

ELEMENTE DE DIAGNOSTIC DIFERENTIAL A UNOR FUNGI IZOLATI DIN PÂINE ȘI PRODUSE DE PANIFICATIE

dr. *Valentin Necula*¹, dr. *Monica Potroviță*¹,
conf.univ.dr. *Mihaela Badea*², șef lucr.dr. *Nicoleta Taus*²

¹Direcția Sanitar veterinară Brașov

²Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania Brașov

Abstract

This paper is a study on several species of fungi found in some bread and bakery products. This topic is motivated by the fact that bread is a staple food for all age groups and physiological status. The fact that in these foods can be found fungi and the limit permitted by the applicable standards determined us to perform this study.

Another aspect that was considered was the fact that some species of fungi are extremely toxic and can cause very serious problems due to both their development in the host organism, and the occurrence of visceral injuries.

Their total adverse effects on the body but also the fact that these fungi may contaminate bakery plus the fact that the bread and bakery products are consumed by all age groups was another reason that prompted us to approach this study.

Key words: allergic rhinitis, diagnosis, treatment, fungi, bakery products

1. INTRODUCERE

Fungii, cunoscuți și sub denumirea de muceți, fac parte din clasa Talophitelor.

Regnul fungi este alcătuit din organisme eucariote, având un aparat unicelular sau pluricelular, dar nediferențiat în organe vascularizare [6].

Trebuie specificat ca fungii sunt lipsiți de capacitatea de a sintetiza clorofila și de a lua parte, implicit la fotosinteză, având un mod de hrănire heterotrof, care poate fi adesea saprofit sau parazit.

Aceste organisme, sunt omniprezente, existând în acest sens o maximă în lumea microbiologilor prin care se spune că: „noi trăim în lumea micetilor și nu ei trăiesc în lumea noastră” [1, 2]. Din păcate aceasta maximă reflectă un adevăr obiectiv, mai ales că această existență nu este una pașnică. Fungii provoacă pagube economice mari prin deprecierea produselor alimentare, ale materiilor prime folosite în industria alimentară, prin îmbolnăviri ale personalului lucrător, îmbolnăviri a căror evoluție este lentă trenantă și foarte greu de diagnosticat. Deprecierea spațiilor de depozitare ale produselor alimentare este un alt aspect demn de a fi semnalat și de unde fungii, prin intermediul sporilor vehiculați cu ajutorul utilajelor sau ustensilelor, mijloacelor de

transport dar și pe calea aerului, se pot răspândii în alte spații sau pot contamina alte produse alimentare [4, 5]. Micotoxinele elaborate de fungi au un impact devastator asupra sănătății omului și animalelor. Aceste micotoxine pot produce leziuni ireversibile cu caracter distrofico-necrotic, afectând ficatul, rinichii, pancreasul, la care se adaugă leziuni de natura hemoragică sau proliferativă [3, 11].

Pătrunderea fungilor în organism se face pe cale digestivă, odată cu ingerarea alimentelor mucegăite, pe cale respiratorie, producând în acest caz leziuni pulmonare cât și pe cale transcutanată, producând dermatomicoze.

2. MATERIAL ȘI METODĂ

Pentru a determina salubritatea pâinii și produselor de panificație am utilizat examenul micologic al acestora, întrucât este parametrul cel mai reprezentativ și mai solicitat în acest scop [7].

În acest studiu noi am ales ca matrice de lucru pâine cu cartofi, pâine graham, cornuri simple, chifle simple și chifle cu susan, care au fost aduse în laborator spre analiza de diferiți agenți economici, și care au solicitat analize micologice.

Tehnica de lucru comportă o succesiune de etape bine stabilite care constau în cântărirea

probei prelevate necesară fiecărei determinări care este de 10 grame, peste care se pun 90 ml apă peptonată. Se lasă în repaus 30 minute și apoi se fac diluții seriate. Ulterior se trec în plăci pe mediu de cultură, se incubează și se citesc rezultatele. Ca mediu de cultură noi am utilizat D.D.C.A., mediu care conține dextroza, glucoza, izomerul dextrogir, cloranfenicol și agar [9, 12].

După, cinci zile de incubare se numără coloniile din fiecare placă Petri, fiind reținute acele plăci care conțin sub 150 colonii. Se trece la numărarea coloniilor din cele două plăci aferente fiecărei diluții și se identifică genurile în baza caracterelor culturale și a examenului microscopic.

Este important să arătăm că în cazul produselor care au miros de mucegai dar nu se observă coloniile la examenul organoleptic se fac și diluții mai mari cum ar fi 10^{-3} respectiv 10^{-4} [8, 10].

În acest studiu noi nu am făcut aceste diluții întrucât produsele care au constituit matricea de lucru nu prezentau modificări vizibile organoleptic, constând în aglomerări de fungi, pe suprafață sau în profunzime ori, miros de mucegai.

Pentru efectuarea preparatelor microscopice am utilizat montarea în lactofenol între lamă și lamelă.

Pentru a identifica genurile și speciile de fungi trebuie luate în considerație caracterele culturale, macroscopice dar și aspectele microscopice în urma examinării în preparate microscopice. Trebuie specificat că în precizarea speciilor de fungi, după examenele efectuate macroscopic și microscopic, rezultatele obținute, se compară cu cheile dichotomice de identificare pentru fiecare gen de fungi și care cuprind referiri la conidiofori sterigme, metule, conidii și vezicule, sub aspect microscopic dar și caractere macroscopice ale coloniilor de fungi. Având toate aceste elemente putem preciza genul și speciile fungilor.

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Redăm în tabelul 1, sortimentele examinate care au servit ca matrice de lucru, genurile și speciile de fungi identificate și valorile numărului total de fungi per gram produs, respectiv prezența fungilor în produs.

SORTIMENT	GENURI DE FUNGI	VALORI NTF/ gram produs sau prezența
Pâine cu cartofi	Penicilium expansum Aspergillus verzicolor	$7,2 \times 10^2$
Pâine graham	Aspergillus verzicolor Aspergillus niger Mucor mucedo Absidia corimbifera	$6,7 \times 10^2$
Cornuri simple	Aspergillus verzicolor Penicilium claviforme	$6,2 \times 10^2$
Chifle simple	Aspergillus flavus Penicilium claviforme Penicilium urticae	$2,9 \times 10^2$
Chifle cu susan [☼]	Aspergillus terreus Rhizopus stolonifer	$0,009 \times 10^2$

Tabelul 1 - Genurile și speciile de fungi identificate din sortimentele examinate

☼ Pentru sortimentul respectiv s-a determinat numai prezența de fungi

Pentru acest studiu noi am utilizat și materiale de referință, constând din culturi pure de fungi, păstrate în micoteca laboratorului. Speciile identificate de noi au fost comparate cu aceste culturi atât sub aspect macroscopic, cultural cât și sub aspect microscopic, la care am adăugat aspectele comparative ale cheilor dichotomice și am stabilit genul și speciile de fungi.

Prezentăm în cele ce urmează genurile și speciile de fungi identificate de noi în matricea analizată, reprezentată pe pâine și produse de panificație.

Penicilium expansum

Conidioforii sunt numeroși, dezvoltați fie izolat printr-o plăjă continuă, fie grupați în fascicule. Ei iau naștere din mediul bazal, și sunt de lungimi diferite. Peretele este fin granular. Penicilii sunt mari și alcătuiți din lanțuri conidiene „ciufulite”, sunt ramificați asimetric, lungimea ramurilor fiind variabilă, strâns lipite de axul principal (Fig.1.).

Metulele pornesc toate de la același nivel formând verticile de cate 3-6.

Sterigmele se dezvoltă în grupuri de câte 5-9. Noi am identificat la această specie un număr majoritar al sterigmelor de 7-9.

Conidiile sunt, globoase și cu peretele neted.

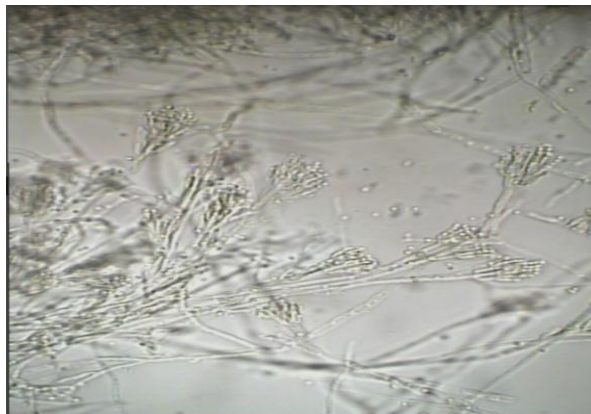


Fig.1 *Penicillium expansum*-ob.40.
montură în lactofenol-original

Penicillium claviforma

Sunt caracteristice prin producerea de coremii definite în formă de măciucă sau spatulă, dezvoltate ca o coroană în mijlocul coloniei (Fig. 2.).



Fig.2 *Penicillium claviforma*-ob.40
montură în lactofenol-original

Conidioforii sunt mari, cu pereții netezi, variat ramificați. Ei nu sunt grupați în fascicule cum este cazul la *penicillium expansum*. Se observă apariția și dezvoltarea de coremii, cu piciorul compact, fibros de culoare albă, roz sau în nuanța cărnii. Partea superioară a coremiilor este turtită sau terminată cu o manșă de structuri conidiene de formă clavată sau spatulată. Penicilii sunt foarte complicați și neregulat ramificați, asimetrici, cu elemente conidiene întrețesute ca într-un țesut palisadic.

Metulele se dezvoltă în grupuri de 2-4, fiind puternic divergente.

Sterigmele de asemenea sunt puține pe fiecare metulă, 1-5. Lanțurile de conidii sunt lungi, paralele și aderente având tendința de a se separa în coloane mari neregulate și care nu se destramă când sunt montate în lactofenol. *Conidiile* sunt eliptice, netede.

Penicillium urticae

Conidioforii sunt numeroși, dezvoltați izolat printr-o plajă continuă, dar și grupați în fascicule, prin aceasta asemănându-se cu *penicillium expansum*, luând naștere din mediul bazal, și sunt de lungimi diferite. Peretele este neted. Penicilii sunt mari și alcătuiți din lanțuri conidiene ciufulite, sunt ramificați asimetric, strâns lipite de axul principal, ca element principal de diferențiere (Fig. 3.).

Metulele pornesc toate de la același nivel formând verticile de câte 3-6.

Sterigmele se dezvoltă în grupuri de câte 5-9.

Conidiile sunt globuloase, cu peretele neted.



Fig.3 *Penicillium urticae*- ob.40,
montură în lactofenol-original

Aspergillus niger

Conidioforii sunt de două feluri: unii lungi cu perete gros în strat dublu, granulat, colorat în brun - deschis. Alții sunt mai scurți și iau naștere ca ramuri laterale ale hifelor aeriene și sunt de regulă necolorați.

Veziculele sunt globuloase complet acoperite de sterigme biseriata, acestea sunt de culoare brună, septate la maturitate; sterigmele secundare sunt mai mici.

Capetele conidiene sunt de regulă mari și negre.

Conidiile sunt globuloase uneori puțin discoidale de mărime variată. Sunt de culoare brună (Fig.4.).



Fig.4 *Aspergillus niger-ob.40*,
montură în lactofenol-original

Aspergillus flavus

Conidioforii sunt lungi, necolorați, vizibili, rugoși, drepti. Veziculele sunt puțin alungite când sunt tinere apoi devin globuloase sau subglobuloase. Capetele conidiene sunt de două feluri: unele mari, tipic radiate cu sterigme aranjate în două serii, acoperind aproape complet vezicula, iar altele mai mici acoperite numai pe treimea superioară a veziculei cu sterigme uniseriate (Fig. 5.).

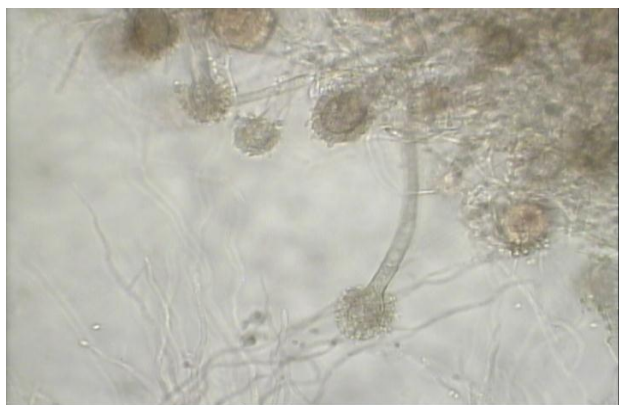


Fig.5 *Aspergillus flavus -ob.40*,
montură în lactofenol-original

Sterigmele primare din capetele conidiene sunt bine reprezentate. Conidiile sunt globuloase sau subglobuloase, foarte fin echinulate.

Aspergillus terreus

Conidioforii au aspect neted, fără granulații, cu aspect relativ uniform. Veziculele au formă de picătură de apă. Trecerea spre

conidiofor se face blând neexistând o limită netă de demarcație între aceste structuri. Ca o particularitate, în antiteză cu *Aspergillus versicolor*, sterigmele primare sunt repartizate până în treimea mijlocie a veziculei având o dispoziție sub formă de mănunchi, iar vezicula este mai alungită (Fig.6.).



Fig. 6 *Aspergillus terreus-ob.40*,
montură în lactofenol-original

Aspergillus versicolor

Conidioforii sunt netezi, iar veziculele sunt ovale. Trecerea de la conidiofor spre veziculă se face treptat imprimând veziculei, în ansamblul ei un aspect de „picătură de apă”. Sterigmele primare sunt mai dezvoltate, decât cele secundare.

Sterigmele primare acoperă vezicula până la joncțiunea cu conidioforul formând o falsă limită de demarcație. În preparatele montate în lactofenol se observă o ușoară irizație verde - albastră a porțiunii terminale la nivelul veziculei, sterigmelor și conidiilor (Fig.7.).

Ultimele sterigme, de cele mai multe ori, sunt înclinate spre conidiofor generând un aspect radiar. Conidiile sunt plasate în lanțuri scurte de 2-3 la capătul sterigmelor secundare, având formă sferică.

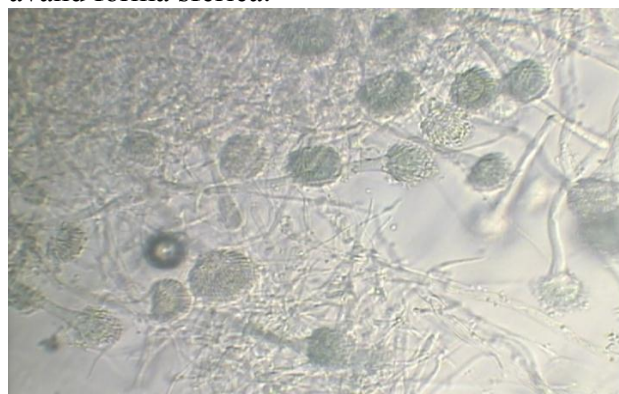


Fig.7 *Aspergillus versicolor- ob.40*
montură în lactofenol-original

Mucor mucedo

Sporangioforii drepți și rigizi, hialini, translucizi, puternici în culturile tinere, cu aspect clar, neted. Sporangii sunt lungi, situați de-a lungul miceliului au culoarea galbenă, cu timpul devin gri - gălbui. Sporangii sunt mici, și capătă o culoare brună - gălbuie. Columela este în formă ovală, înalta, ușor aplatizată, cu pereții de culoarea oțelului și un conținut de culoare galben - orange. Sporii au în mod frecvent o culoare gri gălbuie, hialin de formă cilindrică până la ovală (Fig.8.).

De remarcat faptul că sporangiul formează o veziculă sferică cu pereții dublii, net diferită de cea a genului rhizopus, care are pereții simplii, și în interiorul căreia prezintă o columela ovală. Între aceasta și peretele intern al veziculei se găsesc sporii.

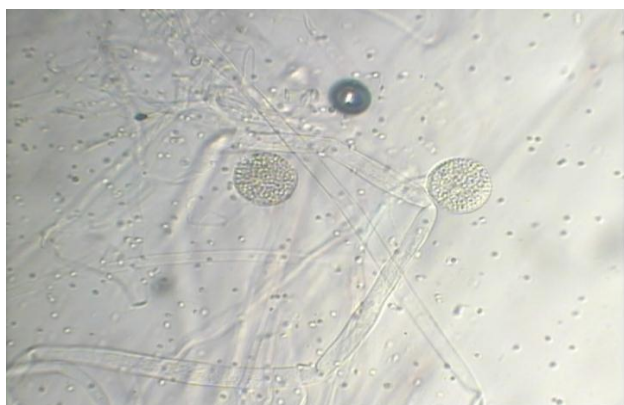


Fig.8. *Mucor mucedo*- ob.40
montură în lactofenol-original

Absidia corimbifera

Sporangii sunt în formă de pară, hialini la formele tinere, de culoare mai ales gri-albăstrui sau brun. Prezintă columele conice sau semirotunde uneori cu mici răstrângeri spre exterior. Pot prezenta și porțiuni de formă papilară cel mai adesea de culoare închisă fiind plasate pe o apofiză lungă și îngustă. La formele obișnuite, pe anumite distante există un perete transversal. Sporii sunt mici și fără particularități speciale (Fig. 9.).

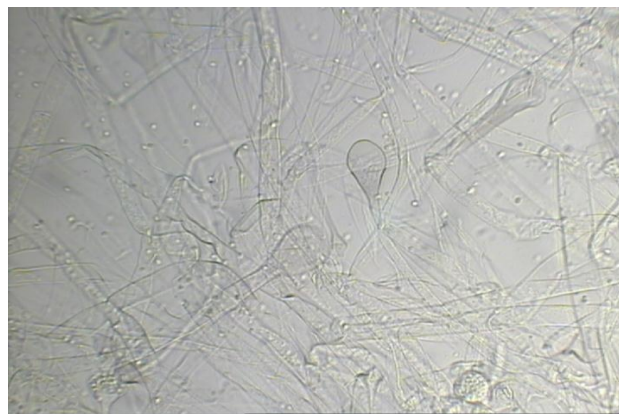


Fig. 9. *Absidia corimbifera*-ob.40,
montură în lactofenol-original

Rhizopus stolonifer

De la nivelul filamentelor pornesc rizoizi, rădăcini ramificate. Conidioforii sunt neseptați de culoare maroniu închisă, în culturile vechi și se termină cu un sporangiu cu o columelă care se lasă în jos luând aspectul unei umbrelor, când sporii se scutură (Fig.10).



Fig.10. *Rhizopus stolonifer*- ob.40,
montură în lactofenol-original

De remarcat faptul că sporangii sunt de formă ovală de culoare albă iar când culturile devin vechi (5-6 zile) aceștia se înnegresc. Columela este lată semirotundă cu o apofiză groasă în jur. Sporii sunt ovali neregulați cu aspect vărgat.

Ca element de diagnostic microscopic noi am luat în considerare prezența rizoizilor, rădăcini ramificate de culoare maron (Fig.11.).



Fig.11. *Rhizopus stolonifer-rizoid-OB.40*
-montură în lactofenol-original

Aspectul columelei care este ovală la *Mucor mucedo* și lată, semirotundă la *Rhizopus stolonifer*, fiind o altă particularitate diferențială. Aspectul veziculei este oval cu pereții simpli, de culoare maron la *Rhizopus stolonifer* și sferic, globulos, cu pereții dubli la *Mucor mucedo*. Având în vedere că sunt specii aparținând aceleiași familii, mucoraceelor, aceste elemente de diferențiere sunt deosebit de importante în stabilirea diagnosticului microscopic pentru *Rhizopus stolonifer* (Fig.12.).



Fig 12. *Rhizopus stolonifer-OB.40*
-montură în lactofenol-original

4. Concluzii

1. Fungii produc leziuni grave cu localizare hepato-renală, cerebrală și pancreatică, dar mai ales pulmonară atât prin toxinele elaborate cât și prin posibilitatea de a se dezvolta în aceste organe producând leziuni granulomatoase de tip micotic.

2. Stabilirea genului și speciei de fungi se realizează având în vedere caracterele culturale. Observațiile microscopice dar mai ales utilizarea unor chei dichotomice de identificare pentru fiecare gen.
3. *Absidia corimbifera* poate crește ca filamente răzlețe în culturile de mucedor, formând culturi mixte, în aceleași condiții, întrucât face parte împreună cu acesta din familia mucoraceelor.
4. Prezența rizoizilor este un element distinctiv pentru genul *Rhizopus*.
5. Aspectul veziculei este oval cu pereții simpli, de culoare maron la *Rhizopus stolonifer* și sferic, globulos, cu pereții dubli la *Mucor mucedo*.
6. Aspectul columelei este oval la *Mucor mucedo* și lată, semirotundă la *Rhizopus stolonifer*.
7. La genul și specia, *Aspergillus versicolor*, conidioforii sunt netezi, iar veziculele sunt ovale. Trecerea de la conidiofor spre veziculă se face treptat imprimând veziculei, în ansamblul ei un aspect de „picătură de apă”.
8. La genul și specia *Penicillium expansum*, Conidioforii sunt numeroși, dezvoltăți fie izolat printr-o plăcă continuă, fie grupați în fascicule. Iar penicilii sunt mari și alcătuiți din lanțuri conidiene „ciufulite”, fiind ramificați asimetric.

Bibliografie

- [1] Apostu S., Rotar A. - Microbiologia produselor agro-alimentare, Ed. Risoprint – 2001
- [2] Enache T., Paul I., Stănescu V., Popescu O., Iordache I - Medicină legală veterinară., Ed. All, București, 2004.
- [3] Manolescu N. – Introducere în oncologia comparată, Ed. Carol Davila, București, 2003.
- [4] Necula V., Babii M. - Alimentație, alimente și impactul acestora asupra sănătății consumatorului, Ed. Universității Transilvania, Brașov, 2010.
- [5] Necula V., Macarie G., Moisiu M., Tănăsie P. – Anatomie patologică și fiziopatologia, Ed. Ceres, București, 1998.

- [6] Novoselef M., Ursea D., Bitănescu L. - Atlas micologic, Ed. Medicală Veterinară, București, 1994
- [7] Rotaru G., Moraru C. - Analiza riscurilor, punctele critice de control, Ed. Academică, Galați, 1997
- [8] Rotaru O, Mihaiu M, Guș C. - Controlul sanitar - veterinar al produselor de origine animală, Lucrări practice Cluj-Napoca, 1994.
- [9] Rotaru O., Mihaiu M. - Igiena veterinară a produselor alimentare, Ed. Todesco, Cluj-Napoca, 2007.
- [10] Savu C., Mihai G. – Controlul sanitar veterinar al alimentelor, Ed. Ceres, București, 1997
- [11] Savu C., Suci N. – Siguranța alimentelor, riscuri și beneficii, Ed. Semne, București, 2004
- [12] Stănescu V. - Igiena și controlul alimentelor, Ed. Fundației România de mâine, București, 1998.