediente, cât și a raportului lor de amestecare pentru definirea unui mediu de
cultură selectiv, prin care să se asigure diferențierea certă și rapidă între ciupercile
41 aflatoxigene și non-aflatoxigene.

Mediul de cultură, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus, prin
43 aceea că este constituit din: 0,45...0,55 părți K_2HPO_4 , 0,45...0,55 părți $MgSO_4$, 0,25...0,3 părți
complex zinc:gelatin-peptonă 1:12, 0,25...0,3 părți peptonă, 0,45...0,55 părți extract de
45 drojdie, 28...32 părți zaharoză, 2,8...3,2 părți dimetil- β -ciclodextrină, 0,048...0,052 părți
cloramfenicol, 0,00018...0,0022 părți dichloran, 18...22 părți agar, apă distilată până la 1000
47 părți, părțile fiind exprimate în greutate.

RO 123355 B1

| | |
|--|----|
| Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje: | 1 |
| - izolarea directă a ciupercilor microscopice din grupul <i>Aspergillus section flavi</i> din substratele naturale datorită selectivității induse de dichloran (2,6-dicloro-4-nitroanilină) și cloramfenicol; | 3 |
| - producerea sporită de aflatoxine datorită conținutului ridicat de zinc și de prolină/hidroxiprolină (compuși care stimulează exprimarea genelor implicate în biosinteza aflatoxinelor și care rezultă din metabolizarea complexului zinc-gelatin-peptonă sub acțiunea exo-proteazelor produse de ciupercile cultivate pe mediu agarizat); | 5 |
| - evidențierea rapidă a tulpinilor aflatoxigene și non-aflatoxigene prin examinare în lumină UV datorită amplificării fluorescenței naturale a aflatoxinelor; | 7 |
| - realizarea testelor de diferențiere ușor, fără a fi necesară aparatură complexă, reactivi costisitori și/sau personal cu înaltă calificare; | 9 |
| - realizarea testelor de identificare a hazardului microbiologic care generează riscul de contaminare a alimentelor cu aflatoxine (cei mai periculoși contaminanți ai alimentelor), cât și izolarea și selectarea de tulpini non-aflatoxigene utilizabile în combaterea biologică a tulpinilor aflatoxigene. | 13 |
| Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției: | 15 |
| Exemplu. Într-un flacon Erlenmayer de 500 ml gradat se introduc pe rând 0,05 g K_2HPO_4 , 0,5 g $MgSO_4$, 0,025 g complex zinc:gelatin-peptonă 1:12, 0,025 g peptonă, 0,5 g extract de drojdie, 3 g zaharoză, 0,3 g dimetil- β -ciclodextrină, 2 g agar, cântărite cu precizie analitică. Se adaugă 90 ml apă distilată. Se încălzește la fierbere până la dizolvarea completă a tuturor ingredientelor și apoi se menține pe baie de apă la 55...60°C. Peste soluția menținută la 55°C se adaugă 5 ml dintr-o soluție apoasă 0,1% de cloramfenicol (masă/volum) și 0,1 ml dintr-o soluție alcoolică (20% alcool etilic în apă, volum/volum) de 0,2% (masă/volum) dichloran. Se verifică pH-ul care trebuie să fie de $6,3 \pm 0,2$. Se corectează dacă este nevoie cu soluții de KOH 1N sau H_2SO_4 1N. Se aduce volumul final la 1000 ml, se astupă paharul Erlenmayer cu dop de vată, și apoi se autoclavează la 121°C, timp de 30 min. Mediul autoclavat se răcește și apoi se lichefiază prin încălzire pe baie de apă. Mediu lichefiat se distribuie aseptice în plăci Petri sterile de 67x15 mm, câte 6...7 ml pe placă și se așteaptă să se răcească. | 17 |
| Complexul zinc:gelatin-peptonă 1:12 utilizat în mediul de mai sus se prepară după cum urmează: 8,14 g de oxid de zinc (Sigma Aldrich de puritate farmaceutică USP) se omogenizează cu 500 ml apă distilată. În omogenat se adaugă 16,2 g de gelatin-peptonă (Laboratoarele Conda, cat. 1606) și se încălzește pe baie de apă cu reflux până la solubilizarea totală a oxidului de zinc (datorită formării complexului zinc - aminoacizi/peptide). Complexul zinc a fost considerat în mod arbitrar ca fiind 1:12, luându-se în calculul stoichiometric o valoare medie de 135 pentru masa moleculară a aminoacizilor. Chelatul zinc-gelatin-peptonă format prin procedeul de mai sus a fost uscat prin pulverizare, într-un atomizor de laborator Niro Minor Unit, la o temperatură de intrare de 140...150°C și la o temperatură de ieșire de 80...90°C. | 19 |
| Dimetil- β -ciclodextrina folosită în mediul de mai sus a provenit de la Fluka, CAS Number: 51166-71-3. | 21 |
| Plăcile Petri de mai sus se inoculează axenic cu 0,5 ml de suspensie provenită din diluția serială 10^{-2} a unei probe (de sol sau de aliment) extrase în raport de 1:10 în tampon fosfat salin. Se incubează între 3 și 7 zile la temperatura de 25...28°C după care se inspectează plăcile. Tulpinile aflatoxigene formează colonii de culoare galben-măslinie caracteristică și au o fluorescență semnificativă, iar tulpinile non-aflatoxigene prezintă culoare galben-măslinie caracteristică dar nu au fluorescență. | 23 |
| | 25 |
| | 27 |
| | 29 |
| | 31 |
| | 33 |
| | 35 |
| | 37 |
| | 39 |
| | 41 |
| | 43 |
| | 45 |
| | 47 |

RO 123355 B1

1 Mediul realizat conform invenției a fost testat față de alte tipuri de medii utilizate
2 pentru izolarea și/sau diferențierea aspergillilor aflatoxigene și non-aflatoxigene, mediul
3 Dichloran roz bengal (Aldrich, Fluka BioChemika) plus aditiv dimetil-β-ciclodextrină și mediul
4 AFPA (Oxoid). Selectivitatea mediilor a fost testată prin inocularea plăcilor Petri de diametru
5 67x15 mm cu amestecuri de suspensii de spori de *Aspergillus flavus*, *Sclerotinia*
6 *sclerotiorum*, *Drechslera turcica*, *Botrytis cinerea*, *Mucor mucedo*, *Penicillium expansum*,
7 *Fusarium graminearum*. Capacitatea acestor medii de a permite evidențierea rapidă a
8 aspergillilor a fost testată prin depunerea pe respectivele medii de cultură, în condiții
9 aseptice, a unor boabe de porumb (dezinfectate la suprafață prin scufundare în hipoclorit de
10 sodiu 1,5%, 3 min și spălare cu apă distilată sterilă), tăiate în două cu un bisturiu flambat.

11 Plăcile Petri cu diferite medii inoculate cu amestecuri de spori sau cu boabe de
12 porumb tăiate, au fost incubate 7 zile la 25°C. Diferitelor medii le-au fost acordate note care
13 au derivat din poziția lor relativă (unele comparativ cu altele) în capacitatea de diferențiere
14 a aspergillilor față de celelalte ciuperci, ca și în capacitatea lor de evidențiere a tulpinilor
15 aflatoxigene și non-aflatoxigene.

16 Mediul Dichloran roz-bengal (DRBA) folosit a provenit de la Aldrich - Fluka
17 BioChemika, avea următoarea compoziție: 1 g KH₂PO₄; 0,5g MgSO₄; 10 g glucoză; 5 g
18 peptonă; 2 mg dichloran, 25 mg roz bengal, 15 g agar, apă până la 1000 ml și un pH final
19 de 5,6±0,2. La acest mediu s-a adăugat 3 g dimetil-β-ciclodextrină.

20 Mediul AFPA (*Aspergillus flavus/A. parasiticus selective medium*) fost furnizat de
21 Oxoid și avea următoarea compoziție: 10 g peptonă; 20 g extract de drojdie; 0,5 g citrat de
22 fer și amoniu; 2 mg dichloran, 15 g agar, apă până la 1000 ml și un pH de 6,3 ±0,2.

23 Notele acordate diferitelor medii în privința selectivității pentru ciupercile toxigene din
24 grupul *Aspergillus section flavi* sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Selectivitatea mediilor de cultură testate pentru aspergilliile toxigene

| Mediu | Aprecierea selectivității ^a | | | | |
|----------|--|-----------------------|------------------|------------------------|---------------------|
| | <i>Asp/Fusarium</i> | <i>Asp/Drechslera</i> | <i>Asp/Mucor</i> | <i>Asp/Penicillium</i> | <i>Asp/Rhizopus</i> |
| DRBA | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 |
| AFPA | 1 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| cf ex. 1 | 2 | 3 | 1 | 3 | 2 |

33 ^a - Note pe o scara de la 1 la 3, prin compararea creșterii între diferitele specii de ciuperci microscopice pe fiecare
34 dintre medii.

35 Rezultatele din tabel demonstrează o selectivitate relativ egală a mediilor folosite. În
36 toate cazurile factorul major de selectivitate este dichloranul (2,6-dicloro-4-nitroanilina), un
37 fungicid care este inactiv față de ciupercile microscopice din genul *Aspergillus*. Mediile
38 DRBA și cel propus prin prezenta invenției au în plus și factori de selectivitate față de
39 bacterii (roz-bengal și cloramfenicol), iar mediul conform invenției mai este selectiv și prin
40 conținutul de zaharoză ridicat (30 g/l). Toate acestea fac ca în final mediul propus prin
41 prezenta invenției să fie mai selectiv decât mediile utilizate uzual pentru izolarea ciupercilor
42 din genul *Aspergillus*.

43 Notele acordate pentru capacitatea de diferențiere a diferitelor medii (respectiv pentru
44 ușurința identificării tulpinilor (afla)toxigene și non-(afla)toxigene) sunt prezentate în tabelul 2.
45 În acest caz este necesară o precizare: Mediul AFPA diferențiază aspergilliile (afla)toxigene

RO 123355 B1

printr-o reacție cromogenă (de chelatare a ferului) prin care este de fapt este evidențiat acidul kojic. Acest metabolic toxic al aspergilliilor toxigene chelatează fierul conținut în complexii incolori (citratură de fier) într-o reacție cromogenă (portocaliu intens), ușor de vizualizat. Deși asociat deseori cu biosinteza aflatoxinelor acidul kojic nu este un intermediar în calea metabolică a aflatoxinelor și deci evidențierea lui nu poate fi considerată decât ca eventual ca un indicator al potențialului toxigen.

Tabelul 2

Capacitatea mediilor de cultură testate pentru a diferenția aspergilliile (afla)toxigene și non-aflatoxigene

| Mediu | Capacitatea de diferențiere ^a | |
|----------|--|---------------------------|
| | Ciuperci (afla)toxigene | Ciuperci non-aflatoxigene |
| DRBA | 1 | 2 |
| AFPA | 3 | 1 |
| cf ex. 1 | 2 | 3 |

^a - Note pe o scară de la 1 la 3, prin compararea capacității de diferențiere pe fiecare dintre medii a aspergilliilor endofite în boabe de porumb

Aparent mediul AFPA are cea mai mare capacitate de diferențiere între ciupercile (afla)toxigene și non-(afla)toxigene. În conformitate cu cele de mai sus această diferențiere nu este decât un indicator al potențialului toxigen. Mediul a fost apreciat ca având o slabă capacitate de diferențiere a ciupercilor non-aflatoxigene pentru că nu conține o sursă de carbon ușor accesibilă (carbohidrați) care să susțină biosinteza aflatoxinelor (caracterul non-(afla)toxigen pus în evidență pe mediul AFPA putând să fie numai o exprimare fenotipică specifică).

Mediul DRBA conține o sursă de carbon ușor accesibilă, adaosul de dimetil- β -ciclodextrină permite identificarea aflatoxinelor, dar nu are ingrediente care să inducă cert o supraexprimare a biosintezei aflatoxinelor.

Mediul realizat conform invenției prezintă cea mai mare capacitate de diferențiere a aspergilliilor non-aflatoxigene, coloniile galben-măslinii fără fluorescență fiind cert non-aflatoxigene.

RO 123355 B1

1

Revendicare

3

Mediu de cultură pentru diferențierea ciupercilor aflatoxigene și non-aflatoxigene, **caracterizat prin aceea că** este constituit din: 0,45...0,55 părți K_2HPO_4 , 0,45...0,55 părți $MgSO_4$, 0,25...0,3 părți complex zinc:gelatin-peptonă 1:12, 0,25...0,3 părți peptonă, 0,45...0,55 părți extract de drojdie, 28...32 părți zaharoză, 2,8...3,2 părți dimetil- β -ciclodextrină, 0,048...0,052 părți cloramfenicol, 0,00018...0,0022 părți dichloran, 18...22 părți agar, apă distilată până la 1000 părți, părțile fiind exprimate în greutate.

5

7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci