SZENT ISTVÁN EGYETEM

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

„Mikotoxinok biodegradációjára képes mikroorganizmusok szelekciója és alkalmazása"

Cserháti Mátyás

GÖDÖLLŐ

2013

A doktori iskola

Megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Környezettudomány

Vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika, PhD
tanszékvezető, egyetemi tanár
Szent István Egyetem,
Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar,
Környezettudományi Intézet
Talajtan és AgrokémiaTanszék

Témavezető: Dr. Kriszt Balázs, PhD
tanszékvezető, egyetemi docens
Szent István Egyetem,
Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar,
Környezet és Tájgazdálkodási Intézet
Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

....

Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés ... 7

1.1 Célkitűzések ... 8

2. Irodalmi áttekintés ... 9

2.1 Mikotoxin termelő gombák és a toxinképzés feltételei ... 9

2.2 Mikotoxinok útja az emberi szervezetben ... 13

2.3 Mikotoxinok kémiai szerkezete ... 14

2.4 Mikotoxinokra vonatkozó határértékek ... 16

2.5 A legfontosabb mikotoxinok jellemzése ... 19

2.5.1 Aflatoxinok ... 19
2.5.2 Ochratoxinok ... 20
2.5.3 Zearalenon ... 22
2.5.4 Trichotecének – T-2 toxin és a deoxinivalenol ... 23
2.5.5 Fumonizin-B1 ... 26

2.6 Mikotoxinok kimutatására alkalmazott módszerek ... 27

2.6.1 Kémiai analitika ... 27
2.6.2 Immunanalitika ... 28
2.6.3 Biológiai hatásmérés ... 28

2.7 Mikotoxinok detoxifikációjára alkalmazott módszerek ... 35

2.7.1 Mikotoxinok biodegradációja ... 37

2.8 A *Rhodococcus* nemzetség jellemzése ... 41

2.9 Egyéb vizsgálatba vont nemzetségek jellemzése ... 43

2.9.1 *Cupriavidus* nemzetség ... 43
2.9.2 *Pseudomonas* nemzetség ... 45
2.9.3 *Pseudoxanthomonas* nemzetség ... 45

3. Anyagok és módszerek ... 47

3.1 Vizsgálatba vont mikroszervezetek ... 47

3.1.1 Molekuláris taxonómiai vizsgálat ... 47
3.1.2 A vizsgált mikrobák tenyésztéséhez felhasznált táptalajok, tápoldatok ... 49

3.2 Vizsgálatba vont mikotoxinok ... 49

3.3 Mikotoxinbontási kísérletek ... 52

3.4 A HPLC mérés leírása ... 53

3.5 Az ELISA mérés leírása ... 55

3.6 Mikotoxin-detoxifikációs potenciál vizsgálata ... 57

3.6.1 SOS-Chromo teszt ... 57
3.6.2 BLYES teszt leírása ... 59

3.7 Állatetetési és állatkezelési kísérletek ... 60

3.7.1 Brojlercsirke és hal etetési kísérletek ... 60
3.7.2 Patkánykezelési modell kísérlet ... 63
3.7.3 Egérkezelési modell kísérlet ... 64

3.8 Genom projekt ... 67

3.9 Statisztikai módszerek ... 68

4. Eredmények és értékelésük ... 69

4.1 Vizsgálatba vont izolátumok identifikálása ... 69

4.2 Mikotoxin-bontási kísérletek ... 70

4.2.1 *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok mikotoxinbontó képessége ... 71

4.2.2 Egyéb nemzetségbe tartozó izolátumok mikotoxinbontó képessége ... 76

4.3 Állatetetési és állatkezelési kísérletek ... 79

4.3.1 Hal etetési teszt aflatoxin-B1 mentesítés ellenőrzésére ... 80

4.3.2 Baromfi etetési teszt ... 83

4.3.3 Patkánykezelési modell kísérlet (uterotrofikus bioassay) ... 88

4.3.4 Egérkezelési modell kísérlet (nephrotoxikus bioassay) ... 91

4.4 Genom projektek eredménye ... 97

4.4.1 Az *Rhodococcus pyridinivorans* AK37-es törzs genomja ... 97

4.4.2 A *Cupriavidus basilensis* ŐR 16 törzs genomja ... 100

5. Kutatásom során született új tudományos eredmények ... 105

6. Következtetések, javaslatok ... 107

7. Összefoglalás ... 111

8. English Summary ... 113

9. Mellékletek ... 115

1. számú melléklet: Irodalomjegyzék ... 115

2. számú melléklet: A *Rhodococcus* nemzetség tagjainál eddig leírt biodegradációs képességek és feltárt enzimek, gének ... 139

3. számú melléklet: A vizsgált baktérium törzsek faj szerinti eloszlása és jelölésük ... 140

4. számú melléklet: A *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó törzsek mikotoxinbontó képessége, %-ban kifejezve ... 141

5. számú melléklet: Nem a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok mikotoxinbontó képessége, %-ban kifejezve ... 142

10. Köszönetnyilvánítás ... 143

LEGGYAKRABBAN ELŐFORDULÓ JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADI	Acceptable daily intake (megengedhető napi bevitel)
AOAC	Association of Analytical Communities (analitikusok szövetsége)
AFB1	Aflatoxin-B1
BLYES	Bioluminescent Yeast Estrogen Screen
BLYAS	Bioluminescent Yeast Androgen Screen
CYP	Citokróm P
DON	Deoxinivalenol
EK	Európai Közösség
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat)
EPA	Environmental Protection Agency (Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala)
ERE	Estrogene Response Element (ösztrogén válasz elem)
FB1	Fumonisin-B1
FC	Fold change
GSH	Glutation
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia)
IARC	International Agency for Research on Cancer (Nemzetközi Rákkutató Ügynökség)
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change (Éghajlat-változási Kormányközi Testület)
LB	Luria-Bertani tápoldat
LD50	Lethal Dosis 50 %
NOAL	No Observed Adverse Effect Level (legnagyobb káros hatással még nem rendelkező dózis)
OTA	Ochratoxin-A
PROMEC	Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis
RQ	Relativ quantification (relativ génexpresszió)
T-2	T-2 toxin
ZEA	Zearalenon
WHO	World Health Organisation (Egészségügyi Világszervezet)
4NQO	4-nitro-quinoline-oxid

1. BEVEZETÉS

Napjainkban 1 milliárd ember éhezik, vagy szenved alultápláltság miatt a világon (2011-ben meghaladta a 7 milliárdot a teljes népesség) (TIRADO ET AL., 2010). Ezen állapot az előrejelzések szerint a jövőben súlyosbodni fog, mivel a változó időjárási rendszerek következtében nem csak a kieső és csökkenő termésmennyiséggel kell számolni (pl: 2011-2012-es aszály hazánkban), hanem számos adat azt is bizonyítja, hogy a növényeket fertőző járványok az időjárási jelenségekkel nagyon szoros kapcsolatban állnak – a változó klíma és időjárás veszélyezteti az élelmiszerbiztonságot és leginkább a fejlődő országokban okoz hatalmas problémákat (PATERSON-LIMA, 2010, 2011). E változás egyik veszélyforrása a mikotoxinok és elterjedtségük változása és az élelmiszer alapanyagoknak a jelenleginél nagyobb gyakorisággal történő szennyeződése (IPCC, 2007). A Föld átlaghőmérséklete közel 4°C-kal növekszik az előrejelzések szerint az elkövetkező 100 évben, amely az éghajlati övek eltolódását és azokon belül pedig az időjárási jelenségek átalakulását eredményezi; évszakok tűnnek el, a csapadékeloszlás kiszámíthatatlanná válik. Összességében az extrém időjárási jelenségek számának növekedése következtében a mezőgazdasági termelés szinte tervezhetetlenné és a folyamatos stresszben fejlődő növényzet a járványokra fogékonnyá válhat (IPCC, 2007).

A mikotoxinok penészgombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, melyek általában extracellulárisan találhatóak meg a penészgombákkal fertőzött anyagokon (takarmány és élelmiszer alapanyagok). A mikotoxinok valamilyen stressz faktor hatására termelődnek, ami lehet hő, vízhiány, pH eltolódás, konkurens gombák megjelenése, stb.

A mikotoxinokra jellemző, hogy az élőlényekre káros hatással vannak, azaz toxikusak. Ez a tulajdonságuk több módon is jelentkezhet: citotoxicitás, karcinogenitás, genotoxicitás, mutagenitás, endokrin rendszert zavaró hatás. A társadalom már régóta küzd a különböző mikotoxinokat termelő gombák ellen, több-kevesebb sikerrel. A klímaváltozás következtében az extrém időjárási viszonyok az eddigi stabil termelési rendszereket is felülírják, aminek következtében a mezőgazdaság által termelt alapanyagok jelentős mértékben fertőződhetnek penészgombákkal, valamint szennyeződhetnek az általuk kiválasztott mikotoxinokkal. Hazánkban az eddig leggyakoribb mikotoxin szennyeződéseket a zearalenon, fumonizin, deoxivinalenol, ochratoxin-A és T-2 toxinok okozták; azonban az időjárási körülmények megváltozásával olyan mikotoxinok is megjelentek, mint az aflatoxinok, amik eddig hazánkban nem voltak jellemzőek (DOBOLYI ET AL., 2011, VARGA ET AL., 2007).

A mikotoxinok ártalmatlanítására számos fizikai, kémiai vagy biológiai módszer is ismert, közülük egyre nagyobb érdeklődés övezi a biodegradációs eljárásokat, amelyek során

mikroorganizmusok vagy enzimek segítségével történik a lebontás. A mikotoxinok bontása azonban nem jár minden esetben a káros biológiai hatás megszűnésével, biodetoxifikációval. Az élelmiszer- és takarmánybiztonsági előírások ennek következtében egyre nagyobb figyelmet fordítanak arra, hogy a mikotoxinok eltávolítására alkalmazott különböző ágensek hatékonyságát megfelelő toxikológiai tesztekkel is értékeljék, különös tekintettel a képződő metabolitokra. Több mikotoxin esetében sikerült hatásos módszert kifejleszteni, sőt ma már kereskedelmi forgalomban kapható takarmány-adalékanyagokat is be lehet szerezni a zearalenon és ochratoxin esetében.

1.1 Célkitűzések

Kutatásom során a mikotoxin szennyeződések ártalmatlanítására, esetleges mérséklésére próbáltam megoldást találni aromás szénhidrogéneket bontani képes mikrobák alkalmazásával. A mikotoxinok jelentős része szintén aromás szénvázzal rendelkezik, így a rendelkezésemre álló különböző szénhidrogéneket jól bontó mikrobák mikotoxin-degradációra történő tesztelése kézenfekvőnek tűnt.

A kutatásom során célom volt:

1) mikotoxinok degradációjára képes mikroorganizmusok izolálása, azonosítása
2) a mikotoxinok detoxifikációjának igazolása,
3) az egyes mikotoxinok degradációjáért felelős enzimek/enzimrendszerek feltárása
4) és a már izolált mikroorganizmusok gyakorlati használhatóságának vizsgálata.

A doktori értekezésben bemutatott eredmények és tézisek saját laboratóriumi, valamint kollaborációs munkákon, továbbá szolgáltatásként megrendelt vizsgálatokon és méréseken alapulnak, az eredmények összevetéséhez pedig az összegyűjtött és értékelt, hivatkozott szakirodalom szolgált alapul.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Mikotoxin termelő gombák és a toxinképzés feltételei

A mikroszkopikus gombák szerepe a szerves anyagok lebontásában nélkülözhetetlen. A természetben szinte minden éghajlati körülmények között nagy számban fordulnak elő. A felvett szerves tápanyagokból a növekedésük, szaporodásuk folyamán a gombatest alkotóelemeit állítják elő. A gombatest építőanyagai mellet, azonban úgynevezett másodlagos anyagcseretermékeket is termelnek, melyek bonyolult kémiai szerkezetű anyagok, a gombatest felépítésében nem játszanak szerepet, azonban jelentős részük biológiai aktivitással rendelkezik. Ezen toxikus biológiai aktivitással rendelkező anyagokat nevezzük mikotoxinoknak. Az általuk okozott megbetegedést mikotoxikózisnak hívjuk, melyet elsősorban a penészgombák által termelt mikotoxinok okoznak. Humán vonatkozásban jelentős fiziológiai, illetve patológiás hatással rendelkeznek, és a haszonállatokra pedig általában a táplálékkal bejutva fejtik ki hatásukat. A magasabb rendű eukarióta élőlényekre gyakorolt hatás mellett az alacsonyabb rendű élőlényekre (alga, egysejtű, gomba, prokarióta stb.) gyakorolt hatásuk is számottevő. A másodlagos anyagcseretermékeket, akár a primer anyagcseretermékekkel párhuzamosan is termelhetnek, de leggyakrabban akkor indukálódik a sejtekben, mikor a gomba valamilyen stresszhelyzetbe kerül és a növekedéséhez, fejlődéséhez optimális körülmények megváltoznak. Mind a termelés (szántóföldi), mind a raktározás során fertőződhetnek penészgombákkal az élelmiszer alapanyagok. A gombák a szennyezett takarmányban elszaporodhatnak, majd a kedvezőtlen környezeti hatásokra (hőmérséklet, páratartalom, pH, gazdanövény állapota, egyéb faktorok) mikotoxin termeléssel válaszolhatnak. Ennek következtében a penészgombákkal fertőzött és mikotoxinokkal szennyezett alapanyagok felhasználása veszélyes az emberre és annak táplálékául szolgáló haszonállatokra nézve egyaránt (RAFAI, 2003; MÉZES, 2009).

A kalapos gombák előfordulása a takarmányozásban elhanyagolható, az élesztőgombákról pedig több száz törzs vizsgálata alapján tudjuk, hogy nem termelnek toxikus metabolitokat.

Közel 1000 mikotoxin ismert jelenleg, valamint több 100 gombafaj, amik termelhetik a különféle mikotoxinokat. Az egyes gombanemzetségen belüli fajok is termelhetnek eltérő kémiai szerkezetű toxinokat, továbbá taxonómiailag távol álló fajok is termelhetnek azonos toxinok. Ennek következtében többféle csoportosítás lehetséges:

1. A mikotoxinok bioszintézisének prekurzorai alapján történő csoportosítás (SMITH és MOSS, 1985). Ez a csoportosítás azonban jelenleg nem teljes körű, hiszen számos mikotoxin bioszintézisének útja még nem ismert. A mikotoxinok egy része az acetil-KoA és a malonil-KoA kondenzációjából vezethető le. Az aminosavakból származtatható toxinok csoportja heterogén, mivel N-heterociklikus vegyületeket és ciklikus polipeptideket is tartalmaznak.
2. A toxinok kémiai szerkezetéből adódó rokonság alapján való csoportosítás; furano-kumarin származékok (pl. aflatoxinok); trichotecénvázasok (pl. *Fusarium* penészek által termelt toxinok).
3. Farmakológiai *hatás* alapján történő csoportosítás; ebben az esetben átfedések lehetnek mikotoxinok között, mivel egy adott mikotoxinnak többféle hatása is lehet. (KOVÁCS, 2001; RAFAI 2003)
4. Egy régebbi csoportosítási mód a penészgombák előfordulását veszi alapul, azonban ez a csoportosítás mai ismereteink alapján már nem képez éles határokat a különböző penészgombák és az általuk termelt mikotoxinok besorolása között.

A szántóföldi-raktári penész csoportosítás (2.1 táblázat) azon alapszik, hogy a takarmánynövények nedvességtartalma a betakarítással egyidejűleg jelentősen lecsökken. Annak ellenére, hogy a mindkét csoportba tartozó gombák a szántóföldön, a talajban és a raktárakban is megtalálhatók, az elszaporodásukhoz a megfelelő feltételeket az egyik csak a vegetációs periódusban, a másik pedig a tárolás során is megtalálja. A toxintermelő gombák közül azokat, amelyek szaporodásukhoz magasabb nedvességtartalmat (20% fölött) igényelnek, szántóföldi penészeknek nevezzük. Rendszerint még a vetésterületen károsítják a növényeket. A szántóföldi gombák szaporító képletei a légmozgás hatására könnyedén szállítódnak és a levegő állandó képleteiként tekinthetünk rájuk (RAFAI, 2003), azokat pedig, amelyek ennél alacsonyabb víztartalom mellett is képesek szaporodni, raktári penészeknek nevezzük. A szántóföldön történő raktári penészgomba fertőzés veszélye minimális, de talajlakó életformájuknak köszönhetően a spóráik a légmozgással, mind a lábonálló növényeket, mind a raktározott terményt fertőzheti. A legkisebb relatív nedvességtartalom mellett (14%) az *Aspergillus sp.*, ennél valamivel magasabb páratartalom mellett (~16%) a *Penicillium* fajok fertőznek, 20% felett pedig a *Mucor* félék (MÉZES, 1997).

Természetesen ezt a csoportosítást sem lehet mereven alkalmazni, mert pl. a *Fusarium* fajok – amennyiben túlélik a betakarítást és a tárolást – a raktározás során is képesek tovább szaporodni. Ezen képesség alapján már nem nevezhető élesnek a szántóföldi és raktári penészek közötti határvonal. A világgazdasági folyamatok (globalizáció) és a klímaváltozás következtében a legkülönfélébb penészgombák és az általuk termelt toxinok fordulnak elő

olyan helyeken, ahol eddigi előfordulásuk nem volt regisztrálva, vagy nem várták a megjelenését ennek a problémának (DOBOLYI ET AL., 2011).

2.1. sz. táblázat: A szántóföldi-raktári penészgombák és az általuk termelt mikotoxinok

Előfordulás (nem kötött csoportosítás)	**Penészgomba fajok**	**Termelt toxinok**
Raktári penészek	*Aspergillus* és *Penicillium*	ochratoxin-A, citrinin, patulin, rubratoxin-B
Szántóföldi penészek	*Fusarium, Claviceps, Alternaria, Stachybotrys*	zearalenon, trichotecének, fumonizinek

A gomba szaporodása, a nagy micéliumtömeg, tehát maga a gomba-szennyezettség nem jelent feltétlenül toxinképzést is (VARGA ET AL., 2000). A toxintermelés több tényezőtől függ:

A mikotoxinok biológiai szempontból igen sokfélék, hiszen egyazon mikotoxint számos egymással nem rokon gombafaj is képes termelni (pl. az ochratoxinokat egyes *Aspergillus* és *Penicillium* fajok, vagy a fumonizineket egyes *Alternaria, Aspergillus, Fusarium* és *Tolypocladium* fajok), egy adott faj azonban termelhet többféle mikotoxint is (pl. *A. niger* ochratoxinokat és fumonizineket, *A. flavus* aflatoxinokat és kojisavat) (2.2 táblázat).

A mikotoxinok bioszintézisét számos toxin esetében vizsgálták. A legtöbb mikotoxin bioszintézisének génjei klaszterekben helyezkednek el (pl. aflatoxinok, trichotecének, ergot alkaloidok, fumonizinek). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy ezek a gének egységként, horizontális géntranszfer révén átadódhatnak más fajokba. Ez magyarázhatja azt, hogy egyes mikotoxinokat számos, egymással nem rokon gombafaj is termelhet (pl. aflatoxint az *A. flavus* és rokonai mellett *A. ruber, A. ochraceoroseus* és *Emericella*; ochratoxi-A-t mind *Penicillium*, mind *Aspergillus* fajok termelnek) (VARGA ET AL., 2002).

Több százra tehető az eddig meghatározott gombatoxinok száma, közülük azonban viszonylag csak kevésnek van nagyobb gyakorlati jelentősége. (RAFAI , 2003; MÉZES , 2009).

2.2. sz. táblázat: A leggyakoribb mikotoxinokat termelő penészgombák (Mézes, 2009 nyomán)

Penészgomba nemzetség	Penészgomba fajok	Mikotoxin(ok)
Aspergillus	*A. flavus*	aflatoxin-B1, B2, G1, G2
	A. parasiticus	ochratoxin-A
	A. nominus	patulin
	A. flavus	ciklopiazonsav
	A. versicolor	
Fusarium	*F. verticilloides*	Fusarium B1, B2, B3
	F. moniliforme	
	F. proliferatum	
	F. graminearum	trichothecén vázasok:
	F. avanaceum	T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol,
	F. culmorum	DON
	F. poae	
	F. equiseti	
	F. acuminatum	
	F. sambucinium	
	F. sporotrichoides	
	F. graminearum	zearalenon
	F. culmorum	
	F. sporotrichoides	
Penicillum	*P. verrucosum*	ochratoxin-A
	P. viridicatum	
	P. citrinum	citrinin
	P. verrucosum	
	P. roqueforti	roquefortin, PR toxin
	P. cyclopium	ciklopiazonsav
	P. camamberti	
	P. expansum	patulin
	P. claviformae	
	P. roqueforti	
Stachybotrys	*S. chartarum*	trichothecén vázasok
Alternaria	*A. alternata*	alternariol, alternariol-metil-éter, altenuen, tenuazon-sav

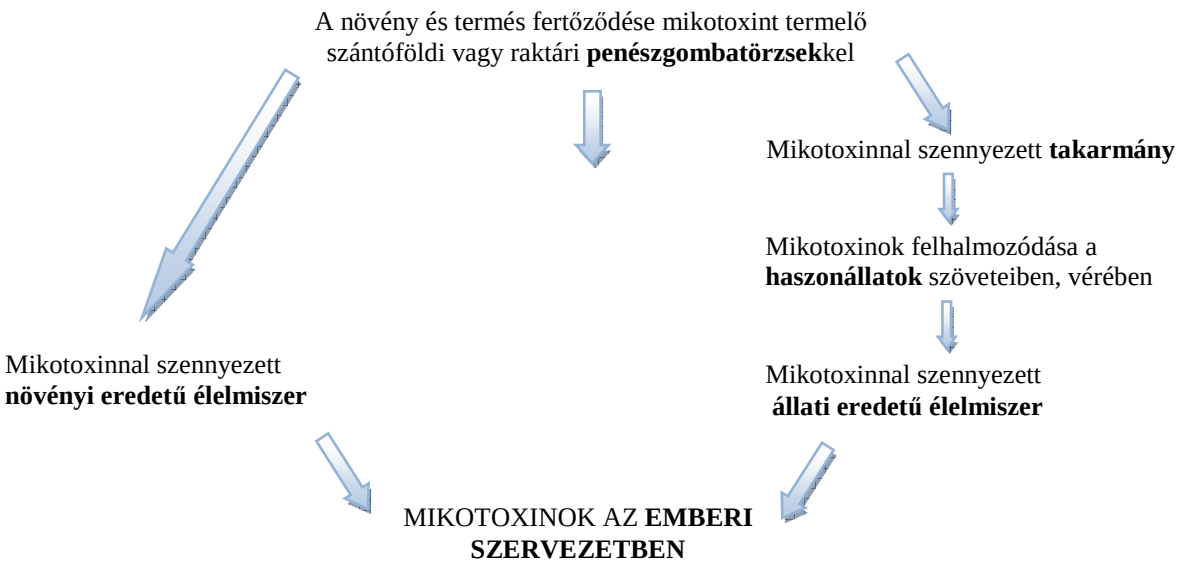
A gomba szaporodásához a kellő vízaktivitás mellett megfelelő tápközegre, oxigénre és meghatározott hőmérsékletre van szükség. A szaporodás és a toxintermelés optimális feltételei rendszerint nem azonosak. Jelentős eltérés főleg a hőmérséklet iránti igényben mutatkozik. Egyes toxinok (aflatoxinok) esetében magas, más toxinoknál (egyes *Fusarium* toxinok) alacsony, néha fagypont körüli hőmérséklet szükséges a termelődésükhöz (KOVÁCS, 2001).

2.2 Mikotoxinok útja az emberi szervezetben

A mikotoxinok útját az emberi szervezetben 2.1. ábra mutatja be. Az ember ezen másodlagos anyagcseretermékekkel, a mikotoxinokkal, főleg a táplálkozás és a táplálkozás alapanyagául szolgáló növényi és állati részekkel történő érintkezés és azok elfogyasztása során kerül kapcsolatba. Egyik leginkább kiemelt veszélyterület a gabonafélék és takarmány-alapanyagok. A szervezetbe került mikotoxin az emésztési folyamatoknak is nagymértékben ellenáll.

A toxinok jelentős része áthalad a bélcsatornán és a bélsárral kiürül. A bélbaktériumok hatására azonban egyes mikotoxinok, így például a DON részben detoxifikálódik, míg egyes emésztőenzimek (peptidázok) hatására az ochratoxin-A metabolizálódhat. A felszívódás a vékonybélből történik, majd a toxin egy része a májon és az epén keresztül, részben konjugált formában, ismét visszajut a bélcsőbe, és a májból csak a másik – rendszerint a kisebb – része kerül a vérkeringésbe, ahonnan a tejjel és a vizelettel kiürül a szervezetből. Emiatt a máj mellett a tejmirigy és a vese is koncentrálja a mikotoxinokat, ezért ezekben a szervekben reziduum-képződéssel itt számolhatunk. Az izomzatban csak a keringésben lévő mikotoxinok akkumulálódnak, általában csak kisebb mennyiségben (KOVÁCS, 2001).

A szervezetben kerülve a mikotoxinok metabolizációs folyamaton mennek keresztül. Ez a transzformációs folyamat lehet közömbösítés, oxidáció, redukció, bontás, szintézis. Előfordul, hogy a metabolizáció során toxikusabb vegyület keletkezik, mint a kiindulási mikotoxin, ezt toxikus metabolizációnak nevezzük, pl. zearalenonból az α-zearalenol keletkezése.



2.1. sz. ábra: Mikotoxinok lehetséges útja az emberi szervezetig (Kovács, 2001)

2.3 Mikotoxinok kémiai szerkezete

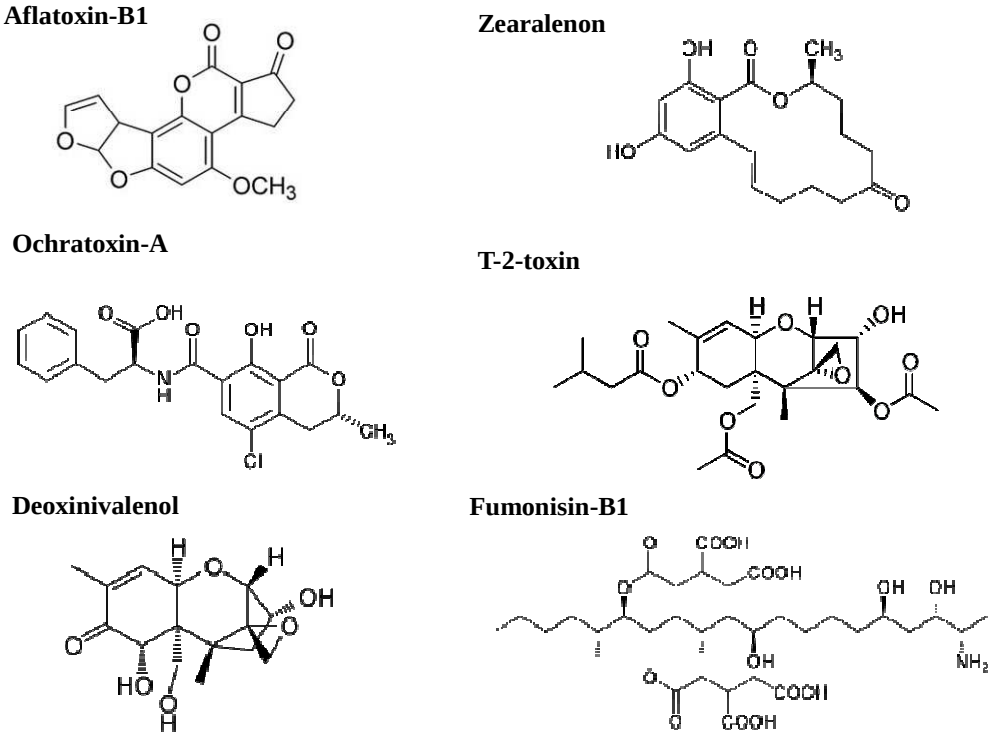
A gazdaságilag jelentős károkat okozó mikotoxinok túlnyomó többsége aromás szerkezetű vázat tartalmaz (2.2 sz. ábra). Kémiai szerkezetüket tekintve az aflatoxinok hőstabil furano-kumarin származékok. Az ochratoxinok a dikumarin-fenil-alaninok közé tartoznak, kémiai szerkezetüket tekintve α-fenilalaninhoz amidkötéssel kapcsolódó dihidro-izokumarin származékok. Legfontosabb képviselőjük az ochratoxin-A, amely az L-fenilalaninhoz peptidkötéssel kapcsolódó hidroxikumarin-karbonsav-származék, mely klór atomot tartalmaz, fehérjékhez kapcsolódva felhalmozódik a vesében, májban, izmokban, elsősorban vesekárosodást okoz. Az ochratoxin-B és észterei nem tartalmaznak klór atomot. Az ochratoxinok közepesen stabil molekulák, melyeket a legtöbb élelmiszer feldolgozási folyamat nem károsít, mint pl. a sütést és a főzést.

A *Fusarium* fajok által termelt trichotecénvázas mikotoxinok közé tartoznak többek között a deoxinivalenol (DON), nivalenol, T-2 toxin (T-2), diacetoxiscirpenol és a moniliformin, továbbá ezek metabolitjai (STEYN, 1995; LACZAY, 2004). Ezen toxinok közül némelyek szorosan összetartoznak, és a trichotecének csoportját alkotják, amelyek kémiailag szeszkviterpének és besorolhatóak az „A”, „B”, „C” és „D” trichotecének alcsoportjába. Ez több mint 50 kémiailag rokon vegyületet jelent, amelyeket kémiai struktúrájuk alapján két fő csoportra lehet osztani. Mindegyik a trichotecénvázas fusariotoxinok csoportjába tartozó természetben előforduló mikotoxin tartalmaz egy tizenöt szénatomból álló láncon egy epoxid gyűrűt, egy olefinkötést a 9. és a 10. szénatom között és egy epoxi gyököt a 12. és a 13.

szénatomnál. Ez utóbbi alapján nevezik ezeket a vegyületeket 12,13- epoxitrichotecéneknek (APSIMON ET AL., 1990).

Egy másik szintén *Fusarium* toxint, a zearalenont a poliaromás rezorcilin laktonsavak közé sorolják.

Fontos kivétel az egyik legveszélyesebb mikotoxin család: a fumonizinek, melyek nem tartalmaznak aromás szerkezetet, a diészterezett amino-polihidroxialkil vegyületekhez sorolják őket. A toxin molekula alapvázához kapcsolódó oldallánc felépítése határozza meg legnagyobb mértékben a toxicitást. A molekulaszerkezetet tekintve a fumonizinek egy húszatomos, nyíltláncú szénvázból épülnek fel, ezen a láncon három hidroxilcsoport, két trikarballilsav-csoport (TCA) és egy aktív aminocsoport helyezkedik el. A TCA-csoportok lúgos hidrolízissel részlegesen vagy teljesen eltávolíthatók (MARAGOS, 1997).



2.2. sz. ábra: A gazdaságilag jelentős károkat okozó mikotoxinok kémiai szerkezete (HTTP4)

2.4 Mikotoxinokra vonatkozó határértékek

A mikroszkópikus gombák és a mikotoxinok jelenléte nem hárítható el maradéktalanul. A mikotoxinokra vonatkozó határértékek esetében különbséget kell tenni:

- az emberi fogyasztásra szánt élelmiszerekre vonatkozó határértékek
- és a takarmányozásra szánt alapanyagokra vonatkozó határértékek között

A disszertációmban a takarmányokra vonatkozó határértékekkel foglalkozom bővebben. A mikotoxin azon mennyiségét, amely állategészségügyi szempontból még elfogadható mértékben fordul elő a takarmányokban, és még lehetővé teszi azok feletetését, számításba véve a gazdasági, technológiai, jogszabályi és társadalmi tényezőket, a határérték fejezi ki.

A határérték megállapítása toxikológiai állatkísérletekből indul ki, amelyek feltételeit – mint pl. az állatfajokat, az állatok számát, korát, nemét, az adagolás módját, a megfigyelésre kerülő paramétereket, az értékelés módját, stb. – nemzetközi megállapodások rögzítik. Meg kell állapítani elsősorban az adott toxinnak azt a szintjét, amely huzamos fogyasztás mellett sem okoz káros elváltozást (NOAEL érték = No Observed Adverse Effect Level). Ezen adatokból – az ember esetleges nagyobb érzékenységére, sőt a gyermekek és érzékenyebb egyének fogyasztási lehetőségeire való tekintettel – számítják ki a megengedhető napi mennyiséget (acceptable daily intake, ADI mg/kg testtömeg/nap). Az egy-egy élelmiszerre vonatkozó határértéket az ADI-értékekből számítják ki, az élelmiszer fogyasztásának gyakoriságát és átlagos napi fogyasztását figyelembe véve.

Magyarországon a mikotoxinok maximális szintjét élelmiszerekben a 7/1999. VI. 16. EüM rendeletének 4. számú melléklete (módosítás: 9/2003 EszCsM rendelet) szabályozza, míg a takarmányozásban alkalmazott teljes értékű takarmánykeverékekre az egyes állatfajokra vonatkozóan a mikotoxin koncentrációjára a Magyar Takarmány Kódex (2004) ad ajánlásokat. Az Európai Unióba történt csatlakozásunkat követően az EK bizottságának (Európai Közösség) ajánlása a mérvadó a határértékek megítélésében. Konkrét szabályozás azonban csak az aflatoxinokra létezik jelenleg: az Európai Uniós szabályozást (2002/32/EK) a magyar jogrend átvette, amelyet a 44/2003 FVM rendelet, 2. melléklete - módosítva 20/2004 FVM rendelet tartalmazza (módosítva a 20/2004 FVM rendelet alapján).

A DON, OTA és ZEA toxin esetében a hazai jogszabályi és hatósági esetekben a 2006/576/EK bizottság ajánlása a mérvadó. A T-2 és HT-2 toxin esetében nincs sem hazai, sem az EU által előírt határérték ajánlás, mivel jelenleg folyik a határértékeket rendező EU-s

rendelet véglegesítése. A **T-2** esetében **0,5 mg/kg takarmány** az elfogadott, mérvadó határérték, amelyre Ericson és Peterson 2004-ben publikált cikkét idézik a leggyakrabban, valamint hazai viszonylatban a korábban említett takarmánykódex ad eligazítást. A 2.3. számú táblázat a takarmányokra vonatkozó érvényben lévő aflatoxin határértékeket mutatja be. A Bizottsági ajánlásban szereplő mikotoxinokra vonatkozó (hazai) határértékek a 2.4. számú táblázatban mutatom be. A határértékekre vonatkozó nemzetközi előírások eltérőek, az exportigények miatt a mérési tartományok a hazai és nemzetközi határértékek figyelembe vételével kerültek kialakításra.

2.3. sz. táblázat: Takarmányokban az aflatoxin-B1 ajánlati szint a 44/2003 FVM rendelet, 2. mellékletébe foglalt nemkívánatos termékek szerint (módosítva 20/2004 FVM rendelettel)

Mikotoxin	Takarmányozásra szánt termékek	Maximális megengedett mennyiség mg/kg-ban (ppm) (12%-os nedvesség-tartalom mellett)
Aflatoxin-B1	Összes takarmány-alapanyag	0,02
	Teljes értékű szarvasmarha-, juh- és kecske-takarmány,	0,02
	kivéve:	
	- tejhasznosítású állatok teljes értékű takarmánya	0,005
	- teljes értékű borjú- és bárány-takarmány	0,01
	Teljes értékű sertés- és baromfi-takarmány (növendékek kivételével)	0,02
	Egyéb teljes értékű takarmány	0,01
	Szarvasmarha, juh és kecske kiegészítő takarmány (kivéve tejhasznosítású állatok, borjak és bárányok kiegészítő takarmányait)	0,02
	Sertés és baromfi kiegészítő takarmányok (növendékek kivételével)	0,02
	Egyéb kiegészítő takarmányok	0,005

2.4. sz. táblázat: A 2006/576/EK bizottsági ajánlás a DON, a ZEA, az OTA, a T-2, a HT-2 és a fumonizinek állati takarmányozásra szánt termékekben való előfordulásáról

Mikotoxin	Takarmányozásra szánt termék	Irányérték mg/kg-ban (ppm), 12 %-os nedvességtartalmú takarmányra vonatkozóan
Deoxiynivalenol	Takarmány-alapanyag	
	gabonafélék és gabonakészítmények (**), kivéve a kukorica melléktermékeket	8
	kukorica melléktermékek	12
	Kiegészítő és teljes értékű takarmányok, kivéve:	5
	- sertéseknek szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	0,9
	-borjaknak (< 4 hónap), bárányoknak és gidáknak szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	2
Zearalenon	Takarmány-alapanyag	
	gabonafélék és gabonakészítmények (**), kivéve a kukorica melléktermékeket	2
	kukorica melléktermékek	3
	Kiegészítő és teljes értékű takarmányok	
	malacoknak és kocasüldőknek (fiatal emsék) szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	0,1
	tenyészkocáknak és hízósertéseknek szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	0,25
	borjaknak, tejelő marháknak, juhoknak (beleértve a bárányokat) és kecskéknek (beleértve a gidákat) szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	0,5
Ochratoxin-A	Takarmány-alapanyag	
	gabonafélék és gabonakészítmények	0,25
	kiegészítő és teljes értékű takarmányok	
	sertéseknek szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	0,05
	baromfiknak szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	0,1
Fumonizin B1 + B2	Takarmány-alapanyag	
	kukoricafélék és kukoricakészítmények	60
	Az alábbiaknak szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	
	-sertések, lovak (lófélék), nyulak, kedvtelésből tartott állatok	5
	halak	10
	baromfi, borjak (< 4 hónap), bárányok és gidák	20
	felnőtt kérődzők (> 4 hónap) és vidra	50

2.5 A legfontosabb mikotoxinok jellemzése

2.5.1 Aflatoxinok

Jelenlegi ismereteink alapján csak az *Aspergillus* nemzetség tagjai termelnek aflatoxinokat. Elsősorban az *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* fajok. Legjelentősebbek az aflatoxinB1, B2, G1, G2, amelyek nevüket a vékonyréteg kromatogramon UV fényben látható foltok színe alapján kapták, blue (kék) és green (zöld). Az *A. flavus* B1, B2, az *A. parasiticus* B1, B2, G1, G2 toxint termelik. A leggyakrabban és a legnagyobb mennyiségben az AFB1 fordul elő a növényi terményekben, a toxikológiai adatok zöme is az AFB1-re vonatkozik. A B2, G1, G2 toxinok gyakorlatilag nem találhatóak az AFB1 nélkül, az összes aflatoxin szint 50-70%-át az AFB1 teszi ki (WHO, 1998). Az aflatoxinnal szennyezett takarmányt fogyasztó emlősök tejében (szarvasmarha, juh, kecske) az AFM1 és M2 (milk) hidroxilált metabolitok jelennek meg. Az aflatoxinok stabil molekulák, főzésnek, mikrohullámú kezelésnek ellenállnak, az UV fény hatására viszont bomlanak. Az AFM1 koncentráció pasztőrözéskor nem változik (MACDONALD ÉS CASTLE, 1996).

Az *Aspergillus flavus* aflatoxin termelő törzsei a világon szinte mindenhol megtalálhatóak, jelen vannak a talajban, a levegőben. Mind a szántóföldön, mind a raktári körülmények között képesek megfertőzni a terményt. Magyarországon a klimatikus viszonyoknak köszönhetően a hazai élelmiszerek esetében aflatoxin szennyezettséggel napjainkig nem kellett számolni. Azonban sajnálatos módon a klimatikus változások következtében már több helyről jeleztek magas aflatoxin tartalmú Magyarországon termelt gabonát, sőt több esetben mutattak ki nagy aflatoxin termelő képességgel rendelkező élőnövényről izolált *Aspergillus* törzseket az utóbbi években (DOBOLYI ET AL., 2011).

Az aflatoxinok metabolizmusa és egészségkárosító hatása

Az aflatoxinok erős mérgek: LD50 értékük állatfajonként változó 0,3-20 µg/testtömeg kg (KOVÁCS, 2004). Akut toxikus hatásuk minden tanulmányozott állatfajban a máj nekrózisával jellemezhető, hosszabb expozíciós idő után kis dózisok fogyasztása esetén is májkárosító, genotoxikus és immunszupresszív hatásúak. Májtumor előfordulását növelő hatását valószínűsítik epidemiológiai vizsgálatok Afrikában, Indiában, Délkelet-Ázsiában (BÍRÓ, 1999). Az IARC (International Agency for Research on Cancer) az aflatoxin csoportot, kiemelten az AFB1 típust humán 1A rákkeltőnek minősítette, míg a többi aflatoxint és azok metabolitjait 1B, azaz potenciálisan rákkeltő besorolást kaptak (ZINEDINE ET AL., 2007A).

Ahhoz, hogy a felvett AFB1 genotoxikus hatást tudjon gyakorolni egy szervezetre, át kell alakulnia reaktív epoxiddá. Ezt az átalakítást a mono-oxigenáz enzim rendszerhez tartozó citokróm P450 enzimcsalád végzi. Ezek az enzimek a szervezetbe került idegen anyagok I. fázisú metabolikus folyamataiban játszanak szerepet. A májban történik az AFB1 aktiválása, a monooxigenázok által AFB1-8,9-epoxiddá oxidálódik, amelynek két izomere van, az exo és az endo forma. Az exo izomer kialakulását a CYP3A4 citokróm oxidáz enzim végzi. Hatására oxirán-származékot képez, egy oxigénatom kapcsolódik a 8. és 9. számú szénatomra. A létrejött AFB1-8,9-exo-epoxid molekula nagy affinitással kötődik a nukleinsavak guanin bázisához kovalens kötéssel, így AFB1-N7-guanint formálva. Ez a kötődés guanin-timin báziscserét, mutációt, DNS és RNS károsodást okozhat. A szervezetben zajló metabolizációs folyamatok második fázisának nagy szerepe van az AFB1-8,9-exo-epoxid DNS-hez való kötődésének megakadályozásában. A konjugációs kapcsolatot az epoxiddal a glutation-S-transzferázok képesek kialakítani. A kapcsolat eredményeként AFB1-GSH-konjugátum jön létre, amely már nem képes a szervezet molekuláival reakcióba lépni, és amit a szervezet a kiválasztó folyamatai révén az epén és részben a vesén keresztül a vizelettel kiürít (WANG ÉS GROOPMAN, 1999; BEDARD ÉS MASSEY, 2006).

2.5.2 Ochratoxinok

1965-ben a penészgombák másodlagos anyagcseretermékeinek szisztematikus vizsgálata során *Aspergillus ochraceus* szűrletéből erősen nefrotoxikus és hepatotoxikus vegyületeket izoláltak, amelyeket ochratoxinoknak neveztek el (RAPER ÉS FENNELL, 1965).

Az ochratoxinokat elsősorban az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok termelik. Az ochratoxin-termelő fajok közül a hideg klímájú régiókban a leggyakoribbak a *Penicillium* fajok, míg a meleg és trópusi éghajlaton az *Aspergillus* fajok a főbb termelők. Az *Aspergillus* izolátumok általában mind OTA-t (ochratoxin-A), mind OTB-t (ochratoxin-B), míg a *Penicillium* fajok csak OTA-t termelnek. Nagy mennyiségben OTA-termelő *Aspergillus* fajok (*Circumdati* szekció) az *A. cretensis, A. flocculosus, A. pseudoelegans, A. roseoglobulosus, A. westerdijkiae, A. sulphureus* és *Neopetromyces muricatus* (FRISVAD ET AL., 2004). A legfontosabb OTA-termelő fajok, melyek potenciálisan szennyezhetik a kávét, rizst, italokat és élelmiszereket: *A. ochraceus, A. westerdijkiae* és *A. steynii*. Másik fontos OTA-termelő csoport a fekete *Aspergillus* fajok (*Nigri* szekció), ebben a szekcióban a legfontosabb OTA-termelő faj az *A. carbonarius*, mely nem termel ochratoxin-B-t, ellentétben az *A. niger*-rel mely mind OTA-t, mind OTB-t termel. Amíg a legtöbb *A. carbonarius* OTA-termelőnek bizonyult, addig az *A. niger* törzsek 5-15%-a termel OTA-t. Ezen kívül még két fekete

Aspergillus faj, az *A. lacticoffeatus* és az *A. sclerotioniger* is OTA-termelőnek bizonyult (SAMSON ET AL., 2004).

Az ochratoxin-termelő mikroorganizmusok általában raktári (post-harvest) romlást okoznak, viszont ezek a fajok csak részben felelősek az OTA szennyezettségért. A *Penicillium verrucosum*-ot gyakran izolálják gabonafélék felületéről, mint szántóföldi kártevő felelős lehet az OTA szennyezettségért (MILLER, 1995).

Az OTA-t termelő *Penicillium* fajokat leggyakrabban a tárolt gabonafélékkel és fermentált termékekkel hozzák összefüggésbe, míg az *Aspergillus* fajok főleg a kávébabot, fűszereket, kakaóbabot, szójababot, földimogyorót, rizst és kukoricát szennyeznek (MOSS 1996, VARGA ET AL., 2001). Hazai éghajlati körülmények között is termelődik, leggyakrabban és legnagyobb mennyiségben a gabonafélékben és hüvelyesekben fordul elő (SZEITZNÉ-SZABÓ ÉS KOVÁCS, 2007). OTA-val szennyezett élelmiszerek (gabonafélék, zöld kávébab, penészes sajtok, hal, tejpor, kenyér, fűszerek) komoly egészségügyi problémákat okoznak az egész világon. A szennyezett zöld kávébab különösen fontos, mivel az OTA nem teljesen bomlik le a pörkölési eljárás alatt (TSUBOUCHI ET AL., 1987). Az élelmiszerek OTA tartalmát világszerte ellenőrzik, főképp a folyamatos bevitel miatt (ZINEDINE ET AL., 2007A).

Az ochratoxinok metabolizmusa és egészségkárosító hatása

Takarmány eredetű ochratoxikózisra a haszonállatok közül főként a sertés és a baromfi érzékeny. Az OTA erősen toxikus anyag, vesekárosító, állatkísérletekben bizonyítottan rákkeltő, immunszupresszív, teratogén anyag. Az emlős szervezetbe jutott toxin lassan ürül.

Az ochratoxinok csoportján belül a klórtartalmú származékok akut toxicitása nagy, hatásuk vesekárosításban, a vesetubulusok nekrózisában nyilvánul meg. A klórmentes származékok mérgező hatása egy nagyságrenddel kisebb. A több hasonló metabolit közül a legnagyobb mennyiségben az OTA képződik, amely biológiailag is a legaktívabb. Savas tulajdonságának köszönhetően a legtöbb faj esetében az OTA a gyomorból szívódik fel, de vékonybélben történő felszívódást is megfigyeltek. Monogasztrikus állatfajok esetében az elfogyasztott OTA közel fele szívódik csak fel (GALTIER ET AL., 1981). Az OTA a felszívódást követően a vesékben magasabb, a máj, izom és zsírszövetben alacsonyabb koncentrációban akkumulálódik. Ennek egy része metabolizálódik a nem toxikus ochratoxin-α-ra és más, kevésbé toxikus kisebb egységekre, a különböző fajokban eltérő arányban, jelentős része pedig változatlan formában a vesén keresztül kiürül a szervezetből. Kimutatták az OTA-ról, hogy hozzákötődik a vérben lévő fehérjékhez, pl. a szérumalbuminhoz, melynek hosszú a féléletideje a testben. Az OTA passzívan szívódik fel a bélhámsejteken keresztül és

aktívan a vesékben (MARQUARDT ÉS FROHLICH, 1992). A toxin főleg a vizelettel távozik a szervezetből, kisebb mértékben pedig a széklettel ochratoxin-α és OTA formájában.

A sertések mikotoxikus eredetű nefropátiáját először Dániában és Svédországban írták le (BUCHMANN ET AL., 1985). Legszembetűnőbb a veseelváltozás: a vese rendszerint megnagyobbodott, világosabb színárnyalatú. Az ochratoxin okozta sertésnefropátiát valamennyi európai országban megjelent (STOEV, 1998).

Csirke- és pulykaállományokban is leírták a megbetegedést: a vesék megnagyobbodása és fakó színe feltűnő volt, szövettanilag a proximális tubulusokban hámelhalást figyeltek meg. Tömeges elhullást okozott. Jellemző inkább a csökkenő testtömeg-gyarapodás és a romló takarmányfogyasztás (BURDITT ET AL., 1984).

Orális kísérletekben egereken és patkányokon letesztelték az OTA karcinogén hatását (CLARK ÉS SNEDEKER, 2006). Egyértelmű tény, hogy az OTA a vesére karcinogén hatással van hím patkányokban, bár a hatás pontos mechanizmusa ismeretlen.

1993-ban a Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (International Agency for Research on Cancer, IARC) az OTA-t, mint lehetséges humán karcinogént a 2B (ZINEDINE ET AL., 2007B). csoportba sorolta és azt a következtetést vonta le, hogy elegendő bizonyíték van az állatkísérletekből az OTA karcinogén hatására, viszont hiányosak a bizonyítékok az OTA karcinogén hatásáról az emberre nézve (IARC, 1993).

2.5.3 Zearalenon

A ZEA a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fonalas gomba fajok által termelt rezorcilsav-lakton. Származékai a természetben előforduló α-zearalenol, β-zearalenol, zearalanon, 3'-hidroxizearalenon, 8'-hidroxizearalenon, 5-formilzearalenon (SHIER, 1998). A leggyakoribb ZEA-termelő fajok a következők: *F. avenacum, F. equiseti, F. graminearum, F. culmorum, F. lateritium, F. crookwellense, F. semitectum* (BETINA, 1989; BENNETT ÉS KLICH, 2003).

A zearalenon metabolizmusa és egészségkárosító hatása

A ZEA és származékai biológiai hatásait tekintve főként szaporodásbiológiai és ivarzási problémát okoznak. Ennek oka, hogy kémiai szerkezetükében nagyban hasonlítanak a természetes ösztrogén vegyületekhez, és sokszor erősebb ösztrogén receptor affinitással bírnak (GROMADZKA ET AL., 2008). A méhnyálkahártya, a petefészek, a tejmirigyek, a hipotalamusz, a hipofízis elülső lebenyének sejtjein található ösztrogén receptorokhoz kapcsolódnak. Az egyes fajok érzékenységét befolyásolja az adott receptorok típusa és eloszlása. A fuzárium toxinok között szinergizmus figyelhető meg ennek következtében

egymás hatását felerősítve még súlyosabb szaporodásbiológiai zavarokat okoznak (CSEH ÉS KOVÁCS, 2010).

Ruzsás és munkatársai 1979-ben bizonyították a ZEA hormon- és reprodukciós rendszert zavaró hatását. Több hetes etetési kísérletekben szennyezett takarmánnyal történő etetése következtében a kísérleti állatoknál zavarok léptek fel a tüszőérésben, a spermatogenezis során, valamint a termékenységben. További kutatások eredményei is igazolják a ZEA csökkenti a tesztoszteron és spermium mennyiségét, és fokozza az elnőiesedést (ETIENNE ÉS DOURMAD, 1994). Elsősorban a kukorica és a búza alapanyagú termékekből kerülhet ez a toxin a szervezetbe (KOVÁCS, 2004).

Más káros biológiai hatásait is kimutatták a ZEA-nak: haematotoxicitás (MAAROUFI ET AL., 1996), genotoxikus és mutagén hatását (LIOI ET AL.,2004). Májkárosító hatását is leírták, melynek oka, hogy a toxin megváltoztat különböző biológiai markereket; valamint immunotoxicitása is ismeretes (ZINEDINE ET AL., 2005).

A ZEA átalakulása során toxikusabb másodlagos metabolitok keletkezhetnek, mint az α-zearalenol, mely nagyságrenddel toxikusabb hatást vált ki. A szervezetbe kerülve a ZEA zsíroldékonyságának köszönhetően könnyen megkötődik, majd a sejteken belül tovább alakul metabolitjaira, melyek aztán a májban glükuronsavval kapcsolódnak. A glükuronid megkötődik a bélnyálkahártya-sejtjeiben, majd a májon keresztül a véráramba kerül. A hepatikus keringés következtében a toxin eliminációja gátolva van, ami fokozza a káros hatások időtartamát (GROMADZKA, 2008). A ZEA metabolitja az α-zearalenol, négyszerte aktívabb (MÁTRAI ET AL., 2003), míg a ß-zearalenol (szerkezete megegyezik az α-zearalenoléval, de az atomok kapcsolódási sorrendje más) a ZEA-val megegyező toxicitású (MÉZES, 2009). Az eddigi vizsgálatok kimutatták, hogy a haszonállatok közül a sertés a legérzékenyebb rá, mert a szerveztében a metabolizáció következtében α-zearalenol keletkezik, hasonlóan az emberben is (MÁTRAI ET AL., 2003).

2.5.4 Trichotecének – T-2 toxin és a deoxinivalenol

A trichotecénvázas vegyületek közül a legismertebb a T-2 toxin és a DON, de emellett közel 200 különböző trichotecénvázas mikotoxint izoláltak és írtak le. Jellemző rájuk a dermatotoxikus hatás, 2-3 héten keresztül tartó fogyasztás során a szájnyálkahártya és nyelőcső kisebesedik, viszkető kiütések jelennek meg, valamint szövetelhalás is megfigyelhető. Ezzel párhuzamosan a vérképben is változások következnek be, a fehérvérsejtszám és trombocitaszám csökken (JOFFE ET AL., 1971). Mérsékelt égövön a leggyakoribb trichotecénvázas mikotoxin a DON, de a NIV, T-2, és HT2 toxin is előfordulhat. (SCOTT, 1989; PLACINTA ET AL., 1999; WHO/FAO, 2000).

T-2 toxin

A legtoxikusabbnak ítélt *Fusarium* penészgombák által termelt trichotecénvázas mikotoxin a T-2, mely a leggyakrabban fordul elő a takarmányok alapanyagául szolgáló gabona magvakban (PLACINTA ET AL., 1999). A gabonaféléket a szántóföldön a vegetációs időszakban nedves időben veszélyezteti a kialakulása, de a helytelen tárolás során gabonára kerülő nedvesség is a trichotecén vázas mikotoxinok koncentrációjának növekedéséhez vezethet (WHO/FAO, 2000). A T-2 toxin (3-α-hidroxi-4-ß, 15-diacetoxi-8-α (3-methil butiriloxi)-12,13-epoxitrichotec-9-én) világszerte természetes toxikus szennyezőnek számít (MAURICE, 1983; ABRAMSON ET AL., 1997). A T-2 toxin vízben nem, szerves oldószerekben, mint alkoholokban és poláros oldószerekben, így például metanolban, etanolban, izopropanolban, propilén-glikolban, acetonban, etil-acetátban, kloroformban, dimetil-szulfoxidban jól oldódik.

A T-2 toxin metabolizmusa és egészségkárosító hatása

A szervezetbe bekerülő T-2 toxin nagy része érintetlenül áthalad a bélcsatornán és a bélsárral kiürül. A T-2 toxin zsíroldékony vegyület, emiatt a fennmaradó hányad hatékonyan felszívódik. A felszívódás helye a vékonybél, majd a májon keresztül részben metabolizálódva (pl. glutation konjugáció) az epén keresztül ismét a bélcsőbe jut vissza (WHO/FAO, 2000).

A májban zajló metabolizációs folyamatok során, a T-2 zsíroldékony jellege csökken, vízoldhatósága pedig javul. A folyamat átmeneti metabolitok is keletkeznek, amelyek toxikusabbak is lehetnek, mint a kiindulási vegyületek. HT-2 toxin, mely T-2 toxin átalakulása során keletkezik, és *in vitro* karcinogenitási tesztben bizonyult károsabbnak a kiindulási T-2 toxinnál (WHO/FAO, 2000). A T-2 toxin és származékainak toxicitását a 12,13-epoxid, valamint az azokból képződő oxigén gyökök adják (HOFSTETTER ET AL., 2005), amelyek a sejtek membránjában lipidperoxidációs folyamatokat is kiválhatnak (MÉZES ET AL., 1998).

A T-2 toxin esetében dermatotoxikus hatások és a fehérjeszintézis zavarok, szájnyálkahártya és nyelőcső felmaródások, viszkető kiütések, valamint szövetelhalás figyelhetők meg (FAIRHURST ET AL., 1987, SÁLYI ÉS GLÁVITS, 1995). T-2 toxin legfontosabb hatása a fehérjeszintézis gátlása. Amely során a májsejtek transzformációs folyamataiban szerepet játszó fehérjék aktivitását (GUERRE ET AL., 2000) és az immunrendszer működését befolyásolja (RICHARD ET AL., 1991; KIDD ET AL., 1995), így a T-2 toxin mérgezés fokozottan

érzékenyé teszi az állatokat az egyes betegségekkel szemben (NIYO ET AL., 1988). Az állati szervezetben a májban, a csontvelőben, a lépben és a tímuszban folyó fehérjeszintézishez kapcsolódó folyamatok szenvedik el a legnagyobb mértékű károsodást T-2 toxin terhelés esetén. (ROSENSTEIN ÉS LAFARGE-FRAYSSINET, 1983; HOLLADAY, 1995). Azon sejteket károsítva leginkább, amelyekben nagymértékű fehérjeszintézis megy végbe, amilyenek például a limfociták, vagy az epiteliális sejtek. A T-2 toxin származékai a fehérjeszintézis potenciális inhibitorai eukarióta sejtekben (UENO, 1968; FEINBERG ÉS MCLAUGHLIN, 1989; HOLLADAY, 1995).

Deoxinivalenol

A legjelentősebb növénypatogének közé tartozó, búza és kukorica fúzáriózisát okozó *F. graminearum* és *F. culmorum* fajok által fertőzött szántóföldi növényeken jelenik meg a DON. Amely rendkívül ellenálló molekula, hőstabil, azaz a raktározástól kezdve az élelmiszerláncon keresztül képes megmaradni. Az őrlési alapanyag előkészítési eljárásokon keresztül, a főzés-sütési eljárásokat is képes átvészelni, továbbá a magas hőmérséklet sem csökkenti a mennyiségét (ROTTER ET AL., 1996; EHLING ET AL., 1997; ERIKSEN ÉS ALEXANDER, 1998).

Hosszan tartó (több, mint egy év) tárolás során azonban, amennyiben a hőmérsékleti és nedvesség viszonyok lehetővé teszik, a bakteriális folyamatokat részleges detoxifikációja (deepoxidáció) megfigyelhető volt (MÉZES 2013).

A DON metabolizmusa és egészségkárosító hatása

Az akut DON toxicitás emberekben fejfájást, szédülést, émelygést, hányást, hasmenést okoz. Az állatokban a rövid időtartamú kitettség anorexiát és hányást okoz, a hosszú kitettség pedig a belső szervek elváltozásához vezet. A DON toxinról kimutatták, hogy genotoxikus, immunszupresszív, teratogén, valamint számos szaporodási végpontra is negatív hatással van. A DON első lépésben a fehérjeszintézist gátolja, felborítja a citokinin szabályozást, megváltoztatja a sejtproliferációt és sejthalálhoz vezet. Igen erős immunrendszer gátló. A fehérjeszintézis megakadása miatt az agy növeli a triptofán nevű aminosav felvételét, s ennek következtében fokozódik a szerotonin szintézise. Feltehetően ez áll a hátterében a DON erőteljes émelygést, hányást előidéző hatásának. Úgy gondolják, a DON és más trichotecén anyagok a megnövekedett szerotoninszinten keresztül felelősek emellett az anorexia kialakulásáért is. Az is szerepet játszhat a csökkent táplálék- vagy takarmányfelvételben, hogy a DON irritálja a bélrendszert (TRENHOLM ET AL., 1984; EHLING ET AL., 1997). Az állatok a toxinszennyezett takarmányt visszautasíthatják a dózistól, az állat egyedi érzékenységétől, az eltérő tartási körülményektől függően. A DON tartalmú takarmány a bélcsatornában

gyulladásos folyamatokat, valamint fekélyképződést indukálhat (SÁLYI ÉS GLÁVITS, 1995). Emiatt csökken a táplálóanyagok emészthetősége és felszívódása, így a takarmányok hasznosulása.

2.5.5 Fumonizin-B1

A fumonizineket főleg a *Fusarium verticillioides* és *F. proliferatum* termeli, az ismert nyolc fumonizin származék közül a FB1 a legjelentősebb és leggyakoribb. 1988-ban, Dél-Afrikában a Marasas vezette PROMEC (Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis) csoport kutatói 1988-ban fedezték fel (GELDERBLOM ET AL., 1988). A fumonizinek felfedezése azért volt nagy jelentőségű, mert ezzel több állati és humán betegség oka vált ismertté. Nem véletlen, hogy az elmúlt 20 évben a nemzetközi mikotoxin kutatás középpontjába a fumonizin kutatás került (DUTTON, 1996). A fumonizinek a takarmány- és étkezési kukoricát is világszerte szennyezik. Előfordulásukat az összes kukoricatermesztő országában kimutatták. A fumonizinekre szinte minden állatfaj, különösen a lófélék és a sertés, sőt még az ember is érzékeny (MARASAS, 1995).

Fumonizinek metabolizmusa és egészségkárosító hatása

Az FB1 sertésekben súlyos mellvízkórt és tüdővizenyőt idéz elő. A betegséget 1989-90-ben az USA-ban észlelték és bizonyították, hogy FB1 okozza (HARRISON ET AL., 1990). Az állatoknál előforduló betegséget (FAZEKAS ET AL., 1997) kísérleti állatetetéssel reprodukálták. Két 10-12 kg testtömegű malaccal 330 mg/tak.kg FB1 etetését követően az állatok az ötödik napra elhullottak. A mellvízkór és tüdővizenyő mellett májelváltozás és sárgaság, agyödéma, illetve kezdődő körülírt agylágyulás volt diagnosztizálható. A fumonizin toxikózis sertésben pulmonális, kardiovaszkuláris és hepatikus szimptómákkal jellemezhető. A fumonizinek rákkeltő hatású anyagok, melyet laborállatokon és szövettenyészetben végzett kísérletekkel többszörösen is igazoltak. A fumonizinek az emberben is rákkeltő hatásúak. Számos tanulmány bizonyította, hogy a világ azon részein – Dél-Afrikában, Kína egyes részein, a legutóbbi adatok szerint Olaszország északkeleti részén –, ahol a vidéki lakosság mindennapi tápláléka a kukorica, illetve a kukoricából készült ételek, a kukorica gyakran szennyezett fumonizinekkel, az emberi nyelőcsőrák kb. 30-szor gyakrabban fordul elő, mint a világ más területein, ezért a kutatók általánosan elfogadottnak tekintik, hogy ezeken a területeken az emberi nyelőcsőrákot a fumonizinek okozzák (GELDERBLOM ET AL., 1991, 1992; NORRED ÉS VOSS, 1994).

A fumonizin hatásmechanizmusára vonatkozóan elsőként Wang és munkatársai (1991) írták le, hogy a FB1 a szfinganin szerkezeti analógja, majd ez a megfigyelés vezetett el

ahhoz a felfedezéshez, hogy a FB1 specifikus támadáspontja a szfinganin- és szfingozin-N-acetiltranszferáz (ceramidáz vagy ceramid szintáz). A szfingolipidek a membránok szerkezetének felépítésében, és ezzel igen nagyszámú sejtfunkcióban és ezek szabályozásában vesznek részt (BELL ET AL., 1993). A szfingolipidek csaknem minden sejt membránjában jelen vannak, legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszer fehérállományában (FARAGÓ ÉS MANCHOVICH,1996). A szfingolipidek közös tulajdonsága, hogy vázukat a szfingozin alkotja (1,3-dihidroxi, 2-amino vegyület).

A *Fusarium* gombák által termelt mikotoxinok esetében meg kell jegyezni viszont, hogy *Fusarium* mikotoxinok esetében jóval több hosszú lefolyású hatást írtak már le, mint akut tüneteket (DE NIJS ET AL., 1996). Többek között az immunrendszer működésének zavarait feltételezik a krónikus toxikózisok hátterében (PESTKA ET AL., 1987).

2.6 Mikotoxinok kimutatására alkalmazott módszerek

2.6.1 Kémiai analitika

A toxinok kvalitatív és kvantitatív kimutatására a legszélesebb körben alkalmazott kémiai analitikai módszer a magasnyomású-folyadékkromatográfia = HPLC, illetve annak tömegspektrometriával kombinált változatai (HPLC-MS vagy újabban HPLC-MS/MS), pontosságának és megbízhatóságának köszönhetően.

A HPLC vizsgálatoknál az egyik típus a minta egyedi tulajdonságát, úgy, mint UV abszorbanciáját vagy fluoreszcenciáját méri (KRISTÓF, 2000). Ez a módszer sikeresen alkalmazható a ZEA és származékai esetében, azok természetes fluoreszkálásának köszönhetően (GROMADZKA ET AL., 2008). A másik típus a mozgófázis azon tulajdonságait vizsgálja, mely a mintával való érintkezés következtében megváltozik. Ilyen lehet a sűrűség vagy a törésmutató. Ezen eljárást alkalmazzák a többi toxin vizsgálatára, mely egy kromatográfiás elválasztást alkalmaz kiegészítve a további szelekciót lehetővé tevő tandem kapcsolású tömegspektrométerrel (HPLC-MS/MS) (BÚZA ÉS MARTHNÉ, 2010).
A hazai és nemzetközi szabványok mikotoxinok élelmiszerekből és takarmányokból való kimutatására HPLC módszereket írnak elő.

2.6.2 Immunanalitika

Mikotoxin vizsgálatok esetében megbízhatóan alkalmazható az enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). A módszer alapja, hogy az adott mikotoxint nagy antigenitású vegyülettel konjugáltatják, majd az így képződött konjugátumot annak háromdimenziós szerkezete alapján a receptorok felismerik és jelentős titerű antitest termelés indul meg. felismerik (GROMADZKA ET AL., 2008).

A mérés elve antigén-antitest kötésen alapul folyadék fázisban. A biotin-streptavidin a legerősebb ismert fehérje-ligandum kölcsönhatás. A mikrotitráló lemez celláiba, amelyek streptavidinnel fedettek bemérjük a toxin-standardokat, vagy mintákat; továbbá a toxinnal konjugált torma peroxidázt (konjugátum). A toxin és a konjugátum az ezt követően bemért, biotinnal kapcsolt, toxin-specifikus antitest antigén-kötő helyeiért vetélkedik (kompetitív enzim-immunoassay) kezdetben a folyadék fázis teljes térfogatában. Ezzel egy időben a biotinilált antitest, amely igen erősen kötődik a streptavidinhez, a vetélkedő komponenseket a cellák felszínéhez köti. Az inkubálást követő mosással minden nem kötődött komponens eltávolítunk a rendszerből. Így a cellákba mért színtelen szubsztrátot csak a kötve maradt konjugátum képes kék termékké alakítani, ami az ellenanyaghoz kötődött szabad toxin mennyiségével fordított arányban áll. Az enzimreakciót leállító stop oldat a kék színt sárgára változtatja. Ennek optikai denzitása mikroplate-fotométerrel mérhető. A 450 nm-en mért abszorbancia tehát fordítottan arányos a mikotoxin koncentrációjával. A standard pontokból nyert kalibrációs görbe (x: lg(konc.), y: OD450) segítségével a minták koncentrációja egyértelműen meghatározható (HTTP1).

2.6.3 Biológiai hatásmérés

A biológiai hatásmérés során általában valamilyen toxikus anyag élőlényekre gyakorolt hatásával foglalkozunk. A krónikus és akut vizsgálatokat végzünk, melyek kapcsán mérési végpontok különböztethetők meg. A vizsgálatok során a különböző szennyező anyagok koncentrációiban adjuk meg a kiválasztott tesztorganizmusokon mért hatást (mozgásképtelenség, fénykibocsátás-változás, elhullás). A különböző koncentrációk mellett a különböző enzimek aktivitásának csökkenése vagy növekedése is végpontként szolgálhat (GRUIZ ET AL., 2001).

Az adott toxikus anyag semlegesítésének/ártalmatlanításának ellenőrzése során minél több rendszerben negatív, azaz hatást nem kiváltó adatokat kapunk, annál biztonságosabbnak tekinthető az eljárásunk. Érdemes a mikroorganizmusokon keresztül folyamatosan magasabb szerveződésű tesztek felé haladva és egyre tágabb hatásspektrummal vizsgálni a tesztelni

kívánt ártalmatlanítási módszert pl: citotoxicitás, genotoxicitás, etetési kísérletek (akut és krónikus) hal, baromfi, egér. Így a mikrobákon, halakon, madarakon keresztül egészen az emlősökig eljutva kapunk eredményeket az adott toxikus anyag viselkedéséről.

A toxikus anyagok különböző biológiai hatásainak tesztelésére számos teszt áll rendelkezésre:

- Prokarióta tesztrendszerek:
  - Mutagenitás, genotoxicitás mérésére: AMES teszt, SOS-Chromo teszt
  - Citotoxicitás mérésére: *Alivibrio fischerii* teszt, BLYR teszt
- Eukarióta tesztrendszerek:
  - Endokrin rendszert zavaró hatás (ösztrogén, androgén) mérésére: BLYES, BLYAS teszt
- Állatetetési kísérletek:
  - Molekuláris genetikai bioassay vizsgálatok, pl: ösztrogén dependens mRNS-koncentrációmérés (amely módszerek in vitro sejtvonalakon is alkalmazhatóak)
  - Célszerv tulajdonságainak/elváltozásainak vizsgálata

2.6.3.1 Prokarióta tesztrendszerek – SOS-Chromo teszt

A **genotoxikus** anyagok kimutatására használt SOS-Chromo teszt a *β*-galaktozidáz és az alkalikus foszfatáz enzim aktivitás mérésén alapuló egyszerű kolorimetriás mérés. A teszt az *Escherichia coli* K12 törzsből származó PQ37 mutáns törzsét használja tesztszervezetként. A teszt azon az elven alapul, hogy a legtöbb genotoxikus vegyület indukálja az SOS hibajavító rendszert a baktériumban. Az SOS-repair rendszer az erősen károsodott DNS-szál javítására az utolsó "esélyt" adja, ahol már nem a hiba korrekt javítása a cél, hanem egy valamennyire is használható, folytonos DNS elkészítése, mely a későbbiekben esélyt biztosít a túlélésre.

A tesztszervezetben a normál *lac* gént – a *β*-galaktozidáz struktúrgénje – törölték a genomból, és áthelyezték az *sfi*A gén kontrollja alá, amely részt vesz a sejtosztódásban és több beépített génnel együtt az SOS válaszreakcióért is felelős. A sejt a DNS javítása során az *sfi*A::*lac*Z operont a genotoxicitás nagyságának megfelelően többször átírja. Az átírások számának növekedése egyenesen arányos a *lac*Z által kódolt *β*-galaktozidáz enzim mennyiségével. (QUILLARDET ET AL., 1982; LEGAULT ET AL., 1994).

A teszt alkalmas a genotoxikus, és DNS károsító anyagok környezeti mintákban történő kimutatására, talajban, levegőből, élelmiszer összetevőkből, vegyületekből, kozmetikumokból, vagy biológiai folyadékokból (LEGAULT ET AL., 1994). A teszttel

kimutatható az AFB1 mutagén hatása (QUILLARDET ET AL., 1985; QUILLARDET ÉS HOFNUNG, 1985; AUFFRAY ET AL., 1984).

A **citotoxikus hatás** mérésére alkalmazott *Aliivibrio fischeri* tesztszervezet egyik legismertebb tulajdonsága a biolumineszcencia, amely tulajdonsága, ha citotoxikus anyaggal kerül kapcsolatba nagymértékben gyengül vagy elveszik. Ezt a tulajdonságát alkalmazzák a környezetvédelmi gyakorlatban vízminták ökotoxicitásának megállapítására. (FERNANDEZ-ALBA ET AL., 2002; PEINADO ET AL., 2002; REPETTO ET AL, 2001; RIBO ÉS KAISER., 1983). Egy lengyel kutatócsoport adaptálta a módszert mikotoxinok vizsgálatára is. A kutatásaik során az AFB1-et 10 µg/ml és DON-t 20 µg/ml koncentrációban vizsgálták (SARTER ET AL., 2008). Krifaton és munkatársai 2010-ben tovább fejlesztették a módszert és megállapították, hogy az AFB1 már 1 µg/ml koncentrációban is kimutatható a teszttel.

2.6.3.2 Eukarióta tesztrendszerek – BYES,/BLYAS teszt

A BLYES/BLYAS rendszer a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzs genetikailag módosított változatát használja tesztszervezetként az **ösztrogén/androgén hatás** kimutatására, amelynek genomjába a humán ösztrogén/androgén receptort integrálták. A sejtben jelenlevő ösztrogén/androgén receptorok, amennyiben hormonhatású anyaggal kapcsolódnak, képesek azt valamilyen riportergén segítségével jelezni. Ilyen például a YES/YAS (Yeast Esrtogen/Androgen Screen) teszt, amely esetében plazmidon kódolt *lacZ* gén átíródása jelzi a hormonhatású anyag jelenlétét. A receptor-EDc komplex az plazmidon kódolt ösztrogénválasz-elemekhez (ERE – Estrogene Response Element) kötődve elindítja a *lacZ* gén átíródásával a ß-galaktozidáz termelődést, amely megfelelő szubsztrát jelenlétében színreakciót ad; így a hormonhatás kolorimetriásan mérhető (ROUTLEDGE ÉS SUMPTER, 1995).

Ennek a módszernek egy továbbfejlesztett változata biolumineszcencia alapú teszt. A *lux*CDABE operon sejtbe integrálásával létrehozták a BLYES/BLYAS (Bioluminescent Yeast Esrtogen Screen) tesztet (Tennessee University, Knoxville, Tennessee, USA). A teszt elve a korábban bemutatott YES módszerhez hasonló, azzal a különbséggel, hogy amennyiben a humán ösztrogén/androgén receptor összekapcsolódik egy hormonhatású anyaggal, akkor a receptor-komplex elindítja a plazmidon kódolt *lux* gének áríródását. Így a tesztszervezet ösztrogénhatású anyagra fénykibocsátás emelkedéssel reagál (GUPTA ET AL., 2003). A BLYES teszt esetében a 17-β ösztradiol kimutatható $1{,}36 \times 10^{-9}$–$6{,}81 \times 10^{-12}$ µg/ml között, illetve az 50%-os lumineszcencia intenzitást okozó koncentráció (EC_{50}) $1{,}72 \pm 0{,}65 * 10^{-10}$ µg/ml. A ZEA esetében az EC_{50} érték 0,60 µg/ml (SANSEVERINO ET AL., 2009, KRIFATON ET AL., 2011).

A BLYES törzzsel egyidőben egy konstitutív kontroll törzs vizsgálata szükséges, amely a **citotoxicitás mérésére** alkalmas *S. cerevisiae* BLYR törzs. A BLYR törzs esetében a biolumineszcenciáért felelős gének átíródása állandó, viszont a sejt életfeltételeire károsan ható anyagok következtében lumineszcencia gátlás tapasztalható (ELDRIGE ET AL., 2007).

2.6.3.3 Állatkísérletek

A magasabb rendű állatokkal végzett in vivo kísérleteknél a toxikus anyag különböző koncentrációi által kiváltott hatást vizsgálják különböző rendszertani csoportokba tartozó élőlényekben, izolált szervekben, vagy természetes állományokban. A vizsgált reakció lehet a pusztulás, alaktani, szaporodásbiológiai, táplálkozásbiológiai vagy más élettani reakció. A kísérleti beállításokat és az állatok kezelését az OECD 407 protokoll ajánlásai alapján végzik az EU országokban. Az akut kísérletek időtartama 72 óra (n=7-10). A krónikus kísérletek időtartama 21 nap (n=7-10) (ZELJEZIĆ ET AL., 2006).

Első lépcsőben valamilyen a kísérletes laboratóriumi munkákhoz használt ismert tulajdonságú rágcsálók nemzetségébe tartozó fajon tesztelik etetési vagy más jellegű (pl: dermatológiai) kezelés során a kiválasztott toxikus anyagot pl: kísérleti egér és patkánytörzseken (pl. Wistar patkány) vonalakon, adott speciális vizsgálatokhoz halakon (pl. ezüst kárász), esetleg nyulakon.

A második lépcső során, a célállatokon folytatott kísérletek kerülnek sorra pl: takarmány kiegészítők esetén az az állatcsoport, aminek a kifejlesztett adalékanyagot szánják pl: baromfi, sertés, szarvasmarha.

A kísérletes daganatkutatásban elsősorban emlősöket, és ezen belül főleg rágcsálókat alkalmaznak (egér, hörcsög, patkány), valamint az egyes szenzitív fajok alkalmazása (pl. aflatoxin esetében a kacsa) szintén elterjedt.

Az állatok az általuk fogyasztott takarmány kapcsán találkoznak mikotoxinokkal. Több mikotoxin felfedezését állatetetési körülmények előzték meg. A különböző mikotoxinok esetében ma már tudjuk, hogy melyik szervre hat leginkább az adott toxin: az AFB1 a májfunkciókra, a ZEA az endokrin rendszerre, az OTA a vesefunkciókra, a T-2 toxin esetében dermatotoxikus hatások figyelhetők meg. A fumonizinB1 sertésekben tüdővizenyősséget, lovakban agylágyulást idéz elő, a DON esetében főként sertésben az emetikus hatást figyeltek meg.

<u>Molekuláris genetikai módszerek</u>

A genetikai ismeretek bővülése lehetővé tette az egyes toxikus hatással rendelkező anyagok genetikai expressziójának vizsgálatát; az adott szövetben a toxin hatására bizonyos

enzimek termeléséhez szükséges gének indukálódnak, amelyeket Real-Time PCR technikával tudnak detektálni a szövetkivonatból. Több olyan toxikus anyag vizsgálata is lehetséges így (akár akut vagy krónikus), amelyeknek nem ismert teljesen a metabolitikus útvonala, valamint a sejtekre gyakorolt hatása; hiszen a célszervre kifejtett hatás mögött természetesen bizonyos gének expressziójának megváltozása áll. E változások, mint molekuláris biológiai markerek, szintén felhasználhatóak pl. az **ösztrogénhatás vizsgálatára** (HENEWEER ET AL, 2007).

Célszerv tulajdonságainak/elváltozásainak vizsgálata

Endokrin rendszerre kifejtett hatás vizsgálata

Az ösztrogén fontos szabályozó szerepet játszik valamennyi gerinces élőlény életében, ezért gyakorlatilag bármelyikük alkalmas lehet arra, hogy ösztrogén-hatású vegyületeket vizsgáljunk. A gyakorlatban azonban – gazdasági és etikai szempontokat is figyelembe véve – halakat, illetve rágcsálókat szoktak felhasználni e célra.

Váltivarú halak esetében, mint amilyen a zebrahal (*Danio rerio*) is, a vérplazmában vagy a teljes test homogenizátumban mért vitellogenin szint meghatározása, lehetőséget kínál egy viszonylag egyszerűen kivitelezhető teszt elvégzésére. Normál esetben ez a fehérje csak a nő ivarú egyedekben termelődik endogén ösztrogénhatására. Azonban a környezetből származó, vízbe került hormonhatású szennyező anyagok ezt megzavarhatják, illetve a hím ivarban is beindíthatják a fehérje termelődését, így ennek a fehérjének ELISA módszerrel történő vizsgálata alkalmas az ösztrogénhatású anyagok jelenétének kimutatására (SCHWARTZ ET AL., 2010).

A fenti módszernek van egy költségesebb, de annál látványosabb megoldása is. A zebrahal olyan transzgénikus változatát használják fel hozzá, amelynél a vitellogenin szintézist kódoló gén (*zvtg1*) ösztrogén által indukálható promóteréhez egy fluoreszcensen világító fehérjét (*gfp*) kódoló részt és egy ERE szekvenciát (Estrogen Response Element) kapcsoltak. Az ilyen konstrukciójú hím ivarú halak májában, már nagyon kis koncentrációjú ösztrogénhatású vegyület jelenlétében intenzív fluoreszcenciát eredményez (CHEN ET AL., 2010).

A zebra dánió vitellogenin teszttel viszonylag egyszerűen és gyorsan vizsgálhatjuk a xenoösztrogének hatásának meglétét, de messzemenő következtetéseket nem vonhatunk le arra nézve, hogy az emlősállatok hormonrendszerében milyen változások mennek végbe a vegyületek hatására.

Uterotrofikus bioassay

Az uterotrofikus bioassay módszer során nőstény rágcsálókat, jellemzően egereket vagy patkányokat kezelnek 3 napig a kérdéses vegyülettel, majd ezt követően vizsgálják a méh tömegének növekedését és a méh falának struktúrájában bekövetkezett változásokat. A kísérletekhez prepubertás korú vagy felnőtt, ovariektomizált (petefészek művi eltávolítása) állatokat használnak. A prepubertás korú állatoknak még nincs számottevő nemi hormon termelése, ezért a kísérlet során a vizsgált markerekben bekövetkező változások kizárólag a beadott vegyületnek tulajdoníthatóak. A felnőtt állatoknál az endogén ösztrogén hatását ovariektomiával lehet megoldani. Ha a vizsgálandó vegyület ösztrogén-szerű hatásokkal rendelkezik, a méh tömege megnő. Ez a növekedés arányos a vegyület hatáserősségével (OECD 2007A, ABBAS ET AL., 1984).

Az ösztrogénhatású anyagok a méhben számos ösztrogénhatással kapcsolatos útvonalat szabályoznak. A legfőbb ilyen folyamatok modellezik az extracelluláris mátrixot, az alternatív kiegészítő működéseket, sejtproliferációt, vagy hatást gyakorolhat az intracelluláris Ca^{2+}-koncentrációra. Az ösztrogén receptor által irányított változások a génexpresszióban megfelelően mérhetők Real-Time PCR mérésekkel. Heneweer és munkatársai az elvégzett kísérletek során végül 7 génről állapították meg, hogy etinilösztradiol vagy zearalenon kezelés hatására szignifikánsan megváltozik az expressziójuk (apelin, aquaporin 5, kaszpáz 7, komplement komponens 2, mevalonsav-pirofoszfát-dekarboxiláz, osteopontin, calbindin D9k) (HENEWEER ET AL., 2007). Ezek a gének gyulladásos folyamatokban, a komplement aktivációban, az extracelluláris mátrix átalakulásában, a kalcium-ion transzportjában és az extracellulárisan jelenlévő vízhomeosztázisában játszanak fontos szerepet.

Heneweer és társai által elvégzett kísérletsorozat során a klasszikus uterotrofikus bioassay módszert kiegészítették génexpressziós változásokat és koregulátor kölcsönhatásokat célzó vizsgálatokkal. A kísérlet során szexuálisan még éretlen, nőstény patkányokat etinilösztradiollal (EE2) és zearalenonnal kezeltek, több dózisban, három napon keresztül, majd vizsgálták a méh tömegében, illetve a méhszövet struktúrájában bekövetkezett változásokat. A vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy az 1 és 10 µg/testsúly kg-os EE2 és az 1 és 10 mg/testsúly kg-os zearalenon adagok szignifikánsan megnövelték az *uterus* tömegét. A 10 µg/testsúly kg-os etinilösztradiol és a 10 mg/testsúly kg-os ZEA dózisok esetén az *endometrium* szignifikáns megvastagodását tapasztalták. Emellett az méhszövetből izolált RNS-eket felhasználva, DNS microarray és Real-Time PCR segítségével mérték az ösztrogén-függő gének expressziójában bekövetkezett változásokat. Megfigyelték, hogy a 10 mg/testsúly kg ZEA dózis hatására az APLN génexpressziója az ötödére, az AQP5

génexpressziója felével csökkent, míg a C2 gén esetében 50% -al nőtt, a CALB3 gén esetében négyszeresére nőtt az expresszió (HENEWEER ET AL., 2007).

Nephrotoxikus bioassay

A módszer során a kísérleti emlősállat veseszövetében (a vese kérgi régiójában) a toxikus anyag hatására bekövetkező változásokat a szöveti sejtekben lezajló gén indukciók elemzésével vizsgálják. A vese cortex régiójából total RNS-t izolálnak majd cDNS szintézist követően Real-Time PCR segítségével génexpressziós analízist végeznek. Endogén referenciaként Ppia (peptidylprolyl isomeráz A, cyclophilin A) gén expresszióját használják. A reakciók specificitását (amplikon integritás) Melt Curve elemzéssel ellenőrzik. A méréseket a speciális cititoxicitási marker génekre tervezik (CUI ET AL., 2009). A vizsgálandó anyag toxicitását az irodalomban már leírt expozíció által leginkább befolyásolt markergének expressziójának mérésével határozzák meg (LUHE ET AL., 2003). Luhe és munkatársai az OTA génexpresszióját kiváltó hatását vizsgálták Wistar patkányokon, 24 és 72 órás kísérletekben, alacsony 1 mg/kg és magas 12,5 mg/kg OTA dózisokkal. Az alábbi gének kifejeződését vizsgálták: az apoptózisért (irányított sejthalálért) felelős GADD 153, GADD 45, annexin V; az oxidatív stresszválaszt adó hipoxia faktor 1 és a kataláz; valamint gyulladásra utaló α-2-makroglobulin, ceruloplazmin, és a kathepsin S-t. Luhe és munkatársai a 72 órás 10mg/ testsúly kg OTA dózis vizsgálatok során, az OTA hatására megnövekedett expressziókat tapasztaltak: a Gadd45 és Annexin2 expressziója a kétszeresére, Gadd153 és clusterin expressziója másfélszeresére, a ceruloplazmin expressziója a 2,5-szeresére változott.

Hershberger assay

Az assay antiandrogén aktivizálódásokat detektál androgén-függő szövetek (prosztata, Cowper mirigyek, pénisz izom) tömegmérésével kasztrált hím patkányoknál, amelyeket tesztoszteronnal kezelnek a vizsgálandó anyaggal történő 10 napos orális kezelést követően (GRAY 1998; GRAY ET AL., 1997A, 1998; HERSHBERGER ET AL., 1953).

Az assay nagyon érzékeny az androgén és antiandrogén hatású anyagokra. Egyéb mérési végpontok melyek segítenek megítélni a tesztanyag hormonhatását a máj, vesék, mellékvesék és vérszérum, amiben tesztoszteron és a luteinizáló hormon (LH) szintjét szokták mérni.

Mind az uterotrofikus, mind a Hershberger assay már több évtizede segíti a kutatókat a vegyi anyagok ösztrogén és androgén hatásának megállapításában. Azon anyagok, amelyek a patkányoknál ösztrogén és androgénhatást váltanak ki nagy valószínűséggel az emberben is hasonló elváltozásokat és hatásokat okoznak.

Nőstény patkány assay

A frissen leválasztott nőstény patkány tesztet már két évtizede használják (GRAY ET AL., 1988, 1989). A frissen leválasztott nőstény patkányokat naponta kezelik a megfelelő dózissal orális gyomorszondán keresztül 21 napon át, közben a vaginanyílás alakulását monitorozzák. Az állatokat altatásos elölést követően, 42 naposan, teljes vizsgálatnak vetik alá (méh és hüvely tömeg vizsgálat, szövettan, tiroid hormon státusz mérés, HPG funkció mérés, szteroidogenezis gátlás, stb). A módszer nagyon érzékeny az ösztrogénhatásra, a szteroidogenezis gátlására és az antitiroid aktivitás mérésre, valamint könnyen reprodukálható.

Hím patkány assay

A kísérlet során a pajzsmirigyben végbemenő változásokat, HPG zavar, szteroidogenezis zavar, valamint szteroid hormonfunkciós zavarokat vizsgálnak. A frissen elválasztott hím patkányokat 30 napon keresztül kezelik a vizsgálandó anyaggal. A vizsgálat érzékeny az androgén, antiandrogén, szteroidgenezis gátló és antitiroid aktivitású anyagokra. Ezzel a módszerrel számos peszticid és egyéb xenobiotikum ösztorgén-adrogén hatását állapították meg (metoxiklór, linuron, karbendazim, dibutil-ftalát (STOKER ET AL., 2000).

Utero-Lactational assay

Az EPA által alkalmazott utero-lactational assay során 80 napon keresztül kezelik a kísérleti csoportokat 10 liter tej/kísérleti csoport (120-150 egyed) beállítással. Ezen protokoll alapján androgén és antiandrogén anyagok tesztelhetőek 2-3 hét alatt, az EDC (Endocrin disturbing compound) hatás és az antitiroid aktivitás pedig 4-5 hetes vizsgálat során állapíthatóak meg.

Ezt a módszert használták a 2,3,7,8 TCDD (dioxin) hatásának vizsgálatára: ami már két nagyságrenddel kisebb koncentrációban megváltoztatja a szexuális differenciáltság mértékét a patkányok és a hörcsögök esetében, mint az irreverzibilis elváltozásokat előidéző koncentráció az ivarérett patkányok esetében (GRAY ÉS OSTBY 1995; GRAY ET AL., 1997 b,c; WOLF ET AL., 1999).

2.7 Mikotoxinok detoxifikációjára alkalmazott módszerek

A mikotoxinok detoxifikációja során vagy a mikotoxin molekula kerül lebontásra adott fizikai-kémiai eljárás, esetleg mikroba alkalmazásával. Vagy az adott felhasználásra kerülő anyag az állati szervezetben csökkenti a mikotoxin akkumulációját, a toxin

felszívódásának gátlásával (pl: agyagásványok, élesztősejtfal készítmény). A mikotoxinokat detoxifikáló illetve degradáló ágensek gyakorlati felhasználása a gazdasági állatoknál indirekt módon a humán egészségvédelem egyik eszköze is lehet (BOUDERGUE ET AL., 2009).

Az adalékanyagok zen csökkentik a mikotoxin szennyezést a takarmányokban azáltal, hogy gátolják a mikotoxinok felszívódását, segítik kiválasztódásukat vagy megváltoztatják a mikotoxinok hatását az adott szervezetre. Ezen takarmány adalékokat mikotoxin detoxifikáló anyagoknak nevezzük. Az alábbi detoxifikáló módszerek ismertek (BOUDERGUE ET AL., 2009):

- **Adszorbensek**: Olyan nagy molekulasúlyú anyagok, amelyek valamilyen módon megkötik a mikotoxinokat, így csökkentik azok biológiai hozzáférhetőségét. A folyamat az állat bélrendszerének károsítása nélkül játszódik le, és a mikotoxin-adszorbens komplex az ürülékkel távozik. Az adszorbensek adott, a piacon beszerezhető készítmények, tartalmazhatnak ammónium propionátot, monomerikus propionsavat és szorbit-savat tartalmaz, speciális, magnéziumot és nátriumot tartalmazó természetes szilikát vivőanyaggal, továbbá különböző mikrobák sejtfalát is pl: tejsav baktérium vagy akár élesztő sejtfal. A mikotoxinok megkötésre javasolt anyagok szervetlen és szerves vegyületek is lehetnek. A szervetlen csoportba szilícium polimerek így például egyes agyagásványok (kaolin, szepiolit, zeolit, bentonit, stb.) valamint az aktív szén tartozik. A szerves adalékanyagok nagy rosttartalmú takarmányok (szénák, szalmák) élesztősejtfal kivonatok és egyes huminsav származékok (SMITH, 1980).
- **Kémiai módszerek:** Számos vegyületet hatásosnak találtak több mikotoxinnal (aflatoxin, fumonizin, T-2, ZEA, DON) szemben (pl. kálcium-hidroxid-monometilamin, nátrium-biszulfit, ózon, klórgáz, hidrogénperoxid, aszkorbinsav, hidroklórsav, kén-dioxid, formaldehid, ammónia és ammónium-hidroxid) (VARGA ÉS TÓTH, 2005).
- **Fizikai módszerek:** A gabonatételek mikotoxin-tartalma csökkenthető a szemek mechanikai, sűrűség szerinti szeparációja és szín szerinti osztályozása révén. Ismeretesek mosási eljárások (vízzel, vagy Na-karbonát oldattal) a DON, ZEA és fumonizin koncentrációjának csökkentésére gabonában. Az FB1 koncentráció csökkentésére 150-200ºC-on történő hőkezelést alkalmaznak. Az ochratoxin szintet pedig sikeresen kontrollálták gamma-sugárzással takarmányokban (REFAI ET AL., 1996).
- **Biotranszformáló anyagok**: lebontják vagy átalakítják a mikotoxinokat egy vagy több, nem, vagy csak kevésbé toxikus metabolitra. Ezek lehetnek baktériumok,

gombák vagy különböző enzimek is (pl: egy a piacon forgalomban lévő készítmény az alábbiakat tartalmazza: BBSH 797 kódszámú *Eubacterium sp* törzs, *Trichosporon mycotoxinivorans* törzs, továbbá agyagásványokat és élesztősejtfal kivonatot). A biotranszformációs eljárások során a biológiai hatáselemzés is egyre nagyobb szerepet kap, amelyet az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal (EFSA) 2009-ben kiadott közleménye is hangsúlyoz; miszerint a biotranszformáló ágensek alkalmazása során nem csak a mikotoxinok, hanem a képződő metabolitok összegzett biológiai hatását is vizsgálni kell megfelelő toxikológiai tesztekben (BOUDERGUE ET AL., 2009).

2.7.1 Mikotoxinok biodegradációja

A szakirodalom alapján ismert AFB1, ZEA, OTA, T-2, DON és FB1 bontó mikroszervezeteket a 2.5. sz. táblázat tartalmazza.

A fuzárium gombák mikotoxinjainak szerkezeti képlete tartalmaz egy 12,13-epoxid csoportot, amely a toxikusságért felelős. Az epoxid redukció jól ismert folyamat, a kérődző állatok bendőjében élő mikrobiális epoxidáz enzimei végeznek. Ilyen mikrobák az *Eubacterium* fajok is, melyek képesek hasonló epoxidáz enzimek szintézisére, ezt a tulajdonságukat baromfiban a T-2 toxin esetében le is írták (MÉZES ET AL., 2010).

Az AFB1 mikotoxint napjainkig bizonyítottan az aktinomicéták körében tartozó mikróbák képesek biodegradálni. Eddig a *Nocardia corynebacteroides* (CIEGLER ÉS PETERSON, 1966), a *Mycobacterium fluoranthenivorans* (HORMISCH ET AL., 2004) és a *Corynebacterium rubrum* (MANN ÉS REHM, 1977; SHIH ÉS MARTH, 1975), aflatoxin-bontó képességéről számolt be a szakirodalom. Teniola és munkatársai (2005) részletesen tanulmányozták a *Rhodococcus erythropolis* extracelluláris enzimeinek AFB1 biodegradáló hatását és vizsgálták a mutagén hatás változását is. Kromatográfiás vizsgálatokkal nem tudták az AFB1 bomlási termékeit kimutatni, valamint AMES teszt használatával bizonyították a mutagenitási potenciál megszűnését.

A ZEA biodegradációjára több gomba is képes. Kamimura (1986) a *Rhizophus sp.* ZEA-bontó tulajdonságát írta le, majd El-Sharkawy és Abul-Hajj (1988) írták le a ZEA eredményes bontását, amelynek során a *Gliocladium roseum* nevű gombafaj a toxin gyűrűs rendszerét bontotta. A *Streptomyces griseus, S. rutgersensus, Rhizopus arrhizus* törzs esetében, amely mikroszervezetek 18, 25, 40%-át tudták a ZEA toxinnak α-zearalenonná alakítani (EL-SHARKAWY ÉS ABUL-HAJJ, 1988). Itt azonban fontos megjegyezni, hogy az az α-zearalenol nagyságrenddel toxikusabb a ZEA-nál, így biodegradáció végtermékként megjelenése nem előnyös. Takahashi-Ando és munkatársai (2004) izolálták a *Clonostachys*

rosea ZEA detoxifikációjáért felelős laktonohidroláz enzim génjét, a *zhd*101-et, amelyet *E. coli* és *S. cerevisiae* mikroszervezetekbe transzformáltak. A *zhd*101 gént GM rizsbe ültetve is vizsgálták annak ZEA detoxifikáló hatékonyságát. Az génmódosított *E. coli* által végzett degradáció hatékonynak bizonyult, míg a génmódosított *S. cerevisiae* kisebb aktivitást mutatott. A GM rizzsel beállított kísérletek során szintén tapasztaltak jelentős toxinmennyiség csökkenést (TAKAHASHI-ANDO ET AL., 2004). A *Trichosporon mycotoxinivorans* élesztőgombafaj is képes a ZEA- és ochratoxin bontására, valamint, a biodegradációs végtermék nem rendelkezett ösztrogénhatással (MOLNÁR ET AL., 2004; VEKIRU ET AL., 2010). A prokarióták ZEA bontó képességéről kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésünkre. *Pseudomonas putida* ZEA-1 jelzésű törzsről írták le 2007-ben, a zearalenon szénforrásként történő hasznosítást, a ZEA bontás maradékanyagának toxikus hatását *Artemia salina* tesztszervezettel vizsgálták További vizsgálatokban azonosították a ZEA bontásért felelős plazmidon kódolt géneket (ALTALHI ÉS EL-DEEB, 2009).

T-2 toxin esetében már 1983-ban izoláltak olyan talajlakó baktériumot *Curtobacterium sp.*, mely feltételezhetően képes volt a degradációra. Később 1987-ben rumenből izolált baktériumok esetében vizsgálták a T-2 degradációt, mely során *Butyrvibrio fibrisolvens* által termelt észteráz enzim hatására 1 óra inkubálás alatt 42% csökkenést tapasztaltak a kiindulási T-2 koncentrációból (WESTLAKE ET AL., 1987), ami kifejezetten jó degradációs érték. Az eredmény későbbi gyakorlati felhasználásáról azonban szakirodalmi adat nem lelhető fel.

Egyes *Lactobacillus* fajokról kimutatták, hogy közepes OTA bontó képességgel rendelkeznek, azonban a metabolitok és azok esetleges toxikus hatásait nem vizsgálták. Egy *Acinetobacter calcoaceticus* törzs is képes az OTA degradációjára, de a bontási melléktermékek vizsgálata ebben az esetben sem történt meg (PIOTROWSKA, 2005). Stander és társai pedig egy *Aspergillus niger* törzs esetében azonosítottak egy OTA bontó enzimet, mely vizsgálatakor megállapították, hogy OT-alfa és fenilalanin a képződött bomlástermék (STANDER ET AL., 2000, ABRUNHOSA ET AL., 2006). Mindezek mellett a *Trichosporon* fajok is hasonló lebontási útvonalon degradálják az OTA-t. Ebben az esetben azonban a képződött degradációs termékeket már toxikológiai vizsgálatokkal is tanulmányozták és arra a megállapításra jutottak, hogy a törzs biztonságosan képes az OTA biodegradációjára (SCHATZMAYR ET AL., 2003). Sajnos a *Trichosporon mycotoxinivorans* törzsről azóta megállapították, hogy humán patogén, mivel tüdőgyulladást okozhat a veleszületett cisztikus fibrózisban szenvedő betegeknél (HICKEY ET AL., 2009). Egyenlőre csak krónikusan legyengült immunrendszerű, és genetikai rendellenességel rendelkező (akut cisztikus fibrózis) betegeknél figyelték meg a patogenitását a törzsnek. Valamint a patogenitás cáfoló publikáció

is megjelent a 2011-es évben (TINTELNOT ET AL., 2011). Mindezen adatok és elemzések alapján az EFSA nem adott ki tiltó javaslatot a *Trichosporon mycotoxinivorans* tartalmú készítményekre vonatkozóan.

A DON esetében jelenleg nagyon kevés mikrobatörzs ismert, mely rendelkezne a biodegradációs képességgel, egy *Eubacterium sp*. BBSH 797 törzs (BINDER, 1997) képes a DON de-epoxidációjára. Ezen kívül csak egyetlen baktérium képes a DON teljes lebontására, melyet Ikunaga és munkatársai írtak le 2011-ben és a *Nocardia* nemzetség tagja. Jelenleg nem ismerünk más törzseket, melyek képesek lennének a DON toxin biodegradációjára. Shima és munkatársai által 1997-ben leírt *Agrobacterium sp.* törzsről nem publikáltak 1997 óta, mely alapján feltételezhető a törzs mikotoxinbontó aktivitásának eltűnése.

A fumonisin-B1 detoxifikációja az eddigi tudományos eredmények alapján legalább két enzimes lépésben történik: elsőként a de-észterifikációnak kell megtörténnie, majd egy de-aminációs lépés szükséges (HEINL ET AL., 2010). Eddig mindösszesen DUVICK és munkatársai írtak le 1998-ban az FB1 metabolizálására képes törzseket: *Exophiala spinifera*, *Rhinocladiella atrovirens* és egy a *Sphingomonas* vagy *Xanthomonas* nemzetségbe tartozó izolátum, ATTC 55552. 2005-ben TÄUBEL egy FB1 metabolizációjára képes *Sphingopyxis* sp. MTA144 jelű törzset írt le. Eme baktérium által termelt enzimek vizsgálatát taglalja HEINL és munkatársai (2010) által készített cikk. Ezen kívül BENEDETTI és munkatársai 2006-ban izoláltak *Delftia/Comamonas* csoportba tartozó baktériumot, melyet NCB 1492 kóddal láttak el.

2.5. sz. táblázat: A mikotoxinok bontására képes mikroszervezetek összefoglalása

Toxin	Mikroszervezet	Forrás
AFB1	*Nocardia corynebacteroides (Flacobacterium aurantiacum)*	CIEGLER ET AL., 1966
	Mycobacterium fluoranthenivorans	HORMISCH ET AL., 2004
	Corynebacterium rubrum	MANN ÉS REHM, 1977 SHIH ÉS MARTH, 1975
	Rhodococcus erythropolis	TENIOLA ET AL., 2005
	Aspergillus parasiticus	WU ET AL., 2009
	Bacillus subtilis UTBSP1	FARZANEH ET AL., 2012
ZEA	*Rhizopus sp.*	KAMIMURA, 1986
	Gliocladium roseum	EL-SHARKAWY ÉS ABUL-HAJJ, 1988
	Absidia coerulea *Absidia spinosa* *Aspergillus niger* *Fusarium oxisporum, F. avenaceum* *Mucor bainieri* *Penicillum stipitatum* *Streptomyces griseus, S. rutgersensus, S. rimosus*	EL-SHARKAWY ÉS ABUL-HAJJ, 1988
	Rhizopus arrhizus	EL-SHARKAWY ÉS ABUL-HAJJ, 1988
	Fusarium sp.	PLASENCIA ÉS MIROCHA, 1991 BERTHILLER ET AL., 2009
	Clonostachys rosea	TAKAHASHI-ANDO ET AL., 2004
	*Clonostachys rosea zdh*101 génje transzformálva - *E. coli* baktériumba - *Saccharomyces cerevisiae* élesztőbe - rizsbe	TAKAHASHI-ANDO ET AL., 2004
	Trichosporon mycotoxinivorans	MOLNÁR ET AL., 2004 VEKIRU ET AL., 2010
	Kevert baktériumtenyészetek	MEGHARAJ ET AL., 1997 MORTENSEN ET AL., 2006 YUKSEL ET AL., 2005
	Rhizopus stolonifer, R. oryzae, R. microsporus	VERGA ET AL., 2005
	Pseudomonas putida ZEA-1	ALTALHI, 2007 ALTALHI ÉS EL-DEEB, 2009
	Acinetobacter sp. SM04	YU ET AL., 2011
T-2	*Butyrvibrio fibrisolvens*	WESTLAKE ET AL., 1987
	Selenomonas ruminantium	WESTLAKE ET AL., 1987
	Anaerovibrio lipolytica	WESTLAKE ET AL., 1987
	Curtobacterium sp.	UENO ET AL., 1983
OTA	*Phenylobetarium immobile*	WEGST ÉS LINGENS, 1983
	Acinetobacter calcoaceticus	HWANG ÉS DRAUGHON, 1994
	Trichosporon mycotoxinivorans	SCHATZMAYER ET AL., 2003
DON	*Nocardioides* sp. WSN05-2	IKUNAGA ET AL., 2011
	Agrobacterium sp.	SHIMA ET AL., 1997
	Eubacterium sp.	BINDER ET AL., 1997
Fumonizinek	*Delftia/Comamonas*	BENEDETTI ET AL., 2006
	Sphingopyxis sp. MTA144	TÄUBEL, 2005
	Exophiala pinifera	DUVICK ET AL.,1998
	Rhinocladiella atrovirens	
	Bacterium ATTC 55552	

2.8 A *Rhodococcus* nemzetség jellemzése

Kutatásom során leginkább a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó mikroszervezetek mikotoxinbontó képességét vizsgáltam. A *Rhodococcus* nemzetség tagjai gyakran jelen vannak különböző élőhelyeken: talajban, vízben, tengervízben, és van közöttük növényi, emberi és állati kórokozó is (GOODFELLOW ET AL., 1998). Napjainkig a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó 37 fajból (2.6. sz. táblázat) 2 esetében mutattak ki patogenitást: a növénypatogén *R. fascians* a növények abnormális növekedését okozza, míg a *R. equi* légzőszervi megbetegedést vált ki mind az ember, mind a lovak esetében (GOETHALS ET AL., 2001).

2.6. sz. táblázat: Az eddig leírt *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó fajok

Faj	Közeg, amiből izolálták	Referencia
R. aetherivorans	Vegyi hulladékot kezelő bioreaktor iszap	GOODFELLOW ET AL., 2004
R. artemisiae	*Artemisia annua –ról izolált*	ZHAO ET AL., 2012
R. baikonurensis	Az orosz űrállomás levegője	LI ET AL., 2004
R. canchipurensis	mészkő meddőből izolált	NIMAICHAND ET AL., 2013
R. cerastii	levélről izolált	KÄMPFER ET AL., 2013
R. cercidiphylli	Avar minta	LI ET AL., 2008
R. coprophilus	Növényevő bendőtartalom, eleveniszap hab	ROWBOTHAM ÉS CROSS, 1977
R. corynebacterioides	Levegő útján szennyezett táptalaj	YASSIN ÉS SCHAAL, 2005
R. equi	Talajban széles körben elterjedt	GOODFELLOW ÉS ALDERSON, 1977, 1979
R. erythropolis	Talaj, eleveniszap hab	GOODFELLOW ÉS ALDERSON,1977, 1979
R. fascians	*Chrysanthemum morifolium*	GOODFELLOW, 1984, KLATTE ET AL., 1994
R. qingshengii	Szennyezett terület	XU ET AL., 2007
R. globerulus	Talaj	GOODFELLOW ET AL., 1982
R. gordoniae	Halálos pneumóniás páciens véréből	JONES ET AL., 2004
R. imtechensis	Növényvédőszerrel szennyezett terület	GHOSH ET AL., 2006
R. jialingiae	Karbendazim tartalmú szennyvízből	WANG ET AL., 2010
R. jostii	Középkori sír csontmaradványairól	TAKEUCHI ET AL., 2002
R. koreensis	Ipari szennyvíz	YOON ET AL., 2000A
R. kroppenstedtii	Himalájai hideg sivatag	MAYILRAJ ET AL., 2006
R. kunmingensis	Növényi rizóbiumból	WANG ET AL., 2008
R. kyotonensis	Rizóbiumból	LI ET AL., 2007
R. maanshanensis	Talaj	ZHANG ET AL., 2002
R. marinonascens	Tengeri üledék	HELMKE ÉS WEYLAND, 1984
R. nanhaiensis	Tengeri üledék	LI ET AL., 2012
R. opacus	Talaj	ALVAREZ ET AL., 1996, KLATTE ET AL., 1994
R. percolatus	2,4,6-trichlorofenollal dúsított tápközeg	BRIGLIA ET AL., 1996
R. phenolicus	Űrközpont bioprocesszor	REHFUSS ÉS URBAN, 2005
R. pyridinivorans	Ipari szennyvíz	YOON ET AL., 2000A
R. rhodnii	Egy bogár béltartalmából	GOODFELLOW ÉS ALDERSON, 1977, 1979
R. rhodochrous	Talaj	TSUKAMURA, 1974, ZOPF, 1891
R. ruber	Talaj	GOODFELLOW ÉS ALDERSON, 1977, KRUSE, 1896
R. triatomae	Vérszívó bogárból	YASSIN, 2005

R. trifolii	levélről izolált	KÄMPFER ET AL., 2013
R. tukisamuensis	Talaj	MATSUYAMA ET AL., 2003
R. wratislaviensis	Talaj	GOODFELLOW ET AL., 2002
R. yunnanensis	Erdei talaj	ZHANG ET AL., 2005
R. zopfii	Toluol/fenol -t kezelő bioreaktor	STOECKER ET AL., 1994

A nemzetség tagjai közeli rokonságban vannak a *Corynobacterium, Mycobacterium, Nocardia, Gordonia, Tsukamurella, Dietzia* és *Turicela* taxonok képviselőivel, továbbá sejtfaluk nagy mennyiségben tartalmaz mikolinsavakat, amelyek segítségével a hidrofób szennyezőanyagokhoz jobban hozzáférnek (JARLIER ÉS NIKAIDO, 1994; LARKIN ET AL., 2006). A *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó törzsek eddig leírt biodegradációs képességét 2. számú mellékletben mutatom be. Egy *Rhodococcus erythropolis* törzsről Teniola és munkatársai (2005) írták le az AFB1 bontó képességet. A biodegradációs képességekkel párhuzamosan képesek bonyolult szerves molekulák előállítására, termelésére is (amidok, polimerek). Az ipari alkalmazások terén már van olyan *Rhodococcus* törzs, amellyel akrilamidot termeltetnek acetonitrilből (YAMADA ÉS KOBAYASHI, 1996).

A *Rhodococcus* fajokat a katabolitikus sokoldalúság mestereinek tartják, köszönhetően hatalmas enzimrendszerüknek, amellyel szokatlan szervesanyagok hasznosítására is képesek. Katalitikus diverzitásuk a sokféle és különleges anyagokat (xenobiotikumok) átalakító enzimeknek, mint oxigenázok, dioxigenázok, dehidrogenázok, hidrolázok és halogenázok. A prokarioták között nagyméretű genomban tárolják (7–9,7 Mb) mindezen tulajdonságokat, amely mellett a kromoszómán kívül lineáris plazmidokon is kódolnak információt és ezek az extrakromoszómális elemek a rekombinációban és a horizontális géntranszferben játszanak szerepet (LARKIN ET AL., 2005). Képesek természetes emulgeáló anyagok szintézisére, sejtfaluk ellenálló, katabolit represszióju hiányzik, oldószer toleranciájuk jelentős. A 2. számú mellékletben található táblázatban biodegradációs folyamatokban résztvevő enzimek és azokat kódoló géneket foglaltam össze. A *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó fajok eddigi genom meghatározásai alapján (7 db) rendkívül sok oxigenáz enzimmel rendelkeznek. Adott faj akár 100-300 különböző oxigenáz enzimet is tartalmazhat. Ennek következtében az aromás vegyületek lebontásához is különböző útvonalakat és enzimeket használnak. Az aromás vegyületek lebontási útvonalait a *Rhodococcus* törzsek esetében perifériku és centrális lebontási útvonalakra lehet szétválasztani. A perifériku útvonalakból legalább 26 db létezik, a centrális útvonalakból eddig 8 db-t azonosítottak a *Rhodococcus* fajok esetében. A perifériku útvonalak esetében nincs pontosan feltárva az eddigi 26 útvonal. A legismertebbek a bifenil, etilbenzol lebontási útvonal, valamint a ftalát és tereftalát perifériku lebontási útvonal. Centrális lebontási útvonalak az alábbiak: béta-ketoadipát útvonal, fenilacetát

útvonal, gentizát útvonal, 2-hidroxipentadionát útvonal, homogenizát útvonal, hidroxikvinol útvonal, homoprotokatekvát útvonal, hidroxiláz útvonal és extradiol útvonal.

A fent felsorolt változatos metabolikus képességeikkel, robosztus sejtfelépítésükkel, hidegtűrésükkel, valamint a katalitikus represszió hiányával egyre nagyobb figyelmet kapnak a környezetvédelem területén, hiszen igen jelentős szerepet játszanak az aromás szénhidrogének, klórozott fenolok, szterolok, lignin, kőszén, nyersolaj és peszticidek átalakításában, lebontásában (MARTINKOVA ET AL., 2009). Emellett az ipar, a biotechnológia (AISLABIE ET AL., 2006), a gyógyszeripar (TREADWAY ET AL., 1999) és a hulladékhasznosítás (VAN DER GEIZE ET AL., 2004) területén is növekszik az érdeklődés ezen mikroszervezetek iránt, mint értékes enzim gyárak.

A *Rhodococcus* nemzetségből külön kiemelném a *R. pyridinivorans* fajt, mivel a doktori munkám egyik jelentős részét képezi. A *Rhodococcus pyridinivorans* típustörzsét eredetileg Koreában izolálták, mint extrém hatékony piridin bontó coryneform baktériumot. Ez az izolátum a későbbiekben új fajként lett identifikálva a *Rhodococcus* nemzetségen belüli *R. rhodochrous* klád tagjaként (YOON ET AL., 2000). *R. pyridinivorans* törzsek számos aromás vegyület bontására képesek: piridin, bifenil, sztirén és BTEX vegyületek (SUN ET AL., 2003; JUNG ET AL,. 2004; JUNG ET AL., 2005, YOON ET AL, 2000). Ez idáig a mikotoxinbontó képességet a faj esetében nem írtak le a szakirodalomban.

2.9 Egyéb vizsgálatba vont nemzetségek jellemzése

Az alábbi fejezetben azon mikroorganizmus nemzetségeket mutatom be, amelyeket a kutatásom során vizsgáltam.

2.9.1 *Cupriavidus* nemzetség

A *Cupriavidus* nemzetség kemoorganotróf és fakultatív kemolitotróf baktériumokból áll, amelyek számos változatos élőhelyen megtalálhatóak, mint a talaj, vízi környezet, gyökérgumók és humángyógyászati eszközök. A *Cupriavidus* nemzetség jelenleg 14 fajból áll, a nemzetség típustörzse a *C. necator*. A környezeti izolátumok általában jelentős nehézfém toleranciával jellemezhetőek (GORIS ET AL., 2001; JANSSEN ET AL., 2010), és néhány faj fontos xenobiotikum bontó képességgel bír (PÉREZ-PANTOJA ET AL., 2008; CUADRADO ET AL., 2010; LYKIDIS ET AL., 2010).

Cupriavidus basilensis fajt eredetileg egy 2,6-diklorofenol bontó törzsként izolálták (STEINLE ET AL., 1998). A fajhoz tartozó más izolátumok szintén széles körben képesek különböző xenobiotikumok lebontására, mint furfural, 5-hidroximetil furfural (KOOPMAN ET

AL., 2010), biszfenol-A (FISCHER ET AL., 2010), klórfenolok (ZILOUEI ET AL., 2006) és atrazin (STAMPER ET AL., 2002). A *Cupriavidus* nemzetségbe tartozó törzsek biodegradációs képességét a 2.7. számú táblázatban mutatom be. Eddig a nemzetségbe tartozó törzsek egyikénél sem vizsgálták azok mikotoxinbontó képességét.

A mai napig négy *Cupriavidus* genom projektről tudunk az alábbi fajok esetében: *C. necator*, *C. metallidurans*, *C. pinatubonensis* és *C. taiwanensis* (TREFAULT ET AL., 2004, POHLMANN ET AL., 2006; AMADOU ET AL., 2008; JANSSEN ET AL., 2010; LYKIDIS ET AL., 2010; POEHLEIN ET AL., 2011).

A nemzetség genom mérete 6,5–8,5 Mbp között változik (POHLMANN ET AL., 2006), amely alapján elmondható, hogy a prokariótákhoz képest nagyméretű genommal rendelkező nemzetségről beszélünk. A genom szekvenciák alapján állítható, hogy jelentős katabolitikus potenciállal rendelkezik a faj, mivel számos aromás gyűrű hasításért felelős útvonalat sikerült azonosítani: katekol és protokatekol orto-helyzetű gyűrűhasításért felelős útvonal, katekol meta-helyzetű gyűrűhasításért felelős útvonal, gentizát és a homogentizát útvonal, hidroxikvinol útvonal, és a benzol-CoA útvonal (TREFAULT ET AL., 2004) .

A törzs nehézfémekkel terhelt környezetben történő túléléséért számos, a nehézfémek transzportjáért és detoxifikálásáért felelős fehérjét kódoló génszakaszt sikerült azonosítani, mint a réz-cink-kadmium-króm toleranciáért felelős fehérjék (*copCD*, réz kísérő fehérjék) és a nehézfém efflux pumpák (réz /nehézfém efflux P-típus ATPázok és CzcA családba tartozó nehézfém efflux pumpák) (TREFAULT ET AL., 2004).

2.7. sz. táblázat: A *Cupriavidus* nemzetség tagjainál eddig leírt biodegradációs képességek és feltárt enzimek, gének

Faj	Közeg, amiből izolálták	Biodegradált vegyület	Eddig azonosított enzimek és gének	Teljes genom projekt
C. alkaliphilus (ESTRADA-DE LOS ET AL., 2012)	alkalikus talajból	n.a.	n.a.	n.a.
C. basilensis (STEINLE ET AL., 1999)	Laboratóriumi bioreaktor	2,6-diklórfenol (STEINLE ET AL., 1998) furfural, 5-hidroximetil furfural (KOOPMAN ET AL., 2010) biszfenol-A (FISCHER ET AL., 2010) klórfenolok (ZILOUEI ET AL., 2006) atrazin (STAMPER ET AL., 2002)	furfural degradáló gén klaszter (KOOPMAN ET AL., 2010)	n.a.
C.campinensis (GORIS ET AL., 2001)	Cink szennyezett terület	n.a.	n.a.	n.a.
C. gilardii (COENYE ET AL., 1999)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
C.laharis (Sato et al., 2006)	Vulkáni hamu, Fülöp sziegetk, Pinatubo vulkán	n.a.	n.a.	n.a.
C. metallidurans (GORIS ET AL., 2001)	Cink gyár dekantáló tartály	n.a.	n.a.	Igen
C. necator (DAVIS, 1969) (MAKKAR ÉS	talaj	Klórozott aromás vegyületek: halobenzoátok és nitrofenolok	benzoát 1,2-dioxigenáz (MORIMOTO ET AL., 2005)	Igen

CASIDA, 1987)			klorokatekol degradatív operon (OGAWA ÉS MIYASHITA, 1999)	
C. numazuensis (KAGEYAMA ET AL,. 2005)	Természetes talaj, Japan	n.a.	n.a.	n.a.
C. oxalaticus (SAHIN ET AL., 2000)	kertészeti talaj	n.a.	n.a.	n.a.
C.pampae (CUADRADO ET AL., 2010)	Argentina, Nedves Pampa	n.a.	n.a.	n.a.
C. pauculus (VANDAMME ET AL., 1999)	emberi légcső	patogen n.a.	n.a.	n.a.
C. pinatubonensis (SATO ET AL., 2006)	Vulkáni hamu, Fülöp sziegetk, Pinatubo vulkán	Klórozott aromás vegyületek: 2,4 d	n.a.	Igen
C. respiraculi (COENYE ET AL., 2003)	*cystic fibrosis*-ban szenvedő beteg tüdejéből	n.a.	n.a.	n.a.
C. taiwanensis (CHEN ET AL., 2001)	*Mimosa pudica* gyökérgumó (Tajvan)	Fenol, triklóretilén (CHEN ET AL., 2004)	acetil-KoA reduktáz (CHIEN ET AL., 2010)	Igen

2.9.2 *Pseudomonas* nemzetség

A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó fajok aerob, Gram negatív baktériumok, a talajmikroorganizmusok egyik legdominánsabb nemzetsége, amelyeket nagy hatékonysággal alkalmaznak különböző szerves vegyületek biodegradációja során. Különösen alifás, aromás és poliaromás szénhidrogének bontását írták le. Effektív bontási képességüket genetikai tulajdonságainak köszönhetik, mivel a degradációt egy rendkívül stabil metabolikus plazmid vezéreli. Ez a plazmid irányítja az összes degradációs utat az aromás vegyületek bontása során is (OLSEN ÉS ARBOR, 1985). A *Pseudomonas putida* ZEA-1 izolátum esetében Altalhi és munkatársai irtak le (2007, 2009) zearalenon bontó képességet.

2.9.3 *Pseudoxanthomonas* nemzetség

A *Pseudoxanthomonas* nemzetség tagjai Gram negatív, pálcika alakú mikrobák, amelyek rendelkeznek a *Xanthomonas* fajok és a *Stenotrophomonas* fajok tulajdonságaival, ám azoktól eltérő tulajdonságaik miatt, mint pl.. a nitritet dinitrogén-oxidra redukálják (THIERRY ET AL., 2004), könnyű az elkülönítésük. A környezeti, főként a hőmérsékleti változásokkal szemben ellenállóak (WANG ET AL., 2010). Alkalmasak poliaromás szénhidrogének és poliklórozott bifenilek biológiai bontására, bár a szénforrást csak korlátozottan képesek hasznosítani. Oxigenáz enzimjeiknek köszönhetően néhány *Pseudoxanthomonas* faj alkalmas monoaromás szénhidrogén vegyületek bontására is (KIM ET AL., 2008); sőt, képes a peszticidek, köztük a DDT bontására is (WANG ET AL., 2010). Mindezidáig nem vizsgálták eme nemzetség mikotoxinbontó képességét.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Vizsgálatba vont mikroszervezetek

A vizsgálatokba vont törzsek egy része saját izolátum, másik része több különböző törzsgyűjteménybe tartozik: Agruniver Holding Kft. törzsgyűjtemény, SZIE KKB Tanszék törzsgyűjtemény, nemzetközi törzsgyűjtemények valamint magánszemélyek törzsei (4.1 táblázat). A törzsek egy részét a szénhidrogénekkel szennyezett területekről és mátrixokból (pl: talaj, talajvíz, szennyvíz, komposzt, biofilm) izoláltuk. A kiválasztott és vizsgálatba vont mikroszervezetek legtöbbjének jellemzője, hogy saját vizsgálataink vagy irodalmi adatok alapján jó szénhidrogén- vagy más xenobiotikum-bontó képességgel rendelkeznek.

3.1.1 Molekuláris taxonómiai vizsgálat

A tanszéki gyűjteményben található törzsek jelentős része korábban csak parciális 16S rDNS (400-500 bázispár) szekvencia alapján lett identifikálva. A pontosabb meghatározáshoz a teljes 16S rDNS szakasz szekvenálását végeztem el az alábbi módszerek alkalmazásával.

3.1.1.1 DNS izolálás

A meghatározni kívánt baktérium törzsből tiszta tenyészetet hozunk létre. A DNS izolálást MoBio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit-tel végeztem (MoBio Laboratories Inc., USA) a gyártó által megadott protokoll szerint.

3.1.1.2 DNS-detektálás agaróz gél-elektroforézissel és koncentráció vizsgálata

A kapott genomiális DNS detektálásához 1%-os agaróz gélt öntöttem, amely a következőket tartalmazta: 1 g agaróz, 10 ml tízszeres TBE, 90 ml MilliQ H_2O, és 3 µl etídium-bromid (10 mg/ml). A gél zsebeibe 5 µl DNS-mintát és 3 µl töltőpuffert (30 v/v % glicerin, 0,25 mM brómfenolkék) töltöttem, illetve az első zsebbe 3 µl markert (Fermentas, GeneRuler™ DNA Ladder mix SM0331) pipettáztam. A gélt 1xTBE pufferben (TRIS-bázis 10,78 g/l; bórsav 5,5 g/l; EDTA 0,74 g/l; pH=8,3) 80 V-on 2 óráig futtattam. A kapott genomiális DNS tisztaságát és koncentrációját nanofotométer segítségével ellenőriztem.

3.1.1.3 16S rDNS PCR reakció

A genomiális DNS-t a továbbiakban 16S rDNS génre specifikus polimeráz láncreakció templátjaként alkalmaztam. A reakcióhoz az univerzális 16S rDNS primereket használtam: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3), 519r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'), 1492r (5'-TACGGGTACCTTGTTACGACTT-3'), és 519f (5′-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3′) (Invitrogene, UK). Steril PCR csövekbe 5 µl tízszeres

PCR puffert (Fermentas), 3 µL 2mmol/l $MgCl_2$-ot (Fermentas), 0,5 µmol/l forward és 0.5 µmol/l reverse primert, 1 U Taq DNS polimerázt, 10 µl dNTP-t (Fermentas), 2 µl templátot és annyi desztillált vizet pipettáztam, hogy a végső térfogat 50 µl legyen. Ezután a PCR csövek tartalmát kémcsőkeverő segítségével összekevertem, majd lecentrifugáltam. A PCR reakciót Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Németország) PCR készülékkel végeztem.

A hőprofil összeállítása:

▪ 98°C	5 perc	Preinkubáció	
▪ 94 °C	30 mp	Primer anneláció	35 ciklus
▪ 54°C	30 mp	Extenzió	
▪ 72°C	1 perc	Denaturáció	
▪ 72°C	10 perc	Végső extenzió	
▪ 4°C	∞	Hűtés	

A PCR reakció után a megfelelő fragmentek jelenlétét agaróz gél-elektroforézissel detektáltuk a 3.2.2 fejezetnek megfelelően.

3.1.1.4 A PCR termék tisztítása

A DNS tisztítása Viogene Kittel (Advanced PCR Clean Up System) történt a gyártó által megadott protokoll szerint. A tisztítás lényege, hogy a 100bp–10kb méretű DNS fragmentek kaotrópikus sók jelenlétében a szilika alapú membránhoz kötődnek, majd több tisztítási fázist követően, amelyek során lemossuk a felesleges sókat, primereket, dNTP-t, eluáljuk a fragmenteket a membránról. A tisztított DNS-t 30 perces agaróz gél-elektroforézissel detektáltuk a 3.2.2 fejezetnek megfelelően.

3.1.1.5 Bázissorrend meghatározás

A szekvenáló reakció

Munkám során Sanger féle dideoxi láncterminációs szekvenálási módszert alkalmaztam. A tisztított DNS-t ezután BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit felhasználásával szekvencia analízisnek vetettem alá. Steril PCR-csövekbe a következőket mértem: 2 µl BigDye Terminator, 3 µl puffer, 1 µl 519r primer (5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3'), 8 µl desztillált H_2O, 6 µl tisztított DNS. A csöveket Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) PCR készülékbe tettem.

A hőprofil a következő volt:

▪ 96^0C	10 mp	28 ciklus
▪ 50^0C	5 mp	

- 60^0C 4 perc
- 4^0C ∞

A szekvenáló termék tisztítása etanol-precipitációval

A PCR termékhez hozzámértem 3 µl 3 M Na-acetát oldatot (pH=4,6), 62,5 µl 96 %-os etanolt, 14,5 µl desztillált H_2O-t. A reakcióelegyet kémcsőkeverővel összekevertem, majd 10 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. A mintákat centrifugáltam (4600 rpm; 20 perc; 4^oC), majd a felülúszót óvatosan leszívtam. A pelletre 180 µl 70%-os etanolt mértem, ezután kémcsőkeverővel összekevertem. Ismét centrifugáltam a mintát (4600 rpm; 20 perc; 4^oC), majd a felülúszót eltávolítottam. Végül a mintákat vákuum centrifugán kiszárítottam (15-20 perc). A mintákat 20 µl Hi-Di (High Density) formamidban vettem fel, majd a csöveket 4^oC-on inkubáltam 12 órán keresztül.

Kapilláris gélelektroforézis

A mintákat ezután kapilláris-elektroforézisnek vetettem alá az Applied Biosystems® ABI 310 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) segítségével.

3.1.1.6 Szekvencia analízis

A kapott szekvenciákat a MEGA3 program segítségével dolgoztam fel. A szekvenciákat GenBank adatbázis, illetve a BLAST algoritmus segítségével azonosítottam.

3.1.2 A vizsgált mikrobák tenyésztéséhez felhasznált táptalajok, tápoldatok

A törzsek tenyésztéséhez TGE (Tripton-Glükóz-Élesztőkivonat), TGE5 és LB (Luria-Bertani) táptalajokat és tápoldatokat használtam, amelyek közül a szénhidrát(glükóz)-mentes LB táptalaj és tápoldat volt a legmegfelelőbb.

Kísérletek során használt táptalaj és tápoldat receptek

TGE= tripton 5 g, glükóz 1 g, élesztő kivonat 2,5 g (1 liter desztillált vízre), pH=7

TGE5= tripton 5 g, glükóz 5 g, élesztő kivonat 2,5 g (1 liter desztillált vízre), pH=7

LB = húskivonat 10 g, élesztőkivonat 5 g, NaCl 9 g (1 liter desztillált vízre), pH=7

3.2 Vizsgálatba vont mikotoxinok

A vizsgálatba vont mikotoxinok egyedi tulajdonságaira vonatkozó adatokat a 3.2. sz. táblázatban foglaltam össze.

3.1. sz. táblázat: A Vizsgálatokban felhasznált mikotoxinok adatai

Mikotoxin	AFB1	ZEA	T-2	OTA	FB1	DON
Molekula tömeg (g)	312,2	318,4	466,5	403,8	721,8	296,3
Gyártó	Sigma Aldrich Ltd.	Fermentek Ltd.	Fermentek Ltd.	Fermentek Ltd.	Fermentek Ltd.	Fermentek Ltd.
Tisztaság (%)	>98	>98	>98	>97	>97	>98
Tárolási hőmérséklet (C^o)	+2-8	-20	-20	+4	+4	+4
Forma	Poralakú	Poralakú	Poralakú	Poralakú	Poralakú	Poralakú
Képlet	$C_{17}H_{12}O_6$	$C_{18}H_{22}O_5$	$C_{24}H_{34}O_9$	$C_{20}H_{18}ClNO_6$	$C_{34}H_{59}NO_{15}$	$C_{15}H_{20}O_6$

Mikotoxin törzsoldatok készítése

A szilárd toxinokból analitikai mérleg segítségével a megfelelő mennyiséget kimértem, majd 99%-os acetonban (Reanal Vegyszergyár) oldottam fel, 1 mg/ml-es koncentrációra beállítva a törzsoldat koncentrációját. A kész törzsoldatokat a gyártó által megadott hőmérsékleten (-20°C vagy +4°C) tároltam teflon tetővel fedett 40 ml-es vial edényekben. A törzsoldatok koncentrációjának ellenőrzése kémiai analitikai vizsgálatokkal történt az 3.4 fejezetben leírt módszerek segítségével, amelyeket a Wessling Hungary Kft. akkreditált laboratóriuma végzett (3.3. sz. táblázat). A bontási képességek meghatározásánál a kémiai analitikai eredményekből származtatott adatokat használtam fel a Vak minta koncentrációjához viszonyítva.

3.2. sz. táblázat: A bontási kísérletekhez felhasznált törzsoldatok mikotoxin koncentrációja

Toxin	Beállított koncentráció (acetonban)	Mért koncentráció (3 párhuzamos átlaga)
AFB1	1000 mg/l	1153 mg/l
ZEA	1000 mg/l	871 mg/l
OTA	1000 mg/l	1065 mg/l
T-2	1000 mg/l	1001 mg/l
DON	1000 mg/l	876 mg/l
FB1	1000 mg/l	917 mg/l

A bontási kísérletek során alkalmazott mikotoxin koncentrációk

A mikotoxinbontási kísérletekben alkalmazott toxinkoncentráció meghatározásánál figyelembe vettem a nemzetközi és hazai gyakorlatban használt határértékeket és a szakirodalomban eddig használt koncentrációkat (3.3. sz. táblázat). Több vizsgálat során 2 és 20 mg/l mikotoxin koncentrációkkal dolgoztam.

3.3. sz. táblázat: A takarmányokra vonatkozó mikotoxin határértékek, az eddigi bontási kísérletek mikotoxin koncentrációja a szakirodalom alapján, valamint a saját kísérletekben használt koncentrációk

Mikotoxin	Takarmányoknál megengedett max. határérték	Biodegradációra képes mikróba	Koncentrációk biodegradációs vizsgálatok során (mg/l)	Saját vizsgálatokban használt koncentráció (mg/l)
AFB1	0,02 mg/kg	*Rhodococcus erythropolis*	1,75-2 mg/l (Teniola et al., 2005)	2
		Bacillus subtilis	2,5 mg/l (Farzaneh et al., 2012)	
		Mycobacterium fluoranthenivorans	2,5 mg/l (Hormisch et al., 2004)	
OTA	0,25 mg/kg	*Trichosporon micotoxinivorans*	0,2 mg/l (Molnar et al., 2004)	2 - 20
ZEA	3 mg/kg	*Trichosporon micotoxinivorans*	10 mg/l (Molnar et al., 2004)	2 - 20
		Pseudomonas putida enzim	100 mg/l (Altahi-El-Deeb., 2009)	
T-2	0,5 mg/kg	Anaerob mikroba kultúra	200 mg/l (Young et al., 2006)	2
DON	12 mg/kg	Anaerob mikroba kultúra	100 mg/l (Young et al., 2006)	2
		Nocardioides sp. WSN05-2	1000 mg/l (Ikunaga et al., 2011)	
FB1	60 mg/kg	*Sphyngopyxis* sp. carboxylesteráz enzim, *P. pastoris*-ban termeltetve	10 mg/l, (Taubel et al., 2006)	2

Elsődleges szempontom volt, hogy a szakirodalomban található bontási kísérletekben használt koncentrációknál is működő eddig ismeretlen mikotoxin bontó mikrobákat találjak. A kezdeti, a mikotoxinok bontást vizsgáló kísérletek esetében a 2 mg/l koncentrációval választottam ki azon törzseket, amelyeknél a kontrollhoz képest 50% feletti toxincsökkenést kaptam. Ezt követően a legjobb bontási potenciállal rendelkező törzsek kísérlet utáni maradvány mikotoxin koncentrációit viszonyítottam határértékekhez. A DON és az FB1 esetében a kezdeti vizsgálatok során nem mutatkozott bontás, a toxinok visszanyerése a kísérleti rendszerből a 2 mg/l koncentráció mellett teljes volt, így ennél a két toxinnál későbbiekben nem próbálkoztam más koncentrációval. A kutatásom további vizsgálatai során a ZEA és OTA esetében a 20 mg/l koncentrációnál is néztem a törzsek bontóképességét, mivel az kezelési kísérletekhez (patkány és egér) kis térfogatra kellett magas mikotoxin koncentrációkat beállítanom.

3.3 Mikotoxinbontási kísérletek

A bontási kísérlethez alkalmazott inokulumok előkészítése

A mikotoxinbontási vizsgálatba vont mikrobákat tisztító szélesztéssel szilárd LB tápagarra oltottam tiszta tenyészetekből, amelyeket -80°C-on tároltam. Az így szélesztett törzseket 28°C-on 3 napig inkubáltam, majd ellenőriztem a telepfejlődést és a megfelelő telepekből inokulumot készítettem. Sterilizált oltókaccsal a tiszta telepekből 50 ml folyékony LB tápoldatot oltottam be, amelyet 3 napon keresztül 28°C-on, 170 rpm fordulaton rázó-termosztátban inkubáltam.

A 3 napos inkubációt követően OD600 mérést végeztem IMPLEN nanofotométerrel az inokulum pontos sejtsűrűségének meghatározására. Az inokulumokat egységesen OD600=0,6 értékre állítottam be steril LB tápoldattal történő hígítással.

A kísérlet összeállítása

45 ml folyékony LB tápoldatban (300 ml-es Elenmeyer lombikban) 2-20 mg/l toxin koncentrációkkal dolgoztam. Ennek megfelelően a tömény törzsoldatból 50, 100 vagy 250 µL-t mértem, majd a törzsinokulum sejtsűrűségét OD600=0,6 állítottam be, majd annak 5 ml mennyiségét adtam a lombikhoz. A bontási kísérlet során mindegyik törzsből 3-3 párhuzamos lombikot állítottam kísérletbe. Az összeállított bontási rendszereket 3 napon keresztül inkubáltam, 28°C-on rázótermosztátban, 170 rpm fordulaton. 3 nap elteltével mintát vettem a lombikokban található tenyészeteket. A lombik tartalmának homogenizálását követően 2 ml pipettáztam át 2 ml-es térfogatú Eppendorf csőbe. Majd a csöveket 15000 rpm, 4°C-on centrifugáltam 15 percig és a pellet valamint a felülúszó szétválasztását követően, azokat -20°C tároltam a további vizsgálatokig.

Vizsgálati irányok

Az analitikai vizsgálatokra két módszert alkalmaztam: immunaffinitás oszlopon történő tisztítást követően elvégzett HPLC mérést, valamint mikroplate hordozóra kifejlesztett kompetitív ELISA mérést.

A mikotoxinbontást további vizsgálatokkal ellenőriztem: a sejtkivonatot inkubáltam proteináz-K-val, valamint hőkezeléssel.

Pelleten történő mikotoxin megkötődés vizsgálata

Vizsgáltam a mikrobák felszínén történő toxin megkötődés mértékét is. A bontási kísérletek után a felülúszótól elválasztott biomasszát 1 ml metanolban oldottam, majd

centrifugáltam (15000 rpm, 10 perc 4°C) és az felülúszó toxintartalmát HPLC méréssel detektáltam. A toxinvisszanyerést El-Nazami és munkatárasai (2002) módszere alapján számoltam, ami alapján a visszanyerés mértéke 80-90%.

Proteináz-K vizsgálat az enzimatikus bontás igazolására

A vizsgálat során 3x50 ml LB tápoldatban felszaporítottam az inokulumokat (3 nap,170 rpm), majd centrifugáltam. A pelletet 50 mM TRIS-ben (pH=8) felvettem (30 ml), majd ultrahangos dezintegrátorral 4x 1 percen keresztül feltártam (jégen tárolva). A 3 párhuzamos feltárt pellet oldatot homogenizáltam, majd fehérjetartalmát nanofotométerrel 280 nm hullámhosszon megmértem (spektrofotometriás módszer UV elnyelés alapján). Az oldatokat 3 egyenlő részre osztottam (10-10-10 ml). Az oldatokba a térfogatnak megfelelően 2 mg/l mikotoxin koncentrációt állítottam be. A vizsgálatokat 3-3 párhuzamos beállításban végeztem. Az sejtkivonatot az alábbi kezelésekben részesítettem:

1) PK = Proteináz-K kezelés: 0,1 mg/ml proteináz-K adagolása, majd tárolás 30°C-on, 6 órán keresztül

2) HK = Hőkezelt: hőkezelés 15 perc 100 °C-on, majd inkubálás 30°C, 6 órán keresztül

3) K = Kezeletlen: kezeletlen inokulum, inkubálás 30°C, 6 órán keresztül

A vizsgálatot követően TOXIWATCH ELISA Kit használatával (3.5 fejezetben leírtak alapján) állapítottuk meg az oldatok mikotoxin koncentrációját.

A biodetoxifikációs hatékonyságot a biológiai hatás függvényében értékeltem pro- és eukarióta tesztszervezeteken: (1) getotoxicitás (SOS-Chromo teszt) – az AFB1 esetében, (2) ösztrogénhatás (BLYES teszt) – ZEA esetében. A biodetoxifikációs hatékonyságot állatetetési és állatkezelési kísérletekkel is igazoltam.

3.4 A HPLC mérés leírása

A kémiai analitikai méréseket a Wessling Hungary Kft. akkreditált laboratóriuma végezte. A vizsgálati paramétereket a 3.4. sz. táblázat tartalmazza.

A vizsgálatok során az AFB1 toxinszennyezettséget standard módszerrel állapították meg. Immunaffinitás oszlopos (VICAM-AflaTest) tisztítást és trifluor-ecetsavval történő származékképzést követően folyadékkromatográfiás elválasztás következett (AOAC 990.33). Az eluens víz:acetonitril:metanol (68:16:16) keveréke volt izokratikus áramlással. Az injektálás 100-50-10 µl oldattal történt a HPLC-készülékbe. Az egyes toxin komponenseket C18-as oszlopon (Supelco, 250 mm × 4,6 mm × 5 µm) választották el, 25°C-on, és

fluoreszcens detektorral detektálták (Agilent 1100 HPLC-FLD) 365 nm (emisszió) és 440 nm (extinkció) hullámhosszon.

A vizsgálatok során a ZEA szennyezettséget standard módszerrel állapították meg. Immunaffinitás oszlopos (VICAM-ZearalaTest) tisztítást követően folyadékkromatográfiás elválasztás következett. A metanol-víz 1:1-es keverékben visszaoldott mintából 50 µl mennyiségét injektálták HPLC-készülékbe. Az eluens víz:acetonitril (45:55) keveréke volt izokratikus áramlással. Az egyes toxin komponenseket C18-as oszlopon (Vydec Denali, 4 150 mm x 4,6 mm x 5 µm) 25°C-on választották el és fluoreszcens detektorral (Agilent 1100 HPLC-FLD) detektálták 274 nm (extinkció) és 440 nm (emisszió) hullámhosszon.

A vizsgálatok során a T-2 toxin szennyezettséget Pascale és munkatársai által 2003-ban kifejlesztett módszer alapján állapították meg. Immunaffinitás oszlopon (VICAM T-2test) történő tisztítást és származékképzést követően folyadékkromatográfiás elválasztás következett. A metanol-víz 1:1-es keverékéből álló hígítás után a minta 50 µl mennyiségét injektálták HPLC-készülékbe. Az eluens víz + HCOOH / metanol - HCOOH keveréke volt izokratikus áramlással. Az egyes toxin komponenseket C18-as oszlopon (Restek Ultra II C18; 100 x 2 mm; 3 µm) 25°C-on választották el és tömegspektrometriás detektorral (Agilent 1200 + Agilent TripleQuad 6410 B) detektálták (ionforrás: dynamic MRM).

A vizsgálatok során a DON toxin szennyezettséget standard módszerrel állapították meg. Immunaffinitás oszlopos (VICAM-DONtest) tisztítást követően folyadékkromatográfiás elválasztás következett. A 5:95 arányú acetonotril:víz elegyben oldott mintából 50 µl mennyiségét injektálták HPLC-készülékbe. A mérés gradiens elúcióval, víz és acetonitril eluensekkel történt. Az egyes toxin komponenseket C18-as oszlopon (Vydec Denali, 4 150 mm x 4,6 mm x 5 µm) 25°C-on választották el és diodasoros detektorral (Agilent 1100 HPLC-FLD) detektálták 218 nm hullámhosszon.

A vizsgálatok során a OTA toxin szennyezettséget standard etalon módszerrel állapították meg. Immunaffinitás oszlopos (VICAM-OchraTest) tisztítást követően folyadékkromatográfiás elválasztás következett. A minta 50 µl mennyiségét injektálták HPLC-készülékbe. Az eluens víz:acetonitril:ecetsav (49.5:49.5:1) keveréke volt izokratikus áramlással. Az egyes toxin komponenseket C18-as oszlopon (Vydec Denali, 4 150 mm x 4,6 mm x 5 µm) 25°C-on választották el és fluoreszcens detektorral (Agilent 1100 HPLC-FLD) detektálták 330 nm (extinkció) és 460 nm (emisszió) hullámhosszon.

A vizsgálatok során a FB1 toxin szennyezettséget standard etalon módszerrel állapították meg. Immunaffinitás oszlopos (VICAM-FumoniTest) tisztítást és származékképzést követően folyadékkromatográfiás elválasztás következett. A metanol-víz 1:1-es keverékéből álló hígítás után a minta 50 µl mennyiségét injektálták HPLC-készülékbe.

Az eluens víz:acetonitril (45:55) keveréke volt izokratikus áramlással. Az egyes toxin komponenseket C18-as oszlopon (Vydec Denali, 4 150 mm x 4,6 mm x 5 µm) 25°C-on választották el és fluoreszcens detektorral (Agilent 1100 HPLC-FLD) detektálták 360 nm (extinkció) és 455 nm (emisszió) hullámhosszon.

3.4. sz. táblázat: A toxinbontási kísérletek értékelésénél alkalmazott HPLC módszerek

	Aflatoxin-B1	**Zearalenon**	**T-2 toxin**	**Ochratoxin-A**	**Fumonisin-B1**	**Deoxinivalenol**
Módszer	AOAC Official Methods 990.33	AOAC Official Method 985.18	PASCALE ET AL., 2003	MSZ EN ISO 15141-1:2000	MSZ EN ISO 14352:2004	Vicam DONTest Instruction manual, 1999
Műszer	Agilent 1100 HPLC-FLD	Agilent 1100 HPLC-FLD	Agilent 1200 + Agilent TripleQuad 6410 B	Agilent 1100 HPLC-FLD	Agilent 1100 HPLC-FLD	Agilent 1100 HPLC-DAD
Oszlop	Vydec Denali	Vydec Denali	Restek Ultra II C18; 100 x 2 mm; 3 µm	Vydec Denali	Vydec Denali	Vydec Denali
Eluens	víz:acetonitril :metanol (68:16:16)	víz:acetonitril (45:55)	víz + HCOOH / metanol - HCOOH	víz:acetonitril: ecetsav (49.5:49.5:1)	víz:acetonitri l (45:55)	víz:acetonitril (10:90)
Hullámhossz	extinkció: 365 nm emisszió: 450 nm	extinkció: 274 nm emisszió: 440 nm	ionforrás: ESI detektálás: dynamic MRM	extinkció: 330 nm emisszió: 460 nm	extinkció: 360 nm emisszió: 455nm	218 nm
Meghatározási határ (LOQ)	1 µg/l	10 µg/l	1 µg/l	2 µg/l	2 µg/l	0,1 µg/l
Kimutatási határ (LOD)	0,1 µg/l	2 µg/l	0,2 µg/l	0,3 µg/l	0,1 µg/l	5,0 µg/l

3.5 Az ELISA mérés leírása

Bakteriális sejtfelülúszók mikotoxin koncentrációinak meghatározását kompetitív ELISA méréssel a Soft Flow Kft munkatársaival végeztük. A vizsgálati paramétereket a 3.5. sz. táblázat tartalmazza.

Minta előkészítés: A Soft Flow Biotechnology által forgalmazott TOXIWATCH ELISA Kitek gabonaminták toxin mérésére vannak kifejlesztve, amelyekből a toxin extrakciója 75%-os metanol oldattal történt. A gabona extraktum PBS-sel történő hígítása révén a T-2 és a ZEA méréséné a minta metanol tartalma 7,5%-ra hígul, aflatoxinnál 9,4%-ra. Mivel a metanol – elsősorban fehérjedenaturációs hatása miatt – befolyásolja az antigén-antitest kötődést, a minták mérése csak akkor oldható meg precízen, ha mind a standard sor, mind a mérendő minták azonos mennyiségű metanolt tartalmaznak. Ez az oka, hogy TOXIWATCH ELISA Kitekben a standard sorok metanol tartalma 7,5 illetve 9,4%.

Mivel a bakteriális sejtfelülúszó mátrixa Lysogeny broth (LB) médium, amely nem tartalmaz metanolt, a mérésekhez 2 lehetőség állt rendelkezésemre:

1. Az LB kihígítása megfelelő metanol tartalmú oldattal
2. Metanolt nem tartalmazó standard pontok alkalmazása

A ZEA és T-2 toxin meghatározásánál a mérő rendszer nagyfokú stabilitása miatt az első – méréstechnikailag egyszerűbb – megoldást választottam, és az LB-t 7,5% metanol tartalmú PBS-sel hígítottam a méréshez. Aflatoxin mérésénél a biztosabb eredmény érdekében a standard sort metanol mentes közegben, PBS-ben készítettem el, és a mintákat is tiszta PBS-sel hígítottam. Mivel a minták toxin koncentrációja igen magas volt, 50-1000x-es hígításban estek csak a TOXIWATCH ELISA Kitek méréstartományába.

3.5. sz. táblázat: A TOXIWATCH ELISA Kitek mérési jellemzői (ng/ml) a gyártói útmutatások alapján

	Aflatoxin-B1	**Zearalenon**	**T-2 toxin**	**Ochratoxin-A**	**Fumonisin-B1**
Kimutatási tartomány	0,03-40	1-8	2-16	0,125-4	5-40
Kimutatási határ (LOD)	0,025	0,14	0,10	0,13	14,80
Meghatározási határ (LOQ)	0,04	0,3	2	2	2,95

A jelentős mintahígítás lehetővé tette egyúttal a mátrix hatást, továbbá a 7,5 %-nyi metanol hígulásának elhanyagolását. (Erre utal, hogy a toxint nem tartalmazó LB mérése valóban 0 ppb-nyi eredményt adott.)

Mérés

- Az ELISA lemezt 250 µl WASH oldattal mossuk. (Használat előtt a koncentrátumot 10x-ére hígítjuk.)
- A megfelelő mintahígítást követően bemérjük a standard sor elemeit és a mintákat. AFB1 esetén 75 µl-t, a többi toxinnál 50 µl-t kell bemérni egy well-be.
- Bemérjük a konjugátumot (CONJ). AFB1 esetén 25 µl-t, a többi toxinnál 50 µl-t kell bemérni egy well-be.
- Minden well-be 100-100 µl antitest oldatot pipettázunk.
- A mikrolemezt szobahőmérsékleten sötétben inkubáljuk. AFB1 esetében 1 órán át, ZEA és T-2 toxinnál 15 percig.
- Az ELISA lemezt 250 µl WASH oldattal mossuk 5-ször.
- Bemérünk 150 µl TMB-szubsztrát (SUB) oldatot.
- A mikrolemezt szobahőmérsékleten sötétben inkubáljuk. AFB1 esetében 15 perig, ZEA és T-2 toxinnál 10 percig.

- Bemérünk 50 µl STOP oldatot a reakció leállításához
- 450 nm-en megmérjük az OD értékeket.
- Megrajzoljuk a kalibrációs görbét és kiszámítjuk a minták toxin koncentrációit.

  A multimikotoxin mérésekhez alkalmazott Soft Plex Fungi6-PlexTM kit paramétereit a 3.6. sz. táblázat tartalmazza.

3.6. sz. táblázat: Soft Plex Fungi6-PlexTM kit mérési jellemzői (ng/ml) a gyártói útmutatások alapján

	Aflatoxin-B1	Zearalenon	T-2 toxin
Kimutatási tartomány	0,01-0,64	0,25-16	0,5-32
Kimutatási határ (LOD)	0,1	0,09	0,61
Meghatározási határ (LOQ)	0,06	0,37	1,9

3.6 Mikotoxin-detoxifikációs potenciál vizsgálata

A mikrobák szelektálása egyrészt a mikrobák aktivitására irányul, másrészt a legkevesebb maradék toxicitást eredményező, biztonságos törzsek kiválasztása a cél.

3.6.1 SOS-Chromo teszt

A bakteriális biotesztek közül egy, a vegyületek DNS károsító hatását vizsgáló SOS-Chromo tesztet alkalmaztam a mikotoxinok vizsgálatára.

Ahogy azt az irodalmi áttekintésben bemutattam ebben a módszerben az *E. coli* PQ37 jelzésű törzs esetében a mutagén anyag hatására indukált SOS válaszreakcióval együtt a *β*-galaktozidáz enzim termelésért felelős génszakasz transzkripciója is megtörténik. A módszer során a *β*-galaktozidáz termelődés mellett, amely a genotoxikus potenciálra utal, mérjük az alkalikus foszfatáz aktivitását is, ami a sejt életképességét mutatja. A két enzim aktivitása kolorimetriásan mérhető a megfelelő szubsztrát hozzáadásával. A *β*-galaktozidáz szubsztrátja az 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid (X-gal), amely hidrolízis után intenzív kék színű és 620 nm-en, fotometriásan mérhető; míg az alkalikus foszfatáz enzim a para-nitrofenil foszfát (pNPP) szubsztráttal sárga színreakciót ad, ami 405 nm-en mérhető. A két hullámhosszon mért abszorbancia értékekből (ELx800 – ELISA reader, BioTek Instruments, Inc.) az enzimaktivitások kvantitatívan meghatározhatóak. A *β*-galaktozidáz és az alkalikus foszfatáz relatív koncentrációjából következtethetünk a minta mutagén tulajdonságára. Az eredmények kifejezésére alkalmazható az indukciós faktor (IF), amely a genotoxikus aktivitás kifejezésére szolgál az egyes koncentráció szinteken, és az alábbi képlettel határozható meg:

$$\mathrm{IF}=\frac{A405nk \times A620t}{A405t \times A620nk}$$

ahol, *A405*: abszorbancia 405 nm-en (alkalikus foszfatáz)

A620: abszorbancia 620 nm-en (β-galaktozidáz)

nk: negatív kontroll

t: adott szerkoncentrációjú tesztelt oldat

Szakirodalmi adatok alapján genotoxikusnak számít az a minta, amely egy adott koncentrációban 1,5 vagy annál nagyobb IF értéket mutat (LEGAULT ET AL., 1994).

A teszt alkalmas a direkt genotoxikus hatást kifejtő vegyületek mellett azon toxinok vizsgálatára is, amelyek indirekt módon a szervezet lebontó folyamatai által, metabolitjaik révén fejtik ki káros hatásukat. Ebben az esetben a vizsgálandó kemikáliákat emlős májenzimekkel kezeljük (tesztben: reakcióhoz adagolt S9 mix), a szervezetben végbemenő folyamatok modellezése végett.

Korábbi vizsgálatokban bizonyítást nyert, hogy az SOS-Chromo teszt aflatoxin-bontási kísérletekhez adaptálva, érzékeny 78 ng/ml koncentrációjú AFB1 kimutatására, így az általam beállított AFB1-bontási rendszerek értékeléséhez is alkalmazható. A többi toxin esetében (ZEA, DON, T-2, OCHRA) bár egyes szerzők kimutatták azok mutagén hatását is, korábbi vizsgálatoknál (KRIFATON ET AL., 2010) ezen toxinok esetében csak magas 10 µg/ml koncentrációban indukálták a tesztszervezet SOS-repair rendszerét.

A teszt kivitelezése

Az AFB1 biológiai lebontásának vizsgálata az SOS-Chromo teszttel (Environmental Biodetection Products Inc., Canada) a gyártó által megadott, valamint Krifaton és munkatársai által 2011-ben módosított eljárás szerint történt. A kontrollok és biodegradációs kísérletek mintáinak 10 µl mennyiségét adagoljuk a mikrotiter-lemez megfelelő részeibe, amelyekhez 100 µl tesztszervezetet adagolunk, majd 1,5 órán keresztül inkubáljuk 37°C-on. A megfelelő szubsztrátkeverék (X-gal és pNPP) hozzáadása után újabb inkubáció következik (90 min, 37°C). Végül az abszorbanciát 405 és 620 nm-en mérjük. A vizsgálat során két pozitív kontroll alkalmazásával ellenőrizzük a teszt megfelelő működését. A 4NQO a direkt hatású genotoxinokra alkalmazott kontroll, amely segítségével lehetőség van a teszteredmények standardizálására. A 2-amino-antracén (továbbiakban 2AA) az indirekt genotoxinok vizsgálatakor használatos kontroll vegyület (QUILLARDET ET AL., 1985). Mindezek mellett alkalmazunk egy hígító oldatot tartalmazó negatív kontrollt és egy mikrobamentes kontrollt is. Emellett a biodegradációs kísérletben szereplő mikrobamentes kontroll minták az SOS-Chromo teszt esetében, mint pozitív genotoxikus kontroll szerepeltek.

3.6.2 BLYES teszt leírása

A tesztszervezeteket az amerikai Tennessee Egyetem munkatársai fejlesztették ki és hivatalos együttműködési szerződés keretében Gary S. Sayler professzor, a Center for Environmental Biotechnology vezetője bocsátotta rendelkezésünkre. Ahogyan az irodalmi áttekintésben bemutattam a BLYES tesztszervezet humán ösztrogén receptort tartalmaz, és amennyiben ösztrogénszerű anyaggal kapcsolódik, képes az ösztrogén kötőhelyekhez csatlakozva a plazmidon kódolt lumineszcenciáért felelős gének átírását indukálni. Így a tesztszervezet ösztrogénhatású anyagra biolumineszcencia intenzitással reagál.

Az élesztők szaporításához uracil és leucin szelektív tápoldatot (YMMura-, leu-) alkalmaztam, amelyet 5 további oldattal egészítettem ki: vitamin oldat (amely tiamint, piridoxint, pantoténsavat, inozitolt és biotin oldatot tartalmaz), 20%-os glükóz oldat, L-aszparaginsav oldat, L-treonin oldat és réz-szulfát oldat. A tenyészeteket -80°C-on tároltam a további vizsgálatokig. A BLYES tesztszervezetet 250 ml-es Erlenmeyer lombikban szaporítottam 30 ml tápoldatban, majd termosztátban inkubáltam (30°C, 200 rpm) 24 órán keresztül és sejtsűrűségét 600 nm-en (OD600) 1-re állítottam be (SANSEVERINO ET AL., 2009).

A vizsgálatokat Krifaton és munkatársai (2012) által módosított módszer alapján végeztem, aminek rövid leírása alább látható.

A minták és kontrollok kiadagolása (20 µl/well) után a beállított (OD600=0,1) sejtsűrűségű tesztszervezet 200 µl-ét adagoltuk a mikrotiter-lemez megfelelő részeibe és a mikrotiter-lemezt 30°C-on inkubáltam 5 órán keresztül. Ellenőriztem a kezdő fénykibocsátást, majd óránként mértem VictorX Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer Inc.) segítségével.

A vizsgálatok során pozitív kontrollként a bontási kísérletből (lásd 3.3 fejezet) származó mikrobamentes kontroll (2 µg/ml ZEA) oldatot alkalmaztam; valamint negatív kontrollként a hígításhoz használt metanolt és a tesztszervezetet tartalmazó kontrollt, valamint magát a tesztszervezetet tartalmazó kontrollt alkalmaztam.

A bontási kísérlet felülúszó mintái esetében egy lumineszcencia intenzitási értéket határoztam meg Froehner és munkatársai által kidolgozott (2002), de módosított egyenlet alapján, amely szerint az eredeti egyenlet reciprok értékének alkalmazásával nem biolumineszcencia gátlási, hanem intenzitási értékben adtam meg százalékos arányban a kontrollhoz viszonyított fénykibocsátás változást.

$$\text{Intenzitási érték (\%)} = \left[\left(\frac{Ktx - Mtx}{K}\right) * 100\right] * (-1)$$

ahol *Ktx*: párhuzamos kontroll minták fénykibocsátásának átlagértéke adott kontaktidőnél

Mtx: párhuzamos minták fénykibocsátásának átlagértéke adott kontaktidőnél

Amennyiben a minták több mint 50%-al növelték az alapfénykibocsátását a tesztszervezetnek, úgy azokat ösztrogénhatásúnak tekintettük.

3.7 Állatetetési és állatkezelési kísérletek

Kutatásom során ezen kísérletsorozatok az általam kiválasztott mikroorganizmusok mikotoxinbontó hatékonyságának és alkalmazhatóságának ellenőrzésére szolgáltak.

- A brojlercsirke etetési kísérletet a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozási Tanszéke munkatársaival végeztük el. Állatkísérletekre vonatkozó engedélyszám: Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága által kiadott 3/2012 engedély
- A hal etetési kísérletet a Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszéke és a Szabolcsi Halászati Kft. munkatársaival végeztük. Állatkísérletekre vonatkozó engedélyszám: "Természetes vízi és halastavi kutatások" XIV-I-001/2304-4/2012, "Toxikológiai vizsgálatok halakon" XIV-I-001/2303-4/2012
- A patkány- és egérkezelési modellkísérleteket a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Molekuláris Endokrin Neurobiológia Kutatócsoportjának munkatársaival végeztük. Állatkísérletekre vonatkozó engedélyszám: PEI/001/35-4/2013

3.7.1 Brojlercsirke és hal etetési kísérletek

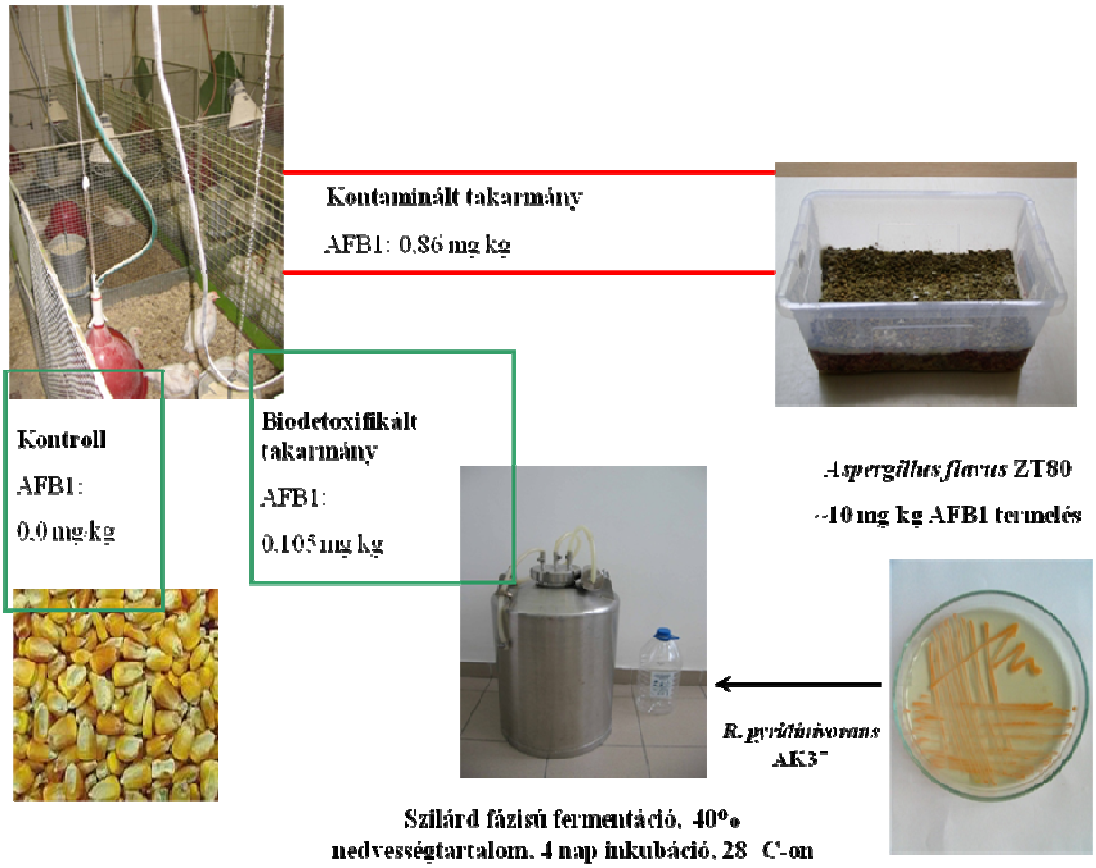
Takarmányminták biztosítása, aflatoxin biodetoxifikáció

A kísérlethez szükséges aflatoxinnal kontaminált kukoricát a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszékén izolált AFB1-termelő *Aspergillus flavus* ZT80 törzzsel állítottuk elő (DOBOLYI ET AL., 2011). A HPLC analitikai vizsgálat adatai szerint 9,87 mg/kg AFB1 tartalmú kukoricát állítottunk elő a ZT80 jelzésű törzs kukoricára oltásával és inkubációjával (21 nap, 30 ^{o}C-on). A kísérletekben ezt a szennyezett kukoricatételt 1 mg/kg AFB1 koncentrációra higítottuk amely az etetési kísérletekben

brojlercsirke és hal takarmányként szolgált („*AFB1*” beállítás). A kísérlet folyamata a 3.1. sz. ábrán látható.

A kontaminált kukoricát toxinbontásra képes mikroszervezettel oltottam be. Ehhez szilárd fázisú fermentációs eljárást használtam, amelyben a 40% nedvességtartalomra beállítottam kukoricadarát inokuláltam. A fermentáció 28C°-on 4 napig tartott, 5 liter/perc aeráció és a nedvességtartalom szinten tartása mellett („*AFB1 + AK37*” beállítás).

Párhuzamosan mikotoxin mentes kukoricadara („*Mikrobamentes Kontroll*” beállítás) inokulálását és kezelését is elvégeztem az AK 37 törzzsel a fentiek szerint („*Kontroll + AK37*” beállítás). A különböző beállításokat 121 ^{o}C-on, 20 percen keresztül sterileztem az etetési kísérletek megkezdése előtt.



3.1. sz. ábra: A brojlercsirke etetési teszt folyamatábrája

3.7.1.1 Brojlercsirke etetési kísérlet leírása

Az etetési kísérlethez 120 db Cobb 500 brojlercsirke kakast állítottunk be.

A kísérleti csoportok kialakításánál az egyes kezelések két ismétlésben (latin négyzet technikával) 15-15 egyed/ismétlés létszámmal lettek beállítva.

- ***Mikrobamentes kontroll*** (n=2x15): AFB1 mikotoxint nem tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport.

- ***Kontroll + AK37*** (n=2x15): AFB1 mikotoxint nem tartalmazó, baktériummal kezelt takarmányt fogyasztó csoport.
- ***AFB1*** (n=2x15): AFB1 mikotoxinnal szennyezett kukoricát tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport. A takarmány számított AFB1 tartalma 1mg/kg.
- ***AFB1 + AK37*** (n=2x15): AFB1 mikotoxinnal szennyezett biodetoxifikációs technikával előkezelt kukoricát tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport.

A kísérlet időtartama 42 nap volt.

Kísérlet értékelésénél az alábbi mérési paramétereket határoztuk meg:

- **Testtömeg**: napos korban, valamint hetente – egyedileg
- **Takarmányfogyasztás**: naponta csoportonként
- **Elhullás**: naponta csoportonként

Az eredmények statisztikai értékelésénél az egyes vizsgált paraméterekből minden esetben kiszámítottuk az átlag, valamint a szórás értékeket. Az egyes kísérleti csoportok közötti különbségeket Student „t" próbával értékeltük. A számításokhoz MS Excel 7.0 programot használtunk.

3.7.1.2 Hal etetési kísérlet leírása

A pontymodell etetési kísérletet a Szabolcsi Halászati Kft. telephelyén kiviteleztük, a gazdaság saját szaporításából származó egynyaras pontyokon. A halak négyféle kukoricát fogyasztottak testtömegük 3%-ában, napi négy részletben, automata etető segítségével. A kísérlet során az alábbi beállítások és csoportmegnevezések lettek kialakítva:

- ***Mikrobamentes kontroll*** AFB1 mikotoxint nem tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport
- ***Kontroll + AK37*** AFB1 mikotoxint nem tartalmazó, baktériummal kezelt takarmányt fogyasztó csoport

- ***AFB1*** AFB1 mikotoxinnal szennyezett (számított AFB1 tartalma 2 mg/kg volt) kukoricát tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport.

  AFB1 + AK37 AFB1 mikotoxinnal szennyezett (számított AFB1 tartalma 2 mg/kg volt) biodetoxifikációs technikával előkezelt kukoricát tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport.

A halakat 2 m^3-es medencékben tartottuk, recirkulációs rendszerben. A kísérleteket 3 ismétlésben végeztük 25-25 egyeddel. Az etetést 5 nap szoktatás után kezdtük meg, 14 napon keresztül.

A tartóvíz paraméterei a következők voltak:

- hőmérséklet: 24± 2,3˚C
- pH=7,3-8,3
- vezetőképesség: 812-1185 µS
- oldott oxigén mennyisége: <70%

A kísérlet ideje alatt naponta mértük a vízminőségi paramétereket, illetve figyeltük az esetleges elhullást és meghatároztuk az elfogyasztott takarmány mennyiségét. A kísérlet elején, illetve végén mértük a halak testtömegét és testhosszúságát. A kísérlet végén a különböző kezeléseken átesett egyedek májából szövettani metszeteket készítettünk és elemeztük a metszeteket.

A hal etetési kísérlet során kórszövettani vizsgálatot is végeztünk. A boncolásokat követően eltávolítottuk a vizsgált egyedek máját, amiket felcímkézett kis üvegekben Bouin folyadékban fixáltunk. 12-16 órás fixálást követően a mintákat 75%-os etilalkoholba helyeztük át a feldolgozásig. A dehidratáció felszálló alkoholsorban történt (75-90%-es etilalkohol), amit xilolos átmosás és paraffinba ágyazás követett. Mikrotóm segítségével 2-5 µm-es metszeteket készítettünk. A metszeteket hematoxilin-eozinnal festettük meg (KRUTSAY, 1980). Az egyes egyedektől származó kórszövettani metszeteket Nikon Eclipse E600 mikroszkóp segítségével vizsgáltuk meg.

3.7.2 Patkánykezelési modell kísérlet

A patkánykezelési kísérletekben a ZEA bontásának hatékonyságát és a bontási termékek élettani hatásait vizsgáltuk. A kezelések során a vizsgálandó anyagokat gyomorszondán juttattuk a kísérleti állatok szervezetébe.

Az kísérlethez 500 µg/ml ZEA koncentrációjú LB tápoldatot a toxin elbontására képes mikroszervezettel oltottam be, amely 28°C-on, 170 rpm rázatással, 5 napon keresztül inkubáltam. Az ötödik napon a kísérleti rendszereket centrifugáltam (15000 rpm, 20 perc, 4°C), majd a felülúszót Edwards Micromodulyo liofilizáló berendezésen beszárítottam és a ZEA koncentrációt HPLC méréssel (3.5 fejezet) ellenőriztettem. A fagyasztva szárított felülúszót oliva olajban vettem fel és az így előkészített mátrix adta az etetési kísérlet egyik takarmányának alapanyagát.

A kísérleti csoportoknak megfelelően a következő beállításokat alkalmaztam:

- ***Kontroll***: ZEA-t nem tartalmazó LB
- ***ZEA***: 500 µg/ml ZEA-t tartalmazó LB
- ***ZEA + K408:*** ZEA-val szennyezett (500 µg/ml) biodetoxifikációs technikával előkezelt minta

A kísérlethez Heneweer és munkatársai (2007) által elvégzett uterotrofikus bioassay-t vettük alapul, ahol három napon keresztül 1 és 10 mg/ testsúly kg ZEA végdózisok hatását vizsgálták DNS microarray és Real-time PCR segítségével.

A modellállatok pubertás előtti nőstény Wistar patkányok voltak, amelyek a KOKI saját tenyésztésű állatai. Az állatokat hármasával tartottuk 21±1°C hőmérsékleten és 65%-os páratartalom mellett, 12 órás megvilágításban (07:00–19:00 óra). Fitoösztrogénmentes táppal és kezeletlen csapvízzel tápláltuk *ad libitum*, 3 napon keresztül. Mindegyik állatra napi rendszerességgel számoltuk ki az etetési dózist, 5 mg/kg ZEA bevittel testsúlyra vetítve. A kezelések során a vizsgálandó anyagokat gyomorszondán juttattuk a kísérleti állatok szervezetébe.

A kísérlet során az uterusz tömegének változását és az uteruszban található markergének expresszálódását vizsgáltuk a kontrollhoz viszonyítva: apelin (APLN), aquaporin 5 (AQP5), komplement komponent 2 (C2), kalbindin-3 (CALB3). Az eredményeket relatív génexpresszióban (RQ – relative quantity) fejeztük ki, ami meghatározza, hogy hányszoros az adott gén expressziója a mintákban. A méréseket a 3.7. számú táblázatban látható marker génekre terveztük.

3.7. sz. táblázat: Zearalenon expozíció által befolyásolt markergének

Gén vagy enzim	Hatása	Kísérlet típusa
apelin (APLN)	Kardiovaszkuláris és immunmodulációs folyamatok	akut
aquaporin 5 (AQP5)	Víz sejtmembránon történő átjutása, simaizom sejtekben és a méh epithel sejtjeiben	akut
komplement komponent 2 (C2)	Glikoprotein a komplement rendszer klasszikus útvonalának egyik tagja	akut
kalbindin-3 (CALB3)	Citoplazma kalciumion koncentrációja és transzportja	akut

3.7.3 Egérkezelési modell kísérlet

A Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (KOKI) által közösen elvégzett etetési kísérletekben mikroszervezet által detoxifikált OTA degradáció

bomlási maradékának élettani hatásait vizsgáltuk. A kezelések során a vizsgálandó anyagokat gyomorszondán juttattuk a kísérleti állatok szervezetébe.

A kísérlet során 20 µg/ml OTA-val kontaminált 10%-os LB tápoldatot a toxin bontására képes mikroszervezettel oltottam be, amelyet 28°C-on, 170 rpm-en, 5 napon keresztül inkubáltam. Az ötödik napon a kísérleti rendszereket centrifugáltam (15000 rpm, 20 perc, 4°C), majd a felülúszót Edwards Micromodulyo liofilizáló berendezésen beszárítottam.

A kísérleti csoportoknak megfelelően a következő beállításokat alkalmaztam:

- ***Kontroll***: ochratoxint nem tartalmazó LB
- ***OTA:*** 20 µg/ml ochratoxint tartalmazó LB
- ***OTA + Őr16:*** ochratoxinnal szennyezett (500 µg/ml) biodetoxifikációs technikával előkezelt minta

A kísérletekhez ivarérett 7-9 hetes hím egereket használtunk (CD1 törzs). Az állatokat az MTA-KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegében tartottuk az etikai és állatvédelmi szabályokat betartva. A kísérleti állatokat ellenőrzött körülmények között tartottuk (hőmérséklet: 21±1°C, páratartalom: 65%, megvilágítás hossza 12 óra/ nap). A táplálék és az ivóvíz hozzáférés *ad libitum* volt.

A kísérleti beállításokat és az állatok kezelését az OECD 407 protokoll ajánlásai alapján végeztük. Az akut kísérletek időtartama 72 óra (n=7-10) (LUHE ET AL., 2003), míg a krónikus kísérletek időtartama 21 nap (n=7-10) (ZELJEZIC ET AL., 2006). A kísérleti állatokat naponta egyszer kezeltük a délelőtti órákban. A kezelések során a vizsgálandó anyagokat gyomorszondán juttattuk a kísérleti állatok szervezetébe. Az akut vizsgálatban az OTA dózisok 1 mg/testtömeg kg, illetve 10 mg/testtömeg kg voltak napi egyszeri beadással. A krónikus toxicitási vizsgálatokat 0,5 mg/testtömeg kg dózisban 21 napon keresztül, napi egyszeri kezeléssel végezzük (n=7-10). A pozitív kontrollként használt metil-metánszulfonátot (MMS) steril csapvízben hígítottuk. A mikrobiálisan bontott ochratoxin-A biodegradációs termékeit tartalmazó liofilizált készítményt 10 mM Tris (pH=8) tartalmú steril csapvízben oldottuk fel. Kontrollként az azonos fenofázisú, OTA mentes bakteriális kultúra liofilizált felülúszóját használtuk, amely tartalmazta a táptalaj maradványait is.

A kísérleti csoportok megnevezése a **72 órás toxicitási kísérletnél**:

- Kontroll (DMSO a nagy dózisú intakt OTA hígításának megfelelően)
- MMS (pozitív kontroll, 100 mg/kg)
- OTA (1 mg/testtömeg kg)

- OTA (10 mg/testtömeg kg)
- Bontott OTA (1 mg/testtömeg kg)
- Bontott OTA (10 mg/testtömeg kg)
- LB-Baktérium (DMSO a nagy dózisú intakt OTA hígításának megfelelően)

A kísérleti csoportok megnevezése a **21 napos krónikus toxicitási kísérletnél:**

- Kontroll (DMSO az intakt OTA hígításának megfelelően)
- MMS (pozitív kontroll, 40 mg/ testtömeg kg)
- OTA (0,5 mg/ testtömeg kg)
- OTA bontott (0,5 mg/ testtömeg kg)
- Tápfolyadék (LB)-baktérium (DMSO az intakt OTA hígításának megfelelően)

A kísérlet során célunk az OTA-nak a vesére, az intakt mikotoxin által leginkább károsított szervre gyakorolt toxicitásának vizsgálata volt. A bomlástermék toxicitását az irodalomban már leírt OTA expozíció által leginkább befolyásolt markergének expressziójának mérésével vizsgáltuk a vese kérgi régiójában (LUHE ET AL, 2003) és relativ génexpresszióban (RQ) adtuk meg. A méréseket a 3.7. számú táblázatban látható cititoxicitási marker génekre terveztük: alfa Gadd45, Gadd153, annexin 2 (Anxa2), ceruloplazmin (Cp), szulfotranszferáz K2 (StK2), clusterin (Clu). A vizsgált markerek úgy lettek kiválasztva, hogy azok az OTA vesekárosító (DNS károsító, apoptotikus, gyulladásos) hatásait tükrözzék:

3.8. sz. táblázat: Ochratoxin-A expozíció által leginkább befolyásolt markergének

Gén vagy enzim	Hatása	Kísérlet típusa
Gadd 45,	DNS károsodás által aktivált marker	Akut és Krónikus
Gadd 153	DNS károsodás által aktivált marker	Akut és Krónikus
Clusterin (Clu)	Apoptotikus folyamatok elindulása (vesedaganat kialakulása)	Akut
Ceruloplazmin (Cp)	Vesegyulladásban és oxidatív stressz során emelkedett expresszió	Krónikus
Szulfotranszferáz K2 (StK2)	Alapvető enzim a sejtek detoxifikációs és celluláris metabolikus folyamataiban	Krónikus
Annexin 2 (anxa2)	Részt vesz a DNS repair folyamatokban, oxidatív stresszt okozó ágensek is képesek aktiválni	Krónikus

3.8 Genom projekt

Az eddigi mikotoxinbontási vizsgálatok eredményei alapján kiválasztottunk két mikroszervezetet, amelyek teljes genom szekvencia analízisét a szegedi Baygen Intézet segítségével végeztük el.

A két kiválasztott törzs:

- ***Rhodococcus pyridinivorans*, AK37**
- ***Cupriavidus basilensis*, ŐR16**

Genomi DNS izolálás tiszta tenyészetből

A folyamat leglényegesebb része a tiszta tenyészet gondos kialakítása volt. Ehhez a *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 és *Cupriavidus basilensis* ŐR16 törzsek -80C°-on fenntartott törzstenyészeteiből LB táptalajra szélesztettem kacshegynyi biomasszát, párhuzamos szélesztéses technikával. A három ismétlésben leoltott LB lemezeket 30°C-on két napig inkubáltam, majd a különálló telepekből 3-3 darabot 25 ml LB tartalmú 200 ml Erlenmeyer lombikba oltottam. Három napos inkubációt követően (170 rpm, 28°C) mindkét folyadékkultúrából háromszor 3 ml mennyiséget centrifugálva (4000 rpm) összegyűjtöttem a megfelelő mennyiségű biomasszát. A DNS izolálást a MoBio által forgalmazott UltraClean Microbial DNA Isolation Kit segítségével végeztem, a gyártó utasításai szerint. A DNS minták tisztaságát és koncentrációját nanofotométer (Implen) segítségével mértem. Ennek alapján a DNS minták tisztasága (A260/A280) mindkét esetben 1,9 feletti értéket mutatott, míg koncentrációja a *R. pyridinivorans* AK37 esetében 210 ng/µl, *C. basilensis* ŐR16 esetében 350 ng/µl volt. A DNS minták minőségét agaróz gélelektroforézis segítségével is ellenőriztem (1%-os agaróz gélben, 5 µl mintát 1 órán keresztül 110 V feszültség mellett futtatva), ez alapján megállapítható volt, hogy a genomi DNS egyik minta esetében sem töredezett szét, így azokból 30-30 µg-ot juttattam el genomi szekvenálásra (Baygen Intézet, Szeged).

A genomszekvencia vizsgálat kombinált ciklikus ligandum szekvenáló berendezéssel történt (SOLiD 4 System-Life Technologies, 454 FLX pyrosequencing-Roche). A szekvencia illesztést CLC Bio Genomics Workbench 4.8 és Omixon Gapped Solid Alignment 1.3.2 program segítségével végezték el, amelyek 416 nagyméretű (200 bp-nál nagyobb) kontigot hoztak létre. A kapott több ezer rövid szekvencia szakaszt bázissorrend-egyezősség szerint számítógép szűkített kisebb számú szekvencia szakaszra, majd pedig a NCBI Prokaryotic

Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) eszköz segítségével történt a genom összeillesztése (HTTP2).

3.9 Statisztikai módszerek

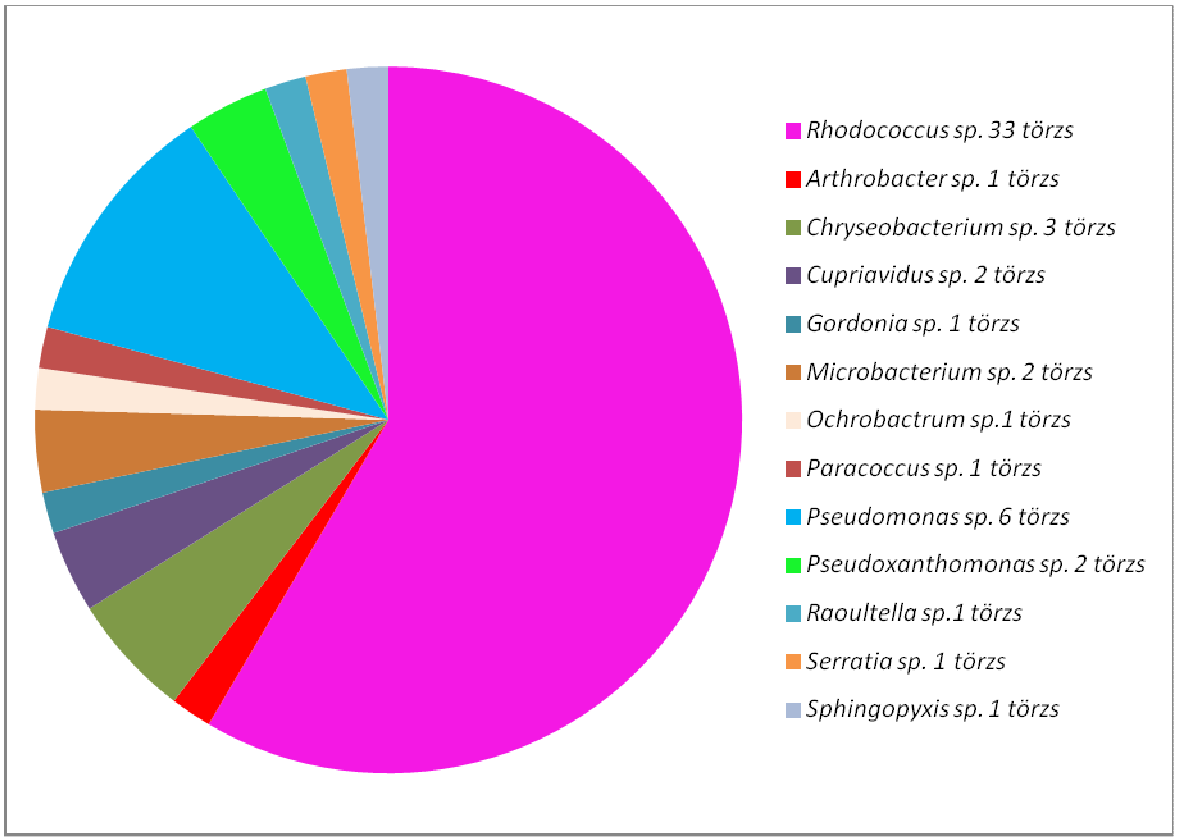
A biodegradációs kísérletek eredményei közötti kapcsolatrendszer vizsgálatát statisztikai módszerekkel végeztem a PAST (HAMMER ET AL., 2001) és Microsoft EXCEL szoftverek felhasználásával.

A korreláció számításával két tetszőleges változó értékei közötti kapcsolat vizsgálható. Amennyiben a két változó értékei között pozitív, szignifikáns korreláció mutatható ki, azt mondhatjuk, hogy a két változó egymástól függő, értékeik között egyenes arányosság áll fenn; amennyiben negatív korreláció áll fenn, úgy a két változó egymástól függő, értékeik között fordított arányosság áll fenn. Amennyiben a két változó közötti korreláció értéke nulla, akkor azok nem korrelálhatóak. A korreláció maximális értéke +1, minimuma -1 lehet. A statisztikai értékelésnél **Pearson–féle korrelációs együtthatót** állapítottam meg. Amennyiben szoros egyenes arányú kapcsolat fedezhető fel a változók között, úgy az együttható 0,6–1 között helyezkedik el, míg szoros fordított arányú összefüggés esetében az együttható (-1)–(-0,6) közötti értéket kapunk (PEARSON, 1896). Munkám során az egyes minták kémiai analitikai (HPLC), immunanalitikai (ELISA) eredményeivel végeztem korrelációszámítást a Pearson-féle korreláció felhasználásával.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Vizsgálatba vont izolátumok identifikálása

A munkám során a *Rhodococcus*, majd más baktérium nemzetségekbe tartozó 55 törzs mikotoxinbontó képességét vizsgáltam, amelyek 13 baktérium nemzetség, 29 különböző fajához tartoznak. Azon mikroszervezetek esetében, amelyek tanszéki (19 db), Dr. Szabó Istvántól származó (3 db) és saját izolátumok (10 db) a fajidentifikálást 16S rDNS szekvencia alapján határoztam meg, a meghatározott bázispárhossz alapján az eredményeket a 3. számú melléklet tartalmazza, amelyhez hozzárendeltem a nemzetközi törzsgyűjteményből származó fajokat és azok gyűjteményi helyét. A 4.1 sz. ábra mutatja, hogy a vizsgált baktériumok nagy része a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozik, ezt követi a *Pseudomonas* nemzetség tagjaihoz tartozó törzsek.



4.1. sz. ábra: A vizsgált baktérium törzsek nemzetség szerinti eloszlása

4.2 Mikotoxin-bontási kísérletek

Munkám során 29 fajhoz tartozó 55 baktérium törzs mikotoxinbontó képességét hat mikotoxin (ZEA, AB1, DON, T-2, FB1 és OTA) esetében vizsgáltam. Analitikai vizsgálatokkal a mikotoxinbontás igazolására – a fizikai adszorpció kizárására – a pellet toxinkoncentráció meghatározása is megtörtént. AFB1 és OTA esetében 2% alatti kötődési arányt, a T-2 és a DON esetében 5% és 10% közötti kötődési arányt, a ZEA-nál 10%, egy esetben 26% kötődési arányt figyeltem meg a kiindulási koncentrációhoz képest. A pellet vizsgálatok eredményét a 4.1. sz. táblázatban mutatom be.

4.1. sz. táblázat: A kontroll mintákhoz viszonyított pelletről visszanyert toxin koncentráció metanolos kezeléssel, EL-NEZAMI ET AL., (2002) módszere alapján

Törzs	Faj	Mikotoxin				
		AFB1	ZEA	T-2	OTA	DON
NI1	*Rhodococcus erythropolis*	<2%	10%	<5%	-	<5%
AK35	*Rhodococcus erythropolis*	<2%	-	-	-	-
GD1	*Rhodococcus erythropolis*	<2%	-	-	-	-
AK37	*Rhodococcus pyridinivorans*	<2%	10%	-	-	<5%
K402	*Rhodococcus pyridinivorans*	<2%	-	-	-	-
K404	*Rhodococcus pyridinivorans*	<2%	-	-	-	-
K408	*Rhodococcus pyridinivorans*	<2%	10%	<10%	-	-
N58	*Rhodococcus gluberulus*	<2%	10%	-	-	<5%
AK 36	*Rhodococcus globerulus*	<2%	-	-	-	-
N361	*Rhodococcus ruber*	<2%	26%	-	-	-
AK38	*Rhodococcus gordoniae*	<2%	-	-	-	<5%
AK44	*Rhodococcus aetherivorans*	<2%	10%	-	-	-
NI2	*Rhodococcus rhodochrous*	<2%	-	<5%	-	-
ATTC 12674	*Rhodococcus rhodochrous*	<2%	-	-	-	<5%
BRB6A	*Cupriavidus basilensis*	<2%	-	%	<2%	<5%
ŐR16	*Cupriavidus basilensis*	<2%	-	<10%	<2%	<5%
NZS6	*Pseudoxanthomonas suwonensis*	<2%	10%	<5%	-	-
NZS9	*Microbacterium esteraromaticum*	<2%	-	<5%	-	-
FEH28	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	<2%	10%	-	-	-
H4	*Pseudoxanthomonas kalamensis*	<2%	5%	-	-	-
Kö10	*Sphingopyxis chiliensis*	<2%	-	-	-	-

- ***; Nem volt vizsgálva***

A mikotoxinbontás enzimatikus igazolására proteináz-K kezeléses vizsgálatot végeztem az alábbi *Rhodococcus* törzsek esetében SMILEY ET AL, 2000 módszere szerint, (az eredményeket a 4.2. számú táblázat tartalmazza):

- AFB1 toxin degradációs vizsgálatot a NI1, GD1, AK37, K408, AK36, NI2, ATTC 12674 törzsek esetében.
- ZEA toxin degradációs vizsgálatot a NI1, AK37, K408 törzsek esetében

- T-2 toxin degradációs vizsgálatot a NI1, GD1, AK36, NI2, ATTC 12674 törzsek esetében

Az sejtkivonatot az alábbi kezelésekben részesítettem:

1) PK = Proteináz-K kezelés
2) HK = Hőkezelt
3) K = Kezeletlen

A vizsgálatot követően TOXIWATCH ELISA Kit használatával (3.5 fejezet) állapítottuk meg az oldatok mikotoxin koncentrációját.

4.2. sz. táblázat: Proteináz-K kezelés mikotoxin degradációra gyakorolt hatása %-ban kifejezve

Törzs	Faj	Mikotoxin								
		AFB1			ZEA			T-2		
		PK	HK	K	PK	HK	K	PK	HK	K
NI1	*R. erythropolis*	18%	<5%	49%	15%	<10%	37%	16%	<5%	51%
GD1	*R. erythropolis*	23%	<5%	43%				17%	<5%	44%
AK37	*R. pyridinivorans*	20%	<5%	41%	13%	<10%	41%			
K408	*R. pyridinivorans*	18%	<5%	40%	14%	<10%	43%			
AK 36	*R. globerulus*	21%	<5%	46%				25%	<5%	40%
NI2	*R. rhodochrous*	15%	<5%	47%				31%	<5%	43%
ATTC 12674	*R. rhodochrous*	16%	<5%	45%				22%	<5%	46%

Mindezek alapján elmondható, hogy az eredményeimben közölt mikotoxinbontási százalékok metabolikus aktivitásnak köszönhetőek.

Az alábbi fejezetekben a vizsgálat mikroszervezetek bontási képességét mutatom be mikotoxinonként.

4.2.1 *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok mikotoxinbontó képessége

Összesen nyolc *Rhodococcus* fajba tartozó harminchárom törzs bontási képességét vizsgáltam hat különböző mikotoxinra. A továbbiakban egy összefoglaló táblázatban (4. számú melléklet), valamint mikotoxinonként külön-külön közlöm a kapott eredményeket. Első lépésben ELISA mérésekre került sor, amelyik törzs esetében 50% feletti bontási potenciált jelzett a mérés, ezen esetekben a HPLC méréssel szintén ellenőriztem a bontási százalékokat. A 4. számú mellékletben lévő táblázat tartalmazza mind a HPLC és ELISA eredményeket, valamint az AFB1 és ZEA esetében a biológiai hatásmérés eredményeit, a statisztikai vizsgálatok alapján Pearson–féle korreláció elemzéssel, szoros egyenes arányú összefüggés mutatható ki a HPLC és ELISA mérések között. A korrelációs együttható az AFB1 és T-2 esetében 0,99, míg a ZEA esetében 0,98 volt.

4.2.1.1 A *Rhodococcus* izolátumok aflatoxin-B1 bontási eredményei

A 4. számú mellékletben látható, hogy a legnagyobb számban az *R. erythropolis* fajba tartozó izolátumok álltak a rendelkezésemre, amelyek mindegyike 50% feletti bontási képességgel rendelkezett. A *R. aetherivorans* és *R. gordoniae* faj 1-1 képviselője 50% feletti, de a 95%-ot el nem érő AFB1 bontást mutatott. A harminchárom *Rhodococcus* törzsből mindössze négy esetében tapasztaltam 50% alatti AFB1 bontást, ezek közül három a *R. ruber* (N361, AK41, 4S-8), egy pedig a *R. globerulus* fajhoz (N58) tartozott, amelyek alacsony biodegradációs kapacitással rendelkeztek. Az analitikai eredmények alapján a *R. pyridinivorans* és a *R. rhodochrous* fajokba tartozó törzsek mutattak kimagasló, közel 100%-os biodegradációs képességet.

Az AFB1 detoxifikációt az SOS-Chromo teszttel vizsgáltam. Ennek eredményeként a harminchárom *Rhodococcus* izolátumból tizenkettő esetében mértem genotoxikus bomlástermékeket, olyan törzsek esetében is, amelyek a HPLC és ELISA eredményeik alapján jó degradációs képességeket mutattak (*R. erythropolis*: DSM1069, IFO12538, L88 és a *R. aetherivorans* AK44). A vizsgált tizenkilenc *R. erythropolis* törzs esetében az 50% feletti degradációs képesség ellenére hét izolátumnál (DSM 743, DSM 1069, IFO 12538, L88, AK40, OM7-2, ZFM 23-1) is genotoxikus hatást tapasztaltam a bontási maradék vizsgálatánál. A *R. aetherivorans* törzs esetében magas bontási képesség mellett szintén genotoxikus bomlásterméket kaptam. Az SOS-Chromo teszt vizsgálat során genotoxikus eredményt mutató törzseket a további kísérletekbe nem vontan be.

Az eredmények és a nemzetközi szakirodalom összevetését követően, sikerült 3 *Rhodococcus* faj izolátumainak esetében *R. globerulus* (AK36), *R. pyridinivorans* (K402, K404, K408, AK37) és a *R. rhodochrous* (NI2, ATTC 12674), valamint az *R. erythropolis* faj további 12 izolátumnál (NI1, DSM 4306, NCAIMB 9784, AK 35, AK 42, GD1, GD 2A, GD 2B, BRB 1AB, BRB 1BB, ŐR 9, ŐR 13) káros metabolitok nélküli AFB1 biodegradációs képességét feltárnom.

4.2.1.2 A *Rhodococcus* izolátumok zearalenon bontási eredményei

Mint az a 4. számú melléklet táblázatában látható, az általam vizsgált harminchárom izolátumból az AFB1 bontási eredményeihez képest jóval kisebb számban figyelhettem meg ZEA degradációs képességet. A *Rhodococcus* fajok esetében hét törzsnél tapasztaltam 50% feletti ZEA degradációt (*R. erythropolis* NI1; *R. pyridinivorans* AK 37, K402, K404, K408; *R. ruber* N361; *R. globerulus* N58). Érdekesség, hogy a rendelkezésre álló törzsek esetében az *R. erythropolis* faj esetében tizenkilenc izolátumból hét esetében, a *R. ruber* faj esetében

három izolátumból egy esetében, és *R. rhodochrous* fajnál két izolátumból egy esetében tapasztaltam bontást, azaz egyes fajokon belül igen eltérő degradációs képességet detektáltam.

A jó bontási képességgel rendelkező törzseket biodetoxifikációs képességét a BLYES tesztrendszerrel ellenőriztem. Az eredmények alapján a hét ZEA bontó törzsből csak az AK37, K402, K404 és K408 jelölésű *R. pyridinivorans* és az NI1 *R. erythropolis* fajba tartozó törzsek biodegradációja nem, vagy kis mértékben eredményezett ösztrogénhatású mellék- ill. közti bomlásterméket.

Szakirodalmi adatok alapján ezidáig a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó fajok esetében nem állapítottak meg ZEA bontó képességet. Munkám során sikerült két *Rhodococcus* faj *(R. pyridinivorans* és *R. erythropolis*) 5 izolátumáról az ösztrogénhatást megszüntető biodetoxifikációt kimutatnom.

4.2.1.3 A *Rhodococcus* izolátumok T-2 toxin bontási eredményei

A T-2 toxin esetében harminchárom törzsből a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok jelentős része, huszonöt izolátum képes volt 50% feletti degradációra. A *R. gordoniae, R. coprophilus, R. rhodochrous, R. globerulus* fajokba tartozó törzsek 90% feletti bontást mutattak, hasonlóan a *R. erythropolis* fajhoz, ahol szintén mindegyik izolátum képes volt legalább 90%-os bontásra. A *R. ruber* fajhoz tartozó törzsek esetében az N361 jelölésű 60%-os bontásra volt képes, míg a két másik nem csökkentette a toxinszintet. A *R. pyridinivorans* izolátumok közül egy törzs sem tudta degradálni a T-2 toxint, míg a *R. aetherivorans* törzs 35%-os biodegradációra volt képes.

Szakirodalmi adatok alapján ezidáig a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó fajok esetében nem állapítottak meg T-2 toxin bontó képességet. Munkám során sikerült megállapítanom, hogy az alábbi fajokba tartozó izolátumok képesek a T-2 biodegradációjára: *R. erythropolis* (16 izolátum), *R. globerulus* (2 izolátum), *R. rhodochrous* (2 izolátum), *R. coprophilus* (1 izolátum), *R. gordoniae* (1 izolátum).

4.2.1.4 A *Rhodococcus* izolátumok OTA bontási eredményei

A 4. számú melléklet táblázatából kiolvasható, hogy az OTA esetében a meglévő izolátumok nem mutattak számottevő degradációs potenciált, a rendelkezésre álló törzsekből összesen négy mutatott alacsony (10–35%) bontást, a *R. erythropolis* GD 2A és BRB 1AB, valamint *R. pyridinivorans* K402 és K408.

4.2.1.5 *A Rhodococcus* izolátumok DON bontási eredményei

A DON toxin esetében a rendelkezésemre álló harminchárom *Rhodococcus* törzs egyike sem mutatott degradációs képességet.

4.2.1.6 *A Rhodococcus* izolátumok FB1 bontási eredményei

A FB1 toxin esetében a rendelkezésemre álló harminchárom *Rhodococcus* törzs egyike sem mutatott degradációs képességet.

4.2.1.7 *Rhodococcus* izolátumok multimikotoxin bontási képessége

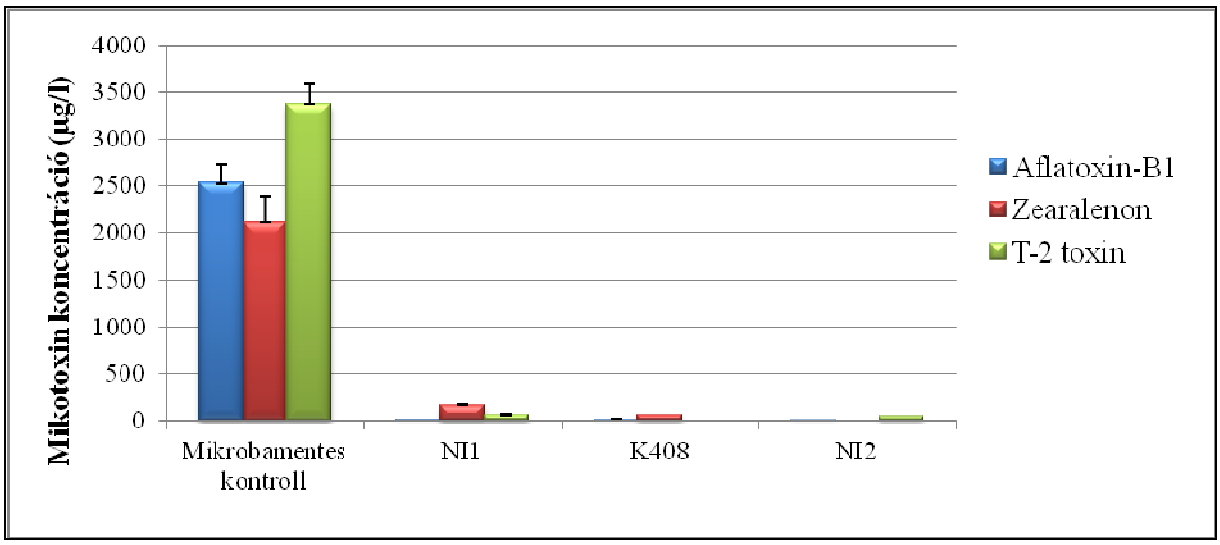
A több toxin biodegradációjára képes törzsek esetében a biológiai hatásmérésre alkalmazott tesztek (SOS-Chromo és BLYES test) alapján rangsoroltam és válogattam ki a multi-mikotoxinos kísérletbe vont izolátumokat. A 4. számú melléklet táblázatában található az a 19 törzs, amelyeknél 2 vagy 3 mikotoxin esetében is biodetoxifikáció volt megfigyelhető. Ezen törzsek közül három különböző fajba tartozó törzs multimikotoxin vizsgálatára nyílt lehetőség: *R. erythropoils* NI1, *R. pyridinivorans* K408, *R. rhodochrous* NI2.

A vizsgálathoz ugyan azokat a kísérleti előkészítéseket végeztem el (ld. 3.3. fejezetben), mint a korábbiakban, azzal a különbséggel, hogy egyszerre három mikotoxin volt a tápoldatban külön-külön 2 mg/l koncentrációban:

- Az *R. erythropoils* NI1 törzs esetében AFB1-ZEA-T-2 mikotoxin elegy
- A *R. pyridinivorans* K408 törzs esetében AFB1-ZEA mikotoxin elegy
- A *R. rhodochrous* NI2 törzs esetében AFB1-T-2 mikotoxin elegyet.

Az eredményeket a 4.2 sz. ábra foglalja össze, amelyről leolvasható, hogy a *R. erythropolis* NI1 degradációs potenciálja 90% feletti volt az AFB1, a ZEA és T-2 esetében is (AFB1: 99,88±0,09%, ZEA: 92,11%±11,25%, T-2: 98,48±13,45%), míg a *R. pyridinivorans* K408 több mint 95%-át lebontotta az AFB1 és a ZEA toxinoknak (AFB1: 99,31±2,24%, ZEA: 96,83±1,90%); A *R. rhodochrous* NI2 szintén 95% fölötti degradációt mutatott az AFB1 és a T-2 toxin esetében (AFB1: 99,88±0,09%, T-2: 97,94±2,25%).

A tesztelésbe vont törzsek a kiváló multimikotoxin bontási képesség mellett a genotoxikus és az ösztrogén hatást is megszüntették. További érdekesség, hogy a monotoxinos rendszerben mutatott ZEA bontási százalék (NI1 60% és K408 77%) a multitoxinos rendszerben jelentősen megnövekedett.



4.2. sz. ábra: A multimikotoxin bontási kísérlet felülúszó mintáiban 3 nap biodegradáció után ELISA teszttel mért toxinkoncentrációk

A szakirodalmi adatok alapján ez idáig prokarioták esetében nem mutattak ki multimikotoxin bontási képességet. Sőt, több mikotoxin bontását (ZEA és OTA) eddig csak az eukarióta *Trichosporon mycotoxinivorans* élesztőnél sikerült kimutatni.

4.2.2 Egyéb nemzetségbe tartozó izolátumok mikotoxinbontó képessége

Disszertációm ezen fejezetében azon mikroorganizmusok mikotoxinbontó képességét ismertetem, amelyek nem a *Rhodococcus* nemzetség tagjai.

Mindegyik ebben a fejezetben vizsgált törzs olajszármazékokkal szennyezett kárhelyekről, vagy olajos komposztokból lett izolálva. Tizenkettő különböző nemzetségbe tartozó huszonkét izolátum mikotoxinbontó képességét vizsgáltam öt mikotoxin esetében. A fejezetben elsőként egy összefoglaló táblázatot (5. számú mellékletben) ismertetek az eredményekről, majd mikotoxinonként taglalom a különböző nemzetségekbe tartozó törzsek degradációs képességét.

Az ELISA mérések eredményeit, a HPLC és ELISA vizsgálatok között szoros korrelációs kapcsolat miatt, csak a kiemelt bontási képességgel, vagy a kiemelt vizsgálatban szereplő törzsek esetében erősítettem meg HPLC-s analitikával.

4.2.2.1 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok aflatoxin-B1 bontási eredményei

Az 5. számú melléklet eredményeiből látszik, hogy a vizsgált huszonkét törzs mindegyike 50% feletti biodegradációs képességet mutatott az ELISA eredmények alapján. Azonban az SOS-Chromo teszt a törzsek többségénél genotoxikus bomlástermékeket mutatott. Mindössze a DN1 jelzésű *Pseudomonas putida* törzs szüntette meg az AFB1 genotoxikus hatását. A feldolgozott szakirodalmakat alapul véve, a *Pseudomonas* nemzetség esetében a tudomány számára új eredmény az AFB1-bontó képesség.

4.2.2.2 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok zearalenon bontási eredmények

Az 5. számú melléklet táblázatából látható, hogy a vizsgált huszonkét törzsből az AFB1 bontási eredményeihez képest, a rhodococcuszokhoz hasonlóan jóval kisebb számban, mindössze 4 törzsnél figyelhettem meg 50% feletti ZEA degradációs képességet, amelyek a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* FEH28, a *Pseudoxanthomonas kalamensis* H4 jelölésű, a *Pseudoxanthomonas suwonensis* NZS6 jelzésű és a *Gordonia paraffinivorans* NZS14 jelölésű törzsek. Ezen ZEA bontó törzsek esetében BLYES teszttel ellenőriztem a bontási képesség biztonságosságát, azaz, hogy marad-e ösztrogénhatású melléktermék a biodegradáció után. A BLYES eredmények alapján a FEH28 és a H4 jelzésű baktériumok ZEA degradációja esetében nem tapasztaltam ösztrogénhatású bomlásterméket.

Szakirodalmi adatok alapján ismert a *Pseudomonas*nemzetség esetében a ZEA bontó képesség, de faj szinten a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* esetében a tudomány számára új eredmény a ZEA-bontó képesség.

4.2.2.3 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok T-2 toxin bontási eredmények

A T-2 toxin esetében a huszonkét törzsből három törzs mutatott 50% feletti, 90% körüli bontást, a *Microbacterium* nemzetség két tagja EL1 és NSZ9 és a *Pseudoxanthomonas* nemzetségbe tartozó NZS6 törzs.

A feldolgozott szakirodalmakat alapul véve, mind a két nemzetség (*Microbacterium, Pseudoxanthomonas)* esetében a tudomány számára új eredmény a T-2-bontó képesség.

4.2.2.4 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok ochratoxin-A bontási eredményei

Az OTA esetében három törzs esetében magas bontási képességet sikerült kimutatni, mind a HPLC, mind az ELISA mérések adatai alapján, amelyek közül két törzs a *Cupriavidus* nemzetség tagja: BRB 6A (*C. basilensis)* és ŐR16 (*C. basilensis)*; egy törzs a *Sphingopyxis chiliensis* fajba tartozó Kö10 jelölésű izolátum.

A feldolgozott szakirodalmakat alapul véve, mind a *Cupriavidus*, mind *Sphingopyxis* nemzetség esetében a tudomány számára új eredmény az OTA-bontó képesség.

4.2.2.5 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok deoxinivalenol toxinbontó képessége

A kísérleteim során mind a huszonkét törzs DON bontó képességét vizsgáltam, egyik esetében sem tapasztaltam bontást a kontroll mintákhoz viszonyítva.

4.2.2.6 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok fumonizin-B1 toxinbontó képessége

A kísérleteim során mind a huszonkét törzs FB1 bontó képességét vizsgáltam, egyik esetében sem tapasztaltam bontást a kontroll mintákhoz viszonyítva.

4.2.2.7 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok multi-mikotoxinbontó képessége

A nem *Rhodococcus* törzsek estében tizenegy izolátum kapcsán merült fel a multimikotoxin bontó képesség; de a biológiai hatásmérést is alapul véve nem volt olyan törzs, amely egyszerre lenne képes a több mikotoxin lebontására azok káros biológiai hatásának megszűntetésével.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.2. fejezetben bemutatott eredmények alapján):
(1. tézis) Feltártam a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó 8 faj, 33 törzsének mikotoxinbontó képességét. A nemzetségen belül eddig toxinbontási tulajdonságáról ismeretlen 3 fajnál (*R. globerulus, R. pyridinivorans, R. rhodochrous)* aflatoxin-B1, 2 fajnál (*R. pyridinivorans, R. erythropolis)* pedig zearalenon biodetoxifikációs képességet mutattam ki. 5 fajnál *(R. erythropolis, R. globerulus, R. rhodochrous, R. coprophilus, R. gordoniae)* elsőként írtam le T-2 toxin biodegradációját.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.2. fejezetben bemutatott eredmények alapján):
(2. tézis) A *Cupriavidus* és *Sphingopyxis* nemzetség esetében ochratoxin-A; a *Microbacterium, Pseudoxanthomonas* nemzetség esetében T-2 toxin; a *Pseudomonas* nemzetség esetében aflatoxin-B1 biodegradációt mutattam ki.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.2. fejezetben bemutatott eredmények alapján):
(3. tézis) A prokarioták esetében elsőként mutattam ki multimikotoxin biodegradációt és biodetoxifikációt. Az aflatoxin-B1 és a zearalenon detoxifikálására, továbbá a T-2 toxin bontására képes a *R. erythropolis* NI1 jelzésű törzs. Kettő mikotoxin, az aflatoxin-B1 és zearalenon együttes biodetoxifikációjára képes a *R. pyridinivorans* K408 jelzésű törzs, valamint az aflatoxin-B1 detoxifikálására és T-2 toxin együttes bontására képes a *R. rhodochrous* NI2 jelzésű törzs.

4.3 Állatetetési és állatkezelési kísérletek

Annak ellenőrzésére, hogy az előző fejezetekben leírt biodegradációs ill. a mikrobiális és molekuláris biotesztekkel bizonyított biodetoxifikációs képességek magasabb rendű élő szervezetekben is eredményre vezetnek, állatetetési és állatkezelési kísérleteket végeztünk.

Az AFB1 detoxifikáció hatékonyságának ellenőrzésére hal- és brojlercsirke etetési kísérletet választottunk, amelyhez a takarmányt a 3.7.1. fejezetben leírtak alapján állítottuk elő, míg a toxinmentesítéshez a *R. pyridinivorans* AK 37 baktérium törzset használtuk, egyrészt kiváló hatásfokú *in vitro* AFB1 biodetoxifikációs tulajdonsága (ld. 4.2. sz. táblázat) miatt, másrészt annak okán, hogy ezt a törzset választottuk a faj *de novo* genom projektjének elkészítéséhez.

A ZEA biodetoxifikáció hatékonyságának ellenőrzéséhez patkány modell kísérletet választottunk, amelyhez a kezelési anyag (tápoldat) a 3.7.2. pontban leírtak szerint készült, míg a toxinmentesítéshez a *R. pyridinivorans* K 408 baktérium törzset használtuk, amely a *Rhodococcus* törzsek közül a legnagyobb hatásfokkal bontotta a ZEA-t, ráadásul úgy, hogy a káros biológiai hatását (EDC) megszüntette.

Az OTA biodetoxifikációs hatékonyságának ellenőrzéséhez egér modell kísérletet választottunk, melyhez a kezelési anyag (tápoldat) a 3.7.3. pontban leírtak szerint készült, míg a toxinmentesítéshez a *Cupriavidus basilensis* ŐR16 baktérium törzset használtuk, amely az általam vizsgált mikrobák közül a 98%-os hatásfokkal bontotta az OTA-t.

Az állatetetési és kezelési kísérletek mikotoxin tartalom alapján 3 ágra váltak szét:

1. Aflatoxin-B1 szennyezett kukorica etetési kísérlete brojlercsirke és hal rendszerben
2. Zearalenon bontási rendszer biodegradációs termékeit tartalmazó liofilizált készítmény vizsgálata patkánykezelési kísérletekben
3. Ochratoxin-A bontási rendszer biodegradációs termékeit tartalmazó liofilizált készítmény vizsgálata egérkezelési kísérletekben.

AFB1 tartalmú takarmány előállítása

Az állatetetési kísérletek során AFB1-mentesítési/ártalmatlanítási eljárást dolgoztam ki, amely során a szennyezett takarmányt kezeltem a kutatásaim eredményei alapján kiválasztott mikroorganizmussal. A kísérletek során a tanszékünk által izolált Zt80 *Aspergillus* törzzsel aflatoxin tartalmú kukoricát állítottunk elő (ld. 3.7.1. fejezet), majd ezt szilárd fázisú fermentációs folyamatban *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 mikroba törzzsel

detoxifikáltam. Az így kezelt takarmányt (kukorica) hal és brojlercsirke etetési tesztekben vizsgáltuk.

A kísérlet során a takarmányok AFB1-tartalmát mind a már ismertetett ELISA és HPLC módszerrel (3.4 és 3.5 fejezet) ellenőriztük. A kontroll takarmánykeverékek AFB1 koncentrációja nem érte el a kimutathatóság határát. Az AFB1 tartalmú kísérleti tápban a tervezett 1 mg/kg koncentrációval szemben 860 µg/kg volt az AFB1 tartalom. A bakteriális detoxifikáció hatására ez az érték 105 µg/kg értékre csökkent, amely érték, bár meghaladja az Európai Unióban megengedett 50 µg/kg maximális koncentrációt (2003/100/EC), azt jelenti, hogy az AFB1-et a kísérleti baktérium kultúra 87,8%-os hatékonysággal bontja a kidolgozott eljárásban. A további vizsgálatokban ennek a detoxofikált takarmánynak a biológiai hatását ellenőriztük hal és brojlercsirke tesztállatokon.

4.3.1 Hal etetési teszt aflatoxin-B1 mentesítés ellenőrzésére

A hal etetési kísérletet az 3.7.1.2 fejezetben leírt módszerrel végeztük.

4.3.1.1 Termelési paraméter, mortalitás és takarmányfogyasztás vizsgálatok

A kísérlet ideje alatt a halak testtömegében és testhosszában bekövetkezett változásokat az 4.6. sz. táblázat foglalja össze. A kísérlet végére a vizsgált paraméterek egyikében sem történt statisztikailag igazolható változás sem a csoportok ismétlésein belül (kezdeti és végső értékek), sem az egyes csoportok között (P<0,05).

4.6. sz. táblázat: A kezelt halak testhossz és testtömeg értékei a kísérlet kezdetén és végén

Etetési beállítás	Testhossz (cm)		Testtömeg (kg)	
	kezdeti	végső	kezdeti	végső
AFB1	12,2±6	12,2± 4	0,71 ± 0,08	0,69 ± 0,09
AFB1+ AK37	12,1±4	12,5± 5	0,74± 0,06	0,74 ± 0,08
Kontroll + AK37	12,3±5	12,4± 4	0,72 ± 0,06	0,74 ± 0,06
Mikrobamentes kontroll	12,2±4	12,4± 6	0,71 ± 0,06	0,73 ± 0,08

Az állatok pusztulását vizsgálva (4.7. sz. táblázat) statisztikailag is igazolható különbsége volt tapasztalható az egyes kezelések között (P<0,05). Két csoportban történt mortalitás a vizsgálati idő alatt. A *AFB1 + AK37* mintával etetett halak között a 4. napon történt egy csekély mértékű pusztulás, amely nagy valószínűséggel nem a kezelés következménye volt, ennek magyarázatára a szövettani részben térek ki. A 10. naptól kezdve nagymértékű elhullást volt tapasztalható az *AFB1* kukoricával takarmányozott csoportban. Szövettani vizsgálatok alapján bizonyítást nyert, hogy ebben az esetben az elhullás döntő oka a takarmány toxintartalma volt.

4.7. sz. táblázat: Az elhullások mértéke az egyes csoportoknál a hal etetési kísérlet ideje alatt

Etetési beállítás	Elhullás (%)
AFB1	20 ± 8*
AFB1 + AK37	2 ± 2
Kontroll + AK37	0
Mikrobamentes kontroll	0

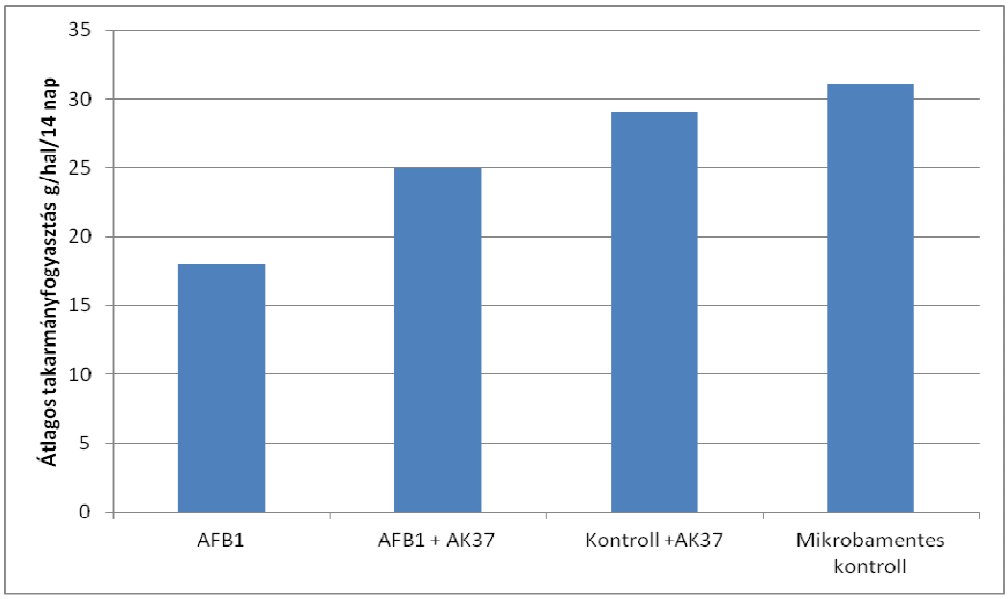
*P<0,05 = AFB1+AK37 beállításhoz viszonyítva

A kísérlet ideje alatt a napi takarmányfogyás is rögzítésre került az egyes csoportoknál (4.8. sz. táblázat). A kiesések miatt az adott csoportok takarmányadagjait a csökkent egyedszámnak megfelelően korrigáltuk. A táblázatból jól látszik, hogy az *AFB1* tartalmú kukoricával etetett csoport az idő előrehaladtával egyre kevesebb takarmányt vett magához. Ennek oka az AFB1 toxikózis volt. A többi csoportnál hasonló mértékű csökkenés nem volt tapasztalható, minden egyed az életkorának megfelelő mértékben fogyasztotta a bejuttatott takarmányt.

4.8. sz. táblázat: Átlagos takarmányfogyasztás az egyes csoportokban a hal etetési teszt során

Etetési beállítás	Átlagos takarmányfogyás g/hal/14 nap
AFB1	18,0 ± 3, 9*
AFB1 + AK37	25,0 ± 7,1
Kontroll +AK37	29,7 ± 5,6
Mikrobamentes kontroll	31,2 ± 4,4

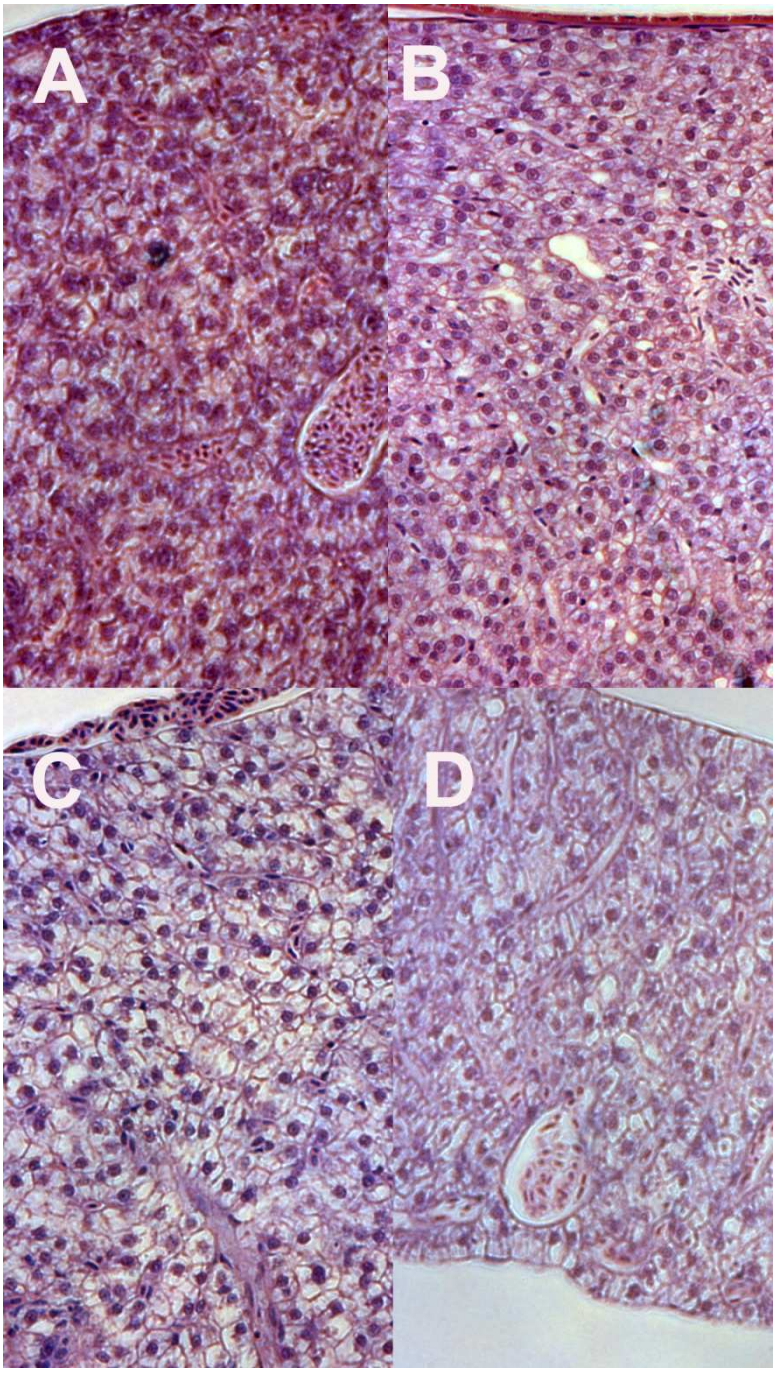
*P<0,05 = AFB1+AK37 beállításhoz viszonyítva



4.3. sz. ábra: Átlagos takarmányfogyasztás az egyes csoportokban

4.3.1.2 Szövettani vizsgálatok

A kísérlet végén beállításonként a 10-10 egyednél májmintát vettünk a szövettani vizsgálatokhoz. Az elkészült metszetek hematoxilin-eozinnal festett és hússzoros nagyításon rögzített mikroszkópos felvételét a 4.1. sz. kép mutatja.



4.1. sz. kép: Májról készült szövettani metszetek fényképei (A: Mikrobamentes kontroll kukorica, B: Kontroll + AK37, C: AFB1+ AK37, D: AFB1) (Készítette: Dr. Baska Ferenc)

A. A szövettani metszeten jól látszik, hogy a ***Mikrobamentes kontroll*** kukorica mintával etetett halaknál a máj szöveti szerkezete ép, a májsejtsorok jól kivehetők. A hepatocitákban normális mennyiségű zsírvakuólum (zsírraktár) látható. A hepatociták

száma megfelelő, a sejtmagok centrálisan helyezkednek el. A metszet alapján elmondható, hogy a kukoricaminta nem volt kimutatható toxikus hatással a halak májára a kezelés ideje alatt.

B. A ***Kontroll + AK37*** mintával etetett halaknál a máj szöveti szerkezete szintén ép, a májsejtsorok is jól kivehetőek. A sejtmagok centrális helyzetűek maradtak. A metszet alapján elmondható, hogy a kukoricaminta nem volt kimutatható toxikus hatással a halak májára a kezelés ideje alatt.

C. Az ***AFB1 + AK37*** mintával takarmányozott halak májában igen kismértékű diffúz patológiás zsíros infiltráció (kóros beszűrődés, a sejtekben vagy szövetekben történő anyag felhalmozódás) található, de a magok még központi helyzetűek maradtak. A májban különböző méretű zsírcseppek alakultak ki, amelyet a kontroll csoporthoz (A) képest a több fehér terület jelez.

D. Az ***AFB1*** jelű mintával etetett halaknál a májban magelváltozással járó zsíros infiltráció figyelhető meg, a májsejtek zsírtartalma jelentősen megnőtt, a máj szerkezete helyenként teljesen megbomlott, rendezettsége megszűnt, a máj szivacsos szerkezetűvé vált. Az infiltráció mértéke diffúz nekrobiózishoz (az élő sejtek, illetve szövetek lassú elhalási folyamata) vezetett. Az elzsírosodás mellett gyulladásos sejtek, limfociták és granulociták is láthatóak a metszetekben. A magok körül, illetve a sejtek között vörös elszíneződés figyelhető meg. Több helyen is megfigyelhető magelváltozás (karioreksziszis). A szövettani vizsgálat alapján elmondható, az AFB1 toxintartalmú kukorica erősen mérgező volt a kezelt halakra.

4.3.2 Baromfi etetési teszt

A vizsgálatok célja annak megállapítása volt, hogy a doktori munkám keretében kifejlesztett, az AFB1 mikotoxin detoxifikációjára alkalmas enzimet termelő baktérium elölt, hőkezelt kultúrája milyen hatást gyakorol brojlercsirkék egyes termelési paramétereire. A kísérletet az 3.7.1 fejezetben leírt módon végeztük.

4.3.2.1 Termelési paraméterek

Testsúly

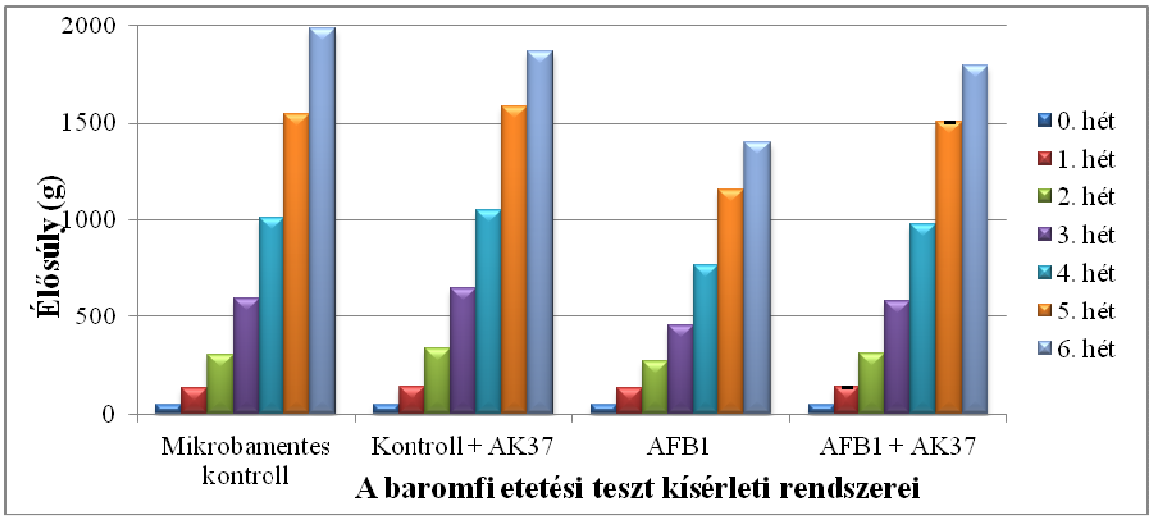
A testsúly adatok elemzése során, az egyes kezeléseken belül, az ismétlések között számottevő eltérés nem volt tapasztalható, ezért a továbbiakban az egyes kezeléseket egységesen vizsgáltuk. A testsúly adatok a 4.9. sz. táblázatban és 4.4. sz. ábrán láthatóak.

4.9. sz. táblázat: A brojlercsirke élősúly (g) alakulása a nevelés/kezelés teljes ideje alatt

		1. hét	2. hét	3. hét	4. hét	5. hét	6. hét	7. hét
Mikrobamentes kontroll	átlag	46,4	132,7 [a]	303,7[a]	597,1 [ac]	1011,4 [ab]	1547,1 [ab]	1982,9 [a]
	szórás	1,4	16,5	44,7	93,7	157,0	253,8	241,6
Kontroll + AK37	átlag	47,0	142,5 [b]	336,1 [b]	647,9 [a]	1050,0 [a]	1583,2 [a]	1864,4 [ac]
	szórás	0,0	20,7	50,0	101,4	92,0	129,3	196,8
AFB1	átlag	47,4	132,0 [a]	268,8[d]	454,4 [d]	766,7 [d]	1154,4 [d]	1400,6 [d]
	szórás	1,4	16,0	38,3	79,3	126,6	200,5	230,4
AFB1 + AK37	átlag	47,2	136,4 [ab]	312,8 [a]	582,9 [c]	979,4 [b]	1504,1 [b]	1793,8 [c]
	szórás	0,2	14,5	34,1	62,1	110,7	158,0	224,9

Jelmagyarázat

Az azonos oszlopban eltérő betűvel jelölt értékek szignifikáns mértékben különböznek egymástól - a-b ($p<0,05$), a-d, b-d, c-d ($p<0,001$); a-c ($p<0,01$).



4.4. sz. ábra: A brojlercsirke élősúly (g) alakulása a nevelés/kezelés teljes ideje alatt

Az aflatoxin-kezelés hatására az állatok átlagos testsúlya két hetes kortól szignifikánsan alacsonyabb volt mindhárom csoporttal szemben a kezelés végéig. Ugyanakkor abban a csoportban (AFB1 + AK37), amelynek takarmánya az AFB1 mellett a mikotoxin detoxifikációjára képes enzimet termelő elölt baktérium kultúrát is tartalmazta a kontroll csoportokhoz hasonlóan alakult az átlagos testsúly.

Súlygyarapodás

Az átlagos heti súlygyarapodás értékeit a 4.10. sz. táblázat és 4.5. sz. ábra tartalmazza. Az eredmények azt mutatják, hogy a csak AFB1-et tartalmazó takarmánykeverék hatására csaknem a hizlalás teljes ideje alatt számottevően alacsonyabb napi gyarapodást értek el e csoport egyedei a többi csoporténál. Ugyanakkor azon csoport egyedeinek gyarapodása, amelyek az AFB1 mellett a mikotoxin detoxifikációjára képes baktérium kultúrát tartalmazó

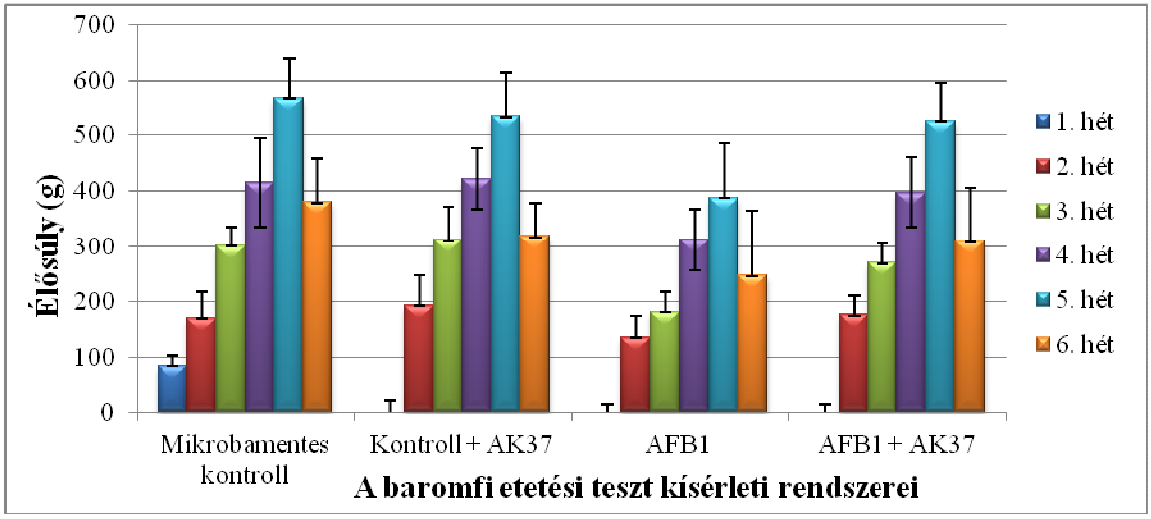
takarmányt fogyasztottak a hizlalás során ugyan kis mértékben elmaradt a kontrolltól, azonban ennek mértéke nem szignifikáns.

4.10. sz. táblázat: Az átlagos súlygyarapodás (g) alakulása a brojlercsirke nevelés/kezelés teljes ideje alatt

Idő	hét	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét	5. hét	6. hét
Mikrobamentes kontroll	átlag	86,3[ab]	171,0[a]	301,7[a]	414,3[a]	566,7[a]	380,4[a]
	szórás	16,8	47,6	34,4	79,9	73,7	78,3
Kontroll + AK37	átlag	95,5[b]	193,8[a]	311,8[a]	421,7[a]	533,2[ab]	318,7[ad]
	szórás	20,7	55,3	58,9	54,5	81,8	60,6
AFB1	átlag	84,7[a]	136,9[c]	182,0[c]	312,3[c]	387,7[c]	247,5[c]
	szórás	15,4	38,5	35,3	54,2	99,6	116,6
AFB1 + AK37	átlag	89,2 [ab]	176,4[a]	270,2[b]	398,0[a]	525,2[b]	309,4[d]
	szórás	14,5	34,8	35,3	62,6	69,9	97,6

Jelmagyarázat:

Az azonos oszlopban eltérő betűvel jelölt értékek szignifikáns mértékben különböznek egymástól: a-b, a-d, c-d $p<0,05$, a-c, b-c $p<0,001$,

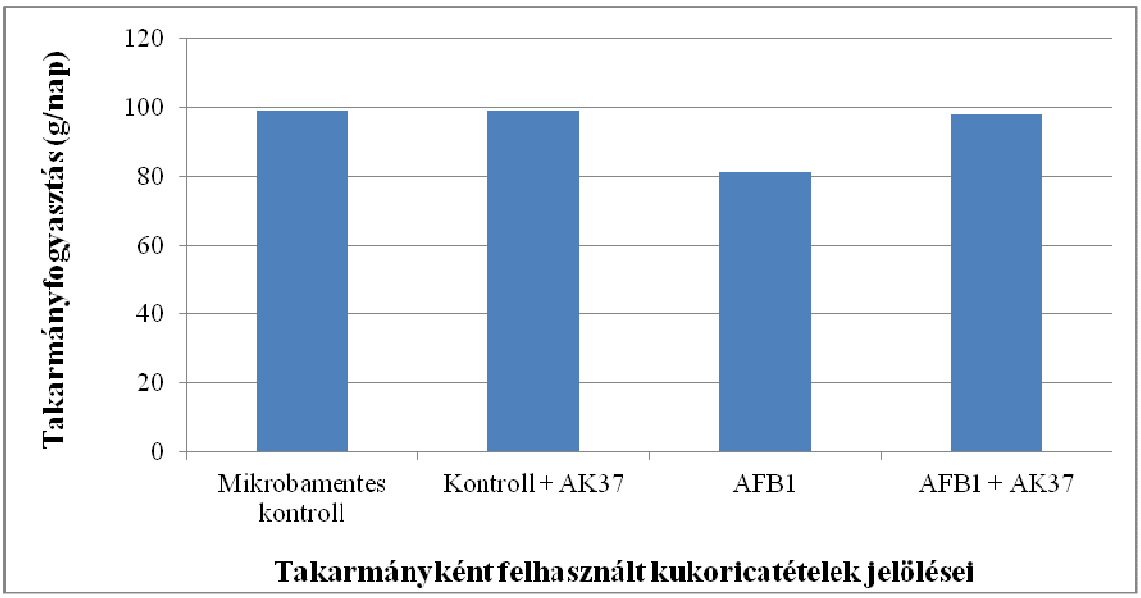


4.5. sz. ábra: Az átlagos súlygyarapodás (g) alakulása a nevelés/kezelés teljes ideje alatt

Átlagos napi takarmányfogyasztás

A takarmányfogyasztás egyedi mérésére nem volt lehetőség, így statisztikai elemzésre sem volt mód. Emellett a tartástechnológia sem tette lehetővé a szóródás, ill. pazarlás teljes mértékű kizárását, illetve annak meghatározását. Ezek mértéke elsősorban a hizlalási időszak első két hetében lehet jelentős.

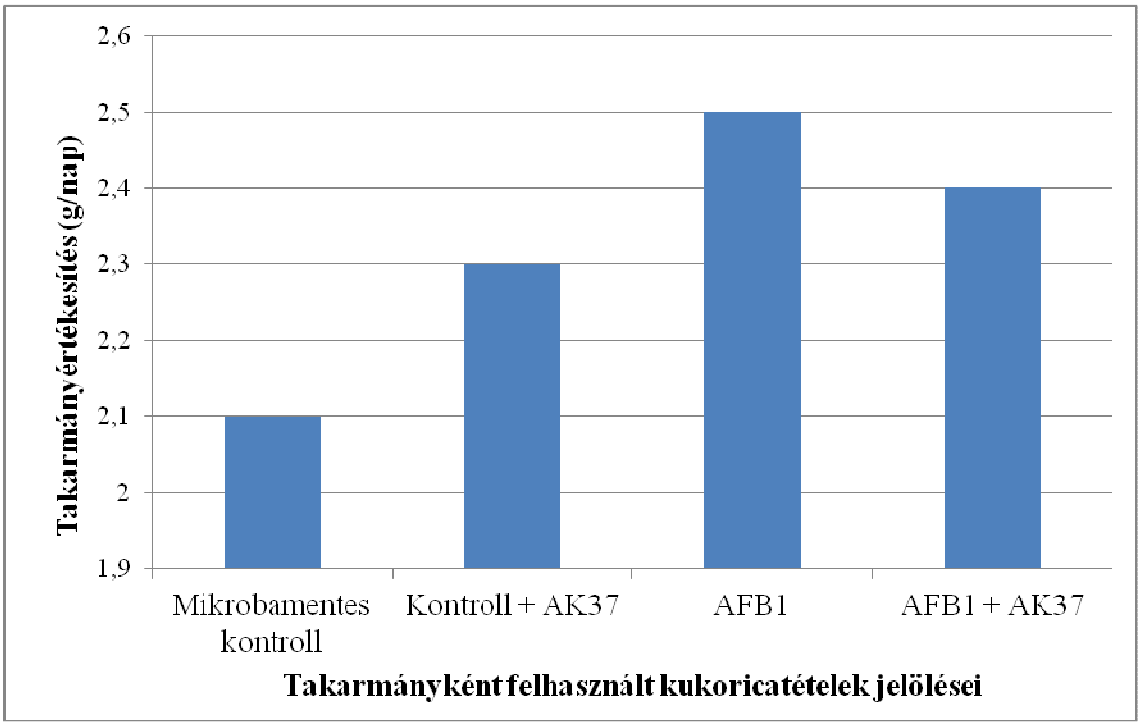
A 4.6. sz. ábra foglalja össze az átlagos egyedi takarmányfogyasztás alakulását a kísérlet teljes idejére vonatkoztatva. Ennek alapján elmondható, hogy az AFB1 hatására jelentősen csökkent az állatok étvágya. Ugyanakkor a detoxifikációs eljárással csökkentett AFB1 tartalmú takarmány fogyasztásakor ez a hatás már nem nyilvánult meg.



4.6. sz. ábra: A brojlercsirkék átlagos egyedi takarmányfogyasztás alakulása a nevelés teljes idejére vonatkoztatva (g/nap)

Átlagos takarmányértékesítés

Mivel a takarmányfogyasztást nem egyedileg mértük, így a takarmányértékesítést, azaz az 1 kg súlygyarapodáshoz felhasznált takarmány mennyiségét sem lehetett statisztikailag értékelni. A takarmányértékesítést a hizlalás teljes időtartamára vonatkoztatva a 4.7. sz. ábra szemlélteti, amely szerint az AFB1 hatására kis mértékben romlott az állatok takarmányértékesítése, azonban ennek mértéke nem szignifikáns. Továbbá érdekes módon a csak a detoxifikációhoz alkalmazott elölt baktérium kultúra hatására is csökkent mértékű takarmányértékesítés nyilvánult meg.



4.7. sz. ábra: A brojlercsirkék takarmányértékesítése a teljes hizlalási időre vonatkoztatva a kontrollhoz viszonyítva

Brojlercsirke etetési kísérlet eredményeinek összefoglalása

A kísérlet első két hetében a vizsgált termelési paraméterek hasonlóképpen alakultak minden csoportban, ugyanakkor a második héttől AFB1 hatására számottevően romlottak. Az első két hétben szignifikáns eltérés nem volt tapasztalható, ami arra utal, hogy az alkalmazott dózisban az AFB1 kedvezőtlen hatásait a brojlercsirke rövid ideig képes kompenzálni. Két hét alatt azonban a szervezet kompenzációs képessége kimerül és így a továbbiakban az AFB1 kedvezőtlen hatásai már érvényesülnek.

A kísérletben felhasznált baktérium törzs hatékonyan csökkentette a szennyezett takarmány AFB1 koncentrációját. Ugyanakkor, az extrém magas szennyezettség következtében a detoxifikáció ellenére a takarmány toxintartalma még így is meghaladta a takarmánybiztonsági határértéket (105 µg/kg az 20 µg/kg helyett). Vélhetően ezzel magyarázható, hogy a detoxifikált takarmánykeveréket fogyasztó egyedek súlya és takarmányértékesítése kis mértékben, de nem szignifikánsan elmaradtak a kontroll egyedektől.

Összességében tehát a kísérletben kipróbált AFB1 detoxifikációjára képes enzimet termelő baktérium kultúra hatékonyan használható mikotoxin mérgező hatásainak kiküszöbölésére baromfi takarmányában. A 4.2. sz. képen a mintegy 400 grammos tömegkülönbségen kívül szembeötlő az egészségi állapotban, fittségben, a csüd és a taraj színbeli különbözőségében megnyilvánuló eltérés a biodetoxifikált takarmányt fogyasztó állat javára.

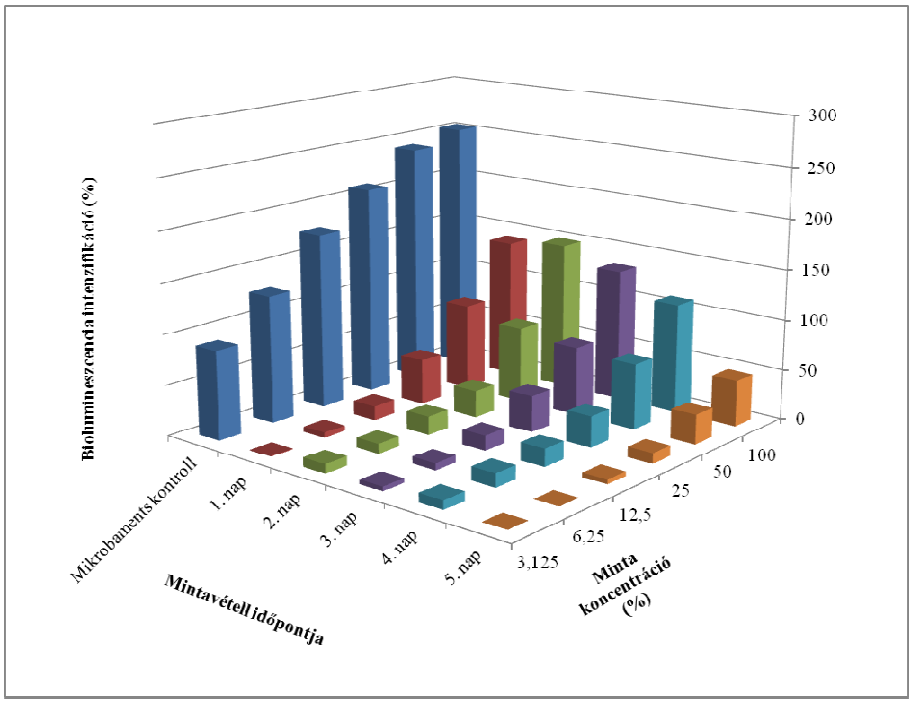
4.2. sz. kép: Brojlercsirkék állapota az etetési kísérlet végén – balra az AFB1 takarmányon nevelt, jobbra az AFB1+AK37 takarmányon nevelt csirkék (Készítette: Cserháti Mátyás)

4.3.3 Patkánykezelési modell kísérlet (uterotrofikus bioassay)

4.3.3.1 Előkísérlet a biodegradációs hatékonyság ellenőrzésére

Az etetési kísérlet előtt a biodegradációs kísérlet inkubálási szakaszában vett minták ösztrogén hatásának változását BLYES teszten ellenőriztük, amely a hormonhatás folyamatos csökkenését mutatja az inkubációs idő alatt. Valamint HPLC és ELISA analitikai mérésekkel is mértük a ZEA koncentráció változását.

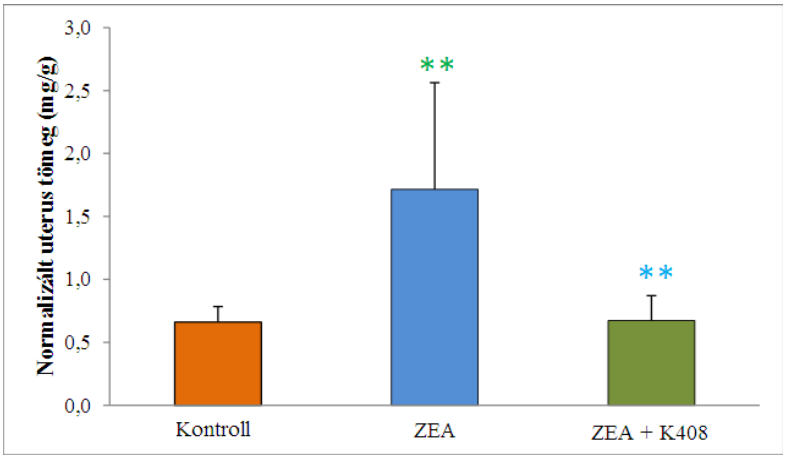
Az eredmények alapján a ZEA + *Rhodococcus pyridinivorans* K408 LB tápoldatban az 5 napos inkubáció végére jelentősen csökkent az ösztrogénhatás a mintákban. A biodegradáció vizsgálatánál a HPLC és ELISA mérésekhez hasonló eredményeket kaptunk a BLYES teszttel, vagyis az analitikai mérésekkel igazolt ZEA-elimináció az ösztrogénhatás csökkenésével járt (4.8. sz. ábra). Míg az analitikai mérések 85% lebomlást mutattak a felülúszó mintában, addig a BLYES teszt 81% csökkenést mutatott az ösztrogén hatásban. Az eredményeket részletesen értékelve látható, hogy 24 óra elteltével a ZEA 44%-át már detoxifikálta a K408 jelzésű törzs, majd a 3. napig nem volt detektálható további hormonhatás csökkenés. A 4. napon viszont a hormonhatás már 56%-al csökkent, míg végül az ötödik napon már 81% csökkenést ért el.



4.8. sz. ábra: A patkánykezelési teszthez végzett zearalenon biodegradáció ösztrogénhatás-vizsgálata BLYES teszttel

4.3.3.2 Uterus tömeg változásának vizsgálata

A ZEA mikrobiális biodegradációját vizsgáló kísérletek során a kontroll csoporthoz képest a méhtömeg szignifikáns növekedése (2,6-szoros) csak a ZEA csoportba tartozó állatoknál volt tapasztalható (4.9. sz. ábra). Ezzel szemben a Kontroll csoport és a ZEA+K408 csoport között nem volt szignifikáns különbség. A ZEA és a ZEA+K408 csoport eredményeit összehasonlítva azt állapíthatjuk meg, hogy a mikrobával inkubált, zearalenonnal szennyezett tápoldat által kiváltott biológiai hatás 2,5-szer kisebb, mint az ugyanilyen összetételű, baktériummal nem inkubált tápoldat hatása.

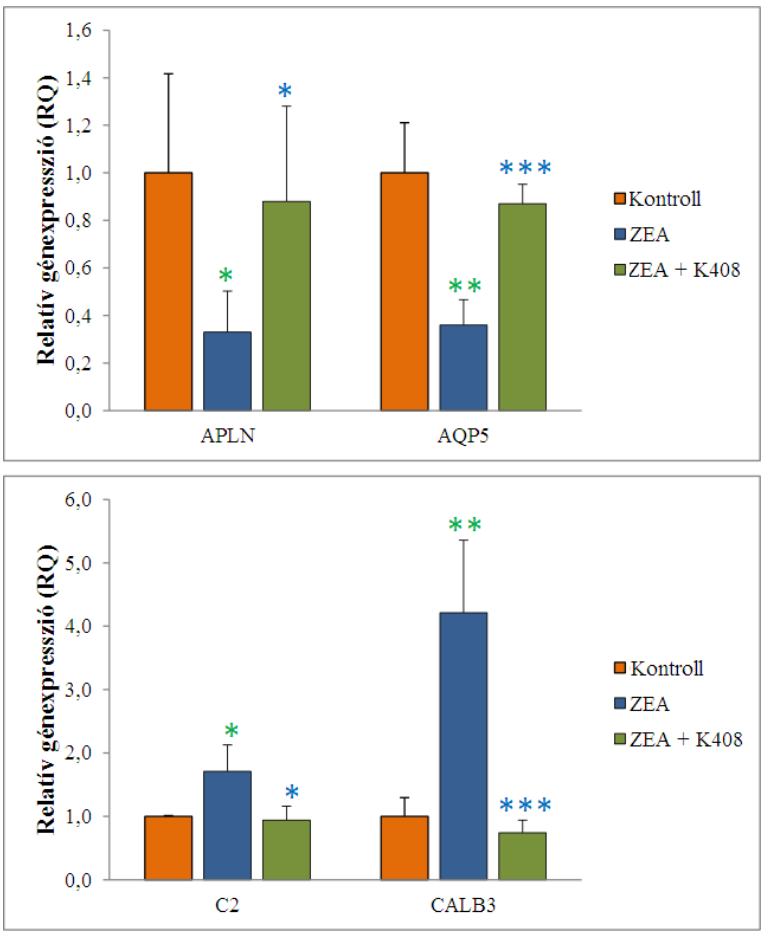


4.9. sz. ábra: A vágás előtti testtömegre normalizált uterus tömegek csoportonkénti átlaga a kezelések függvényében (: p<0,01), a zöld csillagok a Kontroll és a ZEA csoport közötti, a kék csillagok a ZEA és a ZEA+K408 csoport közötti szignifikancia szintet jelölik.**

A kapott eredmények alapján kijelenthető, hogy a ZEA uterotrofikus hatása *Rhodococcus pyridinivorans* K408 törzzsel történő inkubáció hatására megszűnt. Ebből arra következtethetünk, hogy a mikroba elbontotta a mikotoxint, uterotrofikus hatású aktív metabolit pedig nem keletkezett.

4.3.3.3 Real-time PCR-es génexpressziós vizsgálatok

A patkánykezelési vizsgálat során ösztrogén dependens géneket választottunk ki a Real-time PCR-es vizsgálatra. A ZEA hatására a komplement-komponens-2 (C2) és kalbindin-3 (CALB3) szint növekedése, míg az apelin (APLN) és aquaporin-5 (AQP5) mRNS szint csökkenése volt jellemző. Ezeknek a gének expresszióját mértem a ZEA-nal szennyezett, illetve az ugyanilyen összetételű, de *Rhodococcus pyridinivorans* K408 baktériummal kezelt csoportoknál (4.10. sz. ábra).



4.10. sz. ábra: Relatív génexpresszió (RQ) a kezelések függvényében (*: p<0,05 ; **: p<0,01 ; ***: p<0,001), a zöld csillagok a Kontroll és a ZEA csoport közötti, a kék csillagok a ZEA és a ZEA+K408 csoport közötti szignifikancia szintet jelölik

A ZEA-t tartalmazó tápoldat adagolásának hatására - a kontroll állatokhoz viszonyítva - az APLN és az AQP5 expressziója csökkent, a C2 és a CALB3 expressziója pedig megnőtt. Ha viszont a ZEA tartalmú tápoldatot *Rhodococcus pyridinivorans* K408 törzzsel inkubáltuk az *in vivo* kezelést megelőzően, akkor ezek a hatások megszűntek, a vizsgált gének expressziója szignifikánsan nem különbözött a kontroll állatoknál tapasztaltaktól. Az eredmények hasonlóságot mutatnak Heneweer és munkatársai (2007) által megfigyelt ZEA dózis hatásokhoz, ahol 10 mg/testsúly kg ZEA dózis hatására az APLN génexpressziója az ötödére, az AQP5 génexpressziója felével csökkent, míg a C2 gén esetében 50%-kal nőtt, a CALB3 gén esetében négyszeresére nőtt az átíródás vagy megnyilvánulás.

Mindezeket figyelembe véve megállapítható, hogy a baktériummal történő inkubálásnak köszönhetően a ZEA, e négy gén expressziójára gyakorolt hatása megszűnt. Ebből arra következtethetünk, hogy az oldatban lévő mikotoxint a mikroba eredményesen lebontotta, aktív metabolit pedig nem keletkezett.

Az uterusz vizsgálatok során nem mutattak ki szignifikáns különbséget a markergének expresszálódásában a kontroll és a ZEA+ *R. pyridinivorans* (K408) kísérlet esetében. Mind az

kezelési, mind a BLYES ösztrogénhatást kimutató bioteszt alapján a K408 törzzsel kezelt ZEA tartalmú LB tápoldatban megszűnt az (endokrin zavaró) ösztrogénhatás.

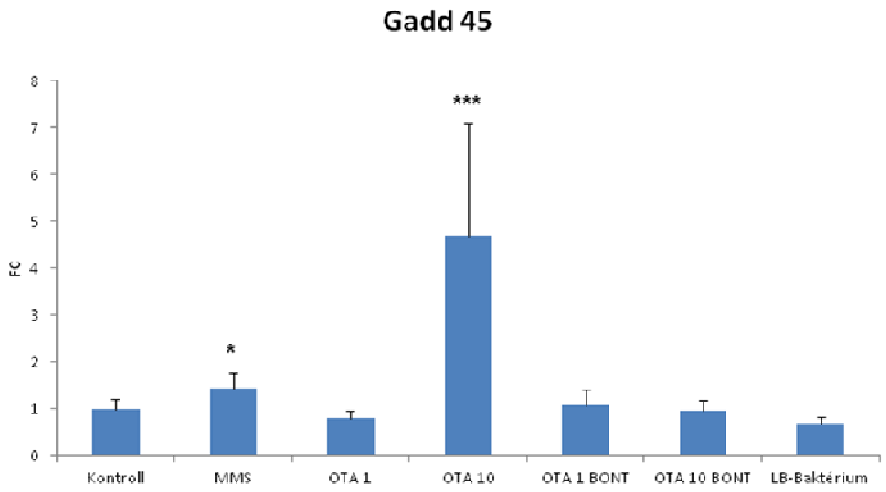
4.3.4 Egérkezelési modell kísérlet (nephrotoxikus bioassay)

4.3.4.1 Víz, takarmány fogyasztás és a testtömeg változásai

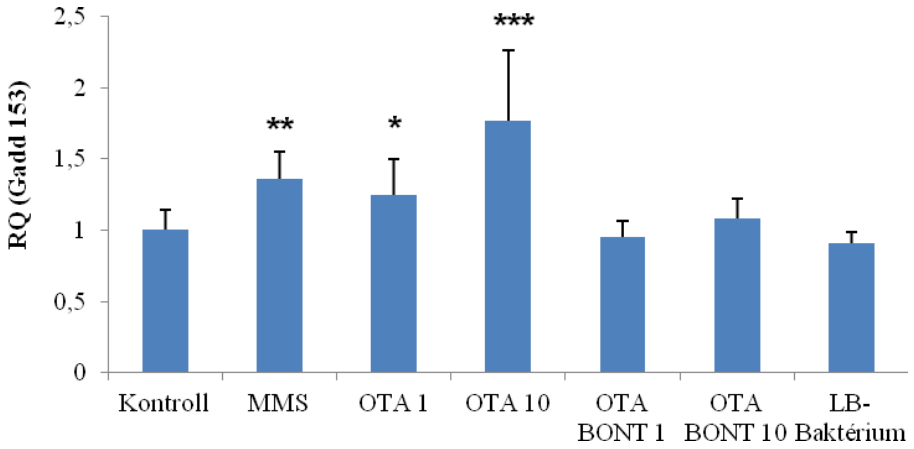
A kísérleti állatok napi kezelésben részesültek. A kezelések során rögzítésre került a víz és takarmányfogyasztás, továbbá az állatok testtömege. A víz és takarmányanyag felvétel nem változott szignifikánsan az eltérő kezelések hatására, sem az akut, sem pedig a krónikus vizsgálatok során. Az állatok testtömege szintén nem mutatott szignifikáns változást a kísérletek során.

4.3.4.2 A 72 órás OTA kezelés hatása a markergének génexpressziójára

Az akut (72 órás) toxicitási vizsgálatok során a pozitív kontrollként használt MMS és a nagy dózisú (10 mg/testtömeg kg dózis) OTA kezelés szignifikánsan megemelte a **Gadd 45 és a Gadd 153** expresszióját (4.11-12. ábra). A Gadd 153 expresszió a vesében már a kis dózisú (1 mg/ testtömeg kg dózis) OTA kezelés hatására is elérte a statisztikai biztosítottság szintjét. A mikrobiális degradáción átesett OTA tartalmú készítménnyel kezelt kísérleti állatok veséjében nem emelkedett meg sem a Gadd 45, sem a Gadd 153 expresszió. Mindkét dózis esetében a degradáció egyben detoxifikációnak is bizonyult és megszüntette a genotoxikus, DNS károsító hatást. A csak LB-t és a biodegradációban használt baktérium felülúszót tartalmazó készítménnyel kezelt csoport mRNS szintjei nem változtak a két markerre vizsgálva a cortexben.

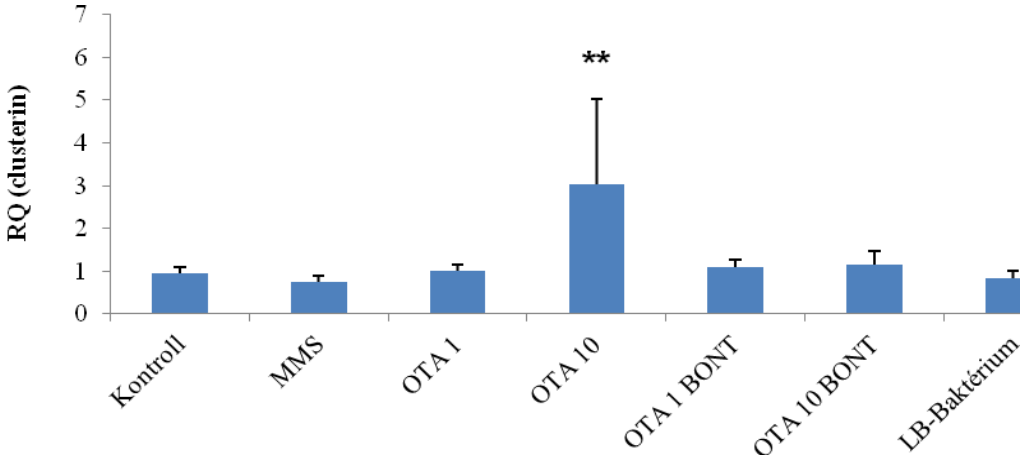


4.11. sz. ábra: A Gadd 45 expressziójának változása az egérkezelési kísérletben a 72 órás toxicitási vizsgálat során (n=7-10, * p<0.05, ***p<0.001)



4.12. sz. ábra: A Gadd 153 expressziójának változása (RQ) az egérkezelési kísérletben a 72 órás toxicitási vizsgálat során (n=7-10, * p<0.05, p<0.01 ***p<0.001)**

Sem az MMS, sem a kis dózisú OTA nem változtatta meg a vese kérgi régiójában a **clusterin** expressziót (4.13. sz. ábra), míg az OTA 10 jelzésű kezelés szignifikánsan növelte. A bakteriálisan lebontott OTA egyik dózisban sem növelte a clusterin mennyiségét. A mikrobiális OTA bomlástermékek tehát nem indítottak be apoptotikus folyamatokat a kezelés során, még nagy dózist alkalmazva sem. A csak médiumot (LB) és a biodegradációban használt baktérium felülúszót tartalmazó készítménnyel kezelt állatok veséje nem mutatott változást a vese cortexben a markerre vizsgálva.

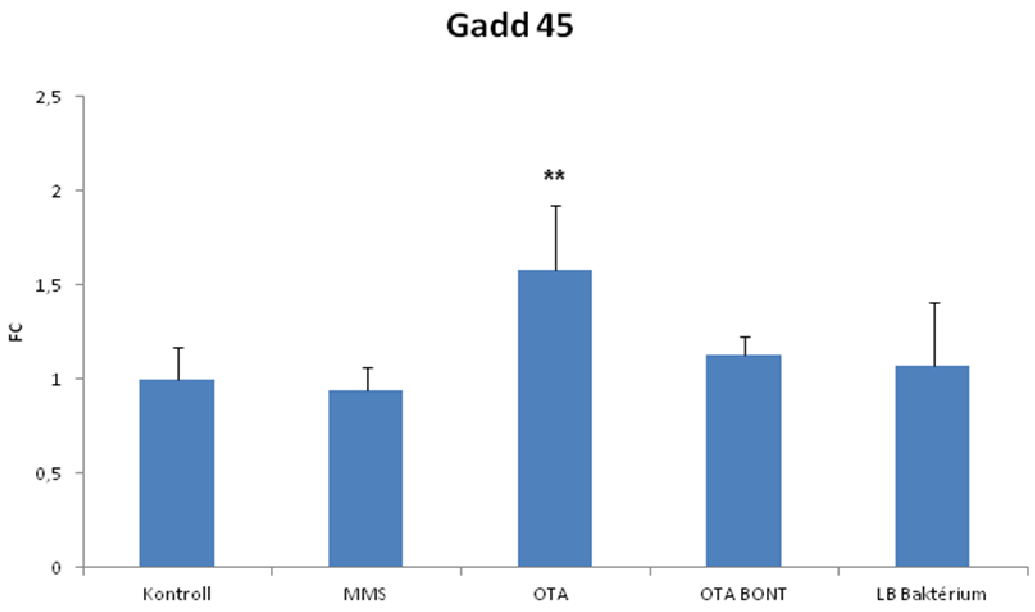


4.13. sz. ábra: A clusterin expressziójának (RQ) változása az egérkezelési kísérletben a 72 órás toxicitási vizsgálat során (n=7-10, ** p<0.01)

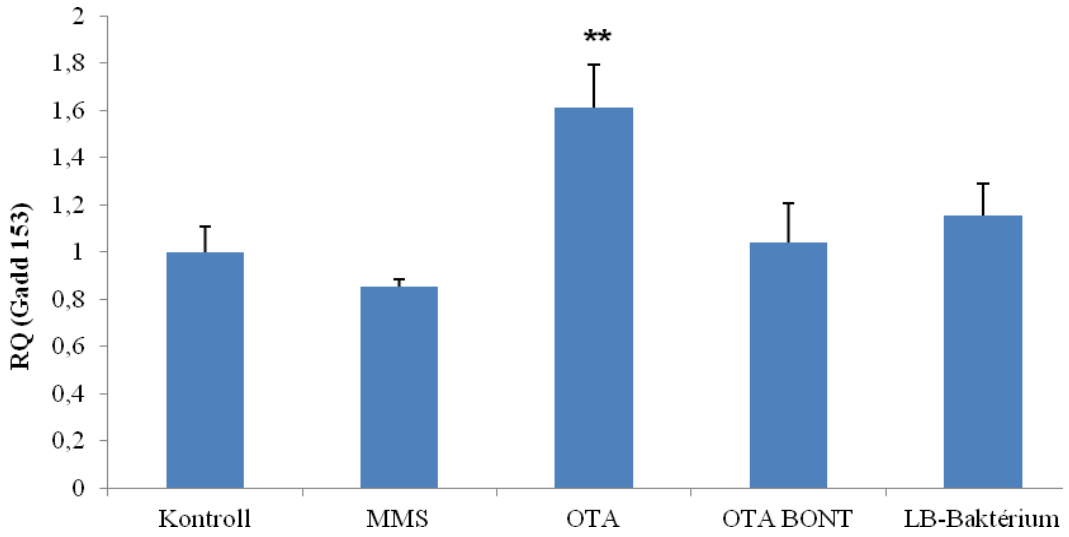
A saját eredményeink hasonlítanak Luhe és munkatársai (2003) által kapott 72 órás 10mg/ testsúly kg OTA dózis vizsgálataihoz, ahol az OTA hatására a Gadd45 és Annexin2 expressziója a kétszeresére, Gadd153 és clusterin expressziója másfélszeresére, a ceruloplazmin expressiója a 2,5-szeresére változott.

4.3.4.3 A 21 napos OTA kezelés hatása a markergének génexpressziójára

A 21 napos krónikus OTA kezelés szignifikánsan megemelte a **Gadd 45 és a Gadd** 153 expresszióját (4.14-15. sz. ábra) a kísérleti állatok veséjében, míg az MMS kezelés a krónikus kezelés során nem változtatta meg a DNS károsító hatásra aktiválódó markergének expresszióját. A Gadd 153 és Gadd 45 mRNS expresszió nem változott a vesében a biodegradáció során keletkezett OTA bomlástermékek hatására. Mindkét markergén esetében a degradáció egyben detoxifikációnak is bizonyult és megszüntette a genotoxikus, DNS károsító hatást. A csak médiumot (LB) és a biodegradációban használt baktérium felülúszót tartalmazó készítmény nem mutatott aktiváló hatást a vese cortexben a két markerre vizsgálva.

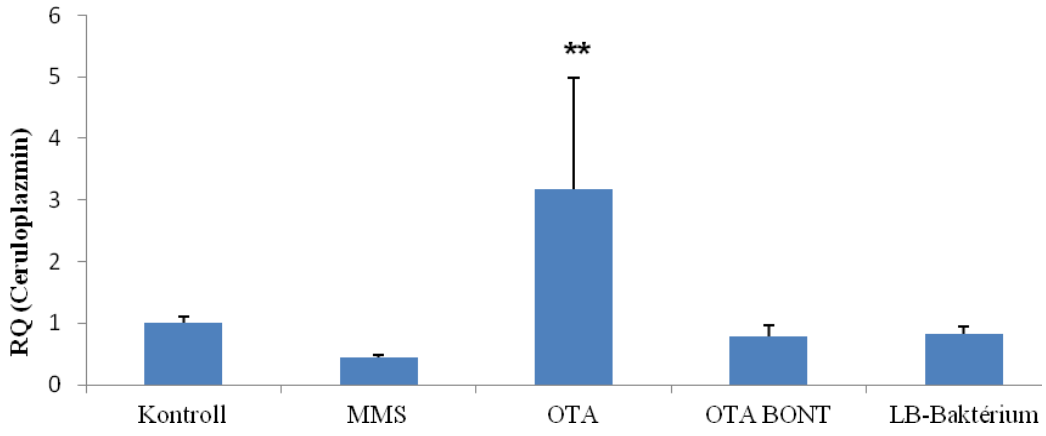


4.14. sz. ábra: Gadd 45 expressziójának változása az egérkezelési kísérletben a 21 napos krónikus toxicitási vizsgálat során, (FC = Fold change) (n=7-9, **p<0.01)



4.15. sz. ábra: A Gadd 153 expressziójának (RQ) változása az egérkezelési kísérletben a 21 napos krónikus toxicitási vizsgálat során (n=7-9, *p<0.05)

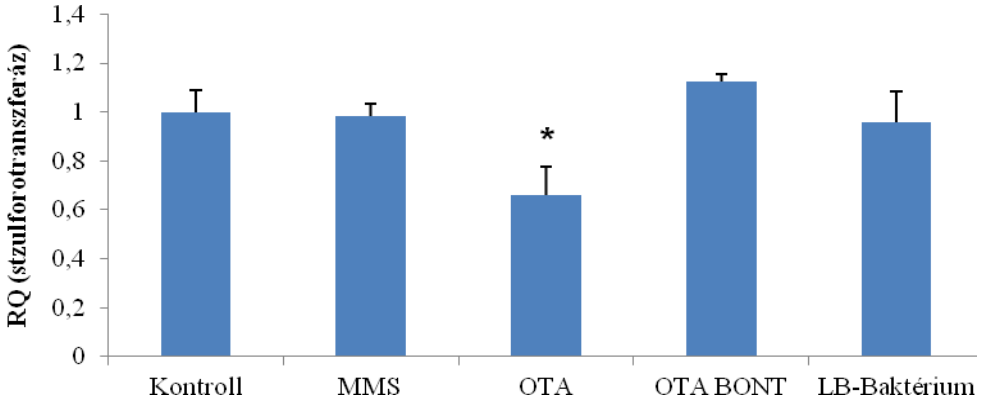
A 21 napos krónikus OTA kezelés szignifikánsan megemelte a ceruloplazmin expresszióját (4.16. sz. ábra) a kísérleti állatok veséjében. Az MMS kezelés a krónikus kezelés során nem változtatta meg a pozitív akut fázis markergén expresszióját. A **ceruloplazmin** mRNS expresszió nem változott a vesében a biodegradáció során keletkezett OTA bomlástermékek hatására. A markergén esetében a degradáció egyben detoxifikációnak is bizonyult és megszüntette a mikotoxin gyulladáskeltő és oxidatív stresszt okozó hatását. A csak médiumot (LB) és a biodegradációban használt baktérium felülúszót tartalmazó készítmény sem mutatott hatást a vese cortexben a ceruloplazmint vizsgálva.



4.16. sz. ábra: A ceruloplazmin expressziójának (RQ) változása az egérkezelési kísérletben a 21 napos krónikus toxicitási vizsgálat során (n=7-9, **p<0.01)

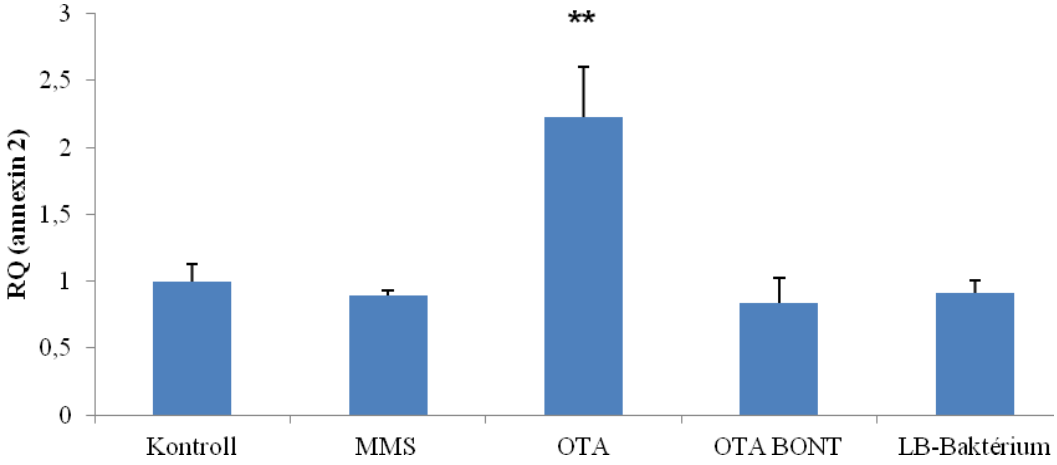
A 21 napos krónikus OTA kezelés szignifikánsan csökkentette a **szulfotranszferáz** K2 expresszióját (4.17. sz. ábra) a kísérleti állatok veséjében, míg az MMS kezelés a krónikus kezelés során nem befolyásolta a markergén expresszióját. A szulfotranszferáz K2 mRNS

expresszió nem változott a vesében a biodegradáció során keletkezett OTA bomlástermékek hatására.



4.17. sz. ábra: Szulfotranszferáz expressziójának változása az egérkezelési kísérletben a 21 napos krónikus toxicitási vizsgálat során (n=7-9, *p<0.05)

A 21 napos krónikus OTA kezelés szignifikánsan emelte az **annexin 2** expresszióját (4.18. sz. ábra) a kísérleti állatok veséjében, míg az MMS kezelés a krónikus kezelés során nem befolyásolta a markergén expresszióját. Az anxa2 mRNS expresszió nem változott a vesében a biodegradáció során keletkezett OTA bomlástermékek hatására. A markergén expressziójának mérése bizonyítja, hogy a degradáció egyben detoxifikációnak is bizonyult és megszüntette a mikotoxin által indukált potenciális karcinogén hatást a krónikus kezelés során. A csak médiumot (LB) és a biodegradációban használt baktérium felülúszóját tartalmazó készítmény nem mutatott hatást a vese cortexben az anxa2 mRNS szinteket mérve.



4.18. sz. ábra: Annexin 2 expressziójának (RQ) változása az egérkezelési kísérletben a 21 napos krónikus toxicitási vizsgálat során (n=7-9, **p<0.01)

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.3.1 és 4.3.2 fejezetekben bemutatott eredmények alapján):

(4. tézis) Az aflatoxin-B1 mikotoxin biodetoxifikációjára alkalmazott *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 baktériumtörzs hatékonysága *in vitro* laboratóriumi kísérletek mellett, ponty és brojlercsirke etetési tesztekben is igazolásra került. Az aflatoxin-B1 toxinnal szennyezett takarmány káros biológiai hatását a *R. pyridinivorans* AK37 baktériumtörzs sikeresen megszűntette, a szennyezett takarmány biodetoxifikációs kezeléssel már nem váltotta ki a toxikózis tüneteit a kísérleti állatokon.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.3.3 fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(5. tézis) A zearalenon mikotoxin biodetoxifikációjára alkalmazott *Rhodococcus pyridinivorans* K408 baktériumtörzs hatékonysága az *in vitro* laboratóriumi biodegradáció mellett patkány modell kísérletekben is igazolásra került. A zearalenon toxinnal szennyezett takarmány káros biológiai hatását a *R. pyridinivorans* K408 baktériumtörzs sikeresen megszűntette, a szennyezett takarmány biodetoxifikációs kezeléssel már nem váltotta ki a toxikózis tüneteit a kísérleti állatokon.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.3.3 fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(6. tézis) Az ochratoxin-A mikotoxin biodetoxifikációjára alkalmazott *Cupriavidus basilensis* ŐR16 baktériumtörzs hatékonysága az *in vitro* laboratóriumi biodegradáció mellett egér modell kísérletekben is igazolásra került. Az ochratoxin-A toxinnal szennyezett takarmány káros biológiai hatását a *C. basilensis* ŐR16 baktériumtörzs sikeresen megszűntette, a szennyezett takarmány biodetoxifikációs kezeléssel már nem váltotta ki a toxikózis tüneteit a kísérleti állatokon.

4.4 Genom projektek eredménye

A toxinbontási képességek és egyéb tulajdonságok alapján kiválasztottuk az AK37 jelölésű *Rhodococcus pyridinivorans*, valamint az ŐR16 jelölésű *Cupriavidus basilensis* törzset, hogy meghatározzuk a teljes genom szekvenciájukat.

Az AK37 törzs genomszekvenálását indokolta a törzs aromás mikotoxinbontási képessége AFB1 és a ZEA esetében is (KRIFATON ET AL., 2011, 2012). Az elvégzett teljes genom analízis előmozdítja, hogy izolálhassuk a kulcsenzimeket, amelyek résztvesznek az ártalmas összetevők lebontásában.

Az ŐR16 törzs genomprojekt elindítása mellett a törzs OTA és egyéb szennyezőanyag bontó képessége miatt döntöttünk.

4.4.1 Az *Rhodococcus pyridinivorans* AK37-es törzs genomja

A *Rhodococcus* nemzetség tagjainak nagy része nem patogén, eddig leírt 37 fajból 2 esetében állat/humán patogenitást (*R. equi, R. gordonia*) és 1 esetében növénypatogenitást (*R. fascians*) mutattak ki (GOETHALS ET AL., 2001). A nemzetségbe tartozó törzsek a prokarióták körében hatalmas genetikai anyaggal rendelkeznek, amely némileg indokolhatja, hogy az eddig ismert törzsekből csak kevés esetben valósult meg teljes genom analízis. Eddig 5 faj genom analíziséről van ismeretünk (Genbank): *R. erythropolis* (PR4), *R. equi* (103S), *R. opacus* (B4) és *R.* jostii (RHA1) és a legújabb az *R. ruber* (Chol-4) 2013-ból. Sikerült az AK37 jelzésű R. *pyridinivorans* törzs teljes genomszekvenálását elvégeznünk, amely az első a *Rhodochrous* kládba tartozó fajok közül. A törzs nemzetségen belül elfoglalt filogenetikai helyét lásd a 4.19. sz. ábrán.

A törzs aerob, nem spórás, gram-pozitív baktérium, amelyet nyersolajjal szennyezett talajból izoláltak Magyarországon 1984-ben. Molekuláris taxonómiai vizsgálattal *R. pyridinivorans* törzsként azonosítottuk (NCAIM PB1376), majd letétbe helyeztük a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében 2008-ban. Metabolitikus jellemzői miatt jó BTEX bontó törzsnek bizonyult (TÁNCSICS ET AL., 2008).

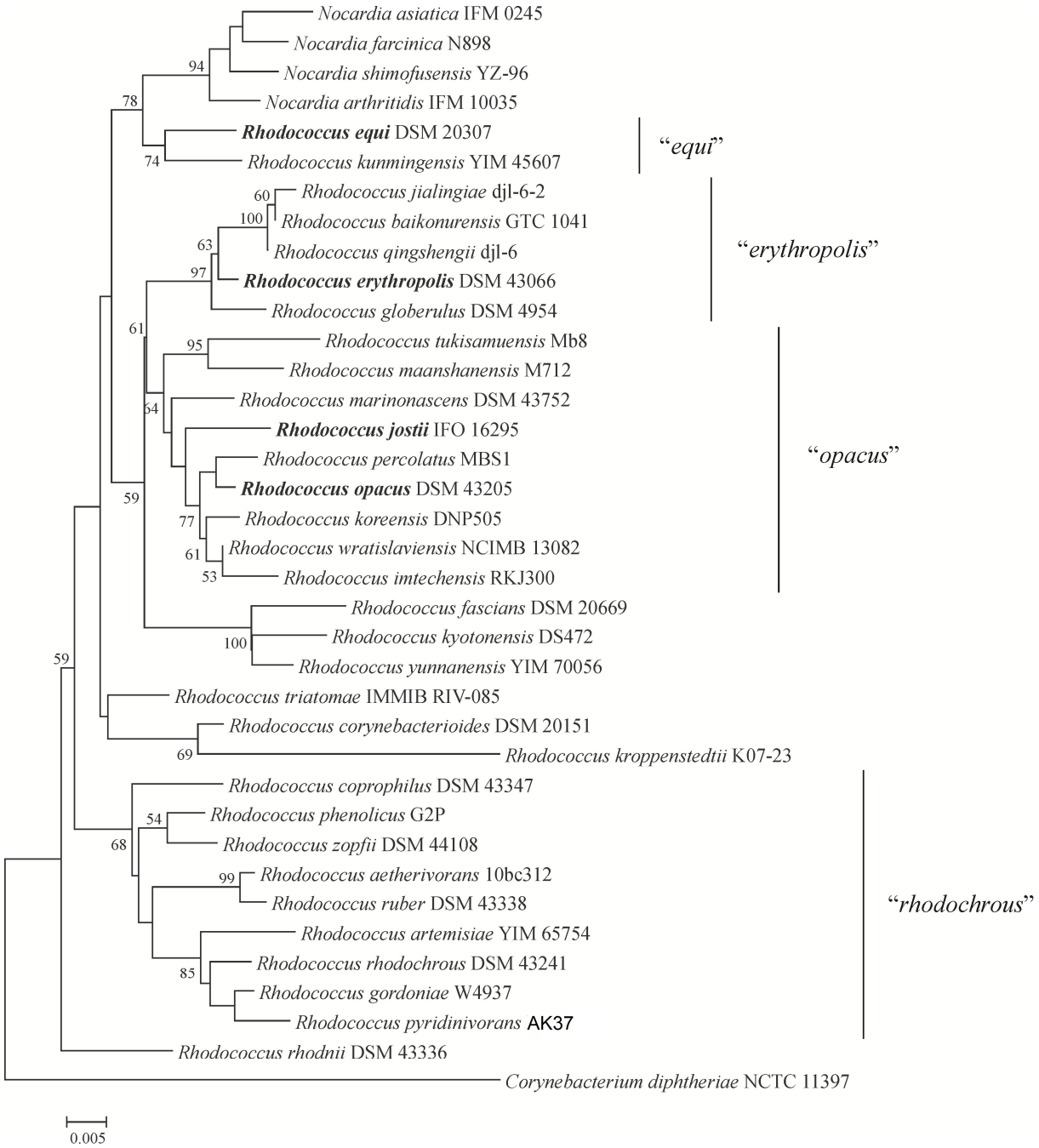
R. pyridinivorans AK37 törzs genomja 5,244,611 bázispárból áll (5,2 Mb), aminek GC tartalma 67,8% és 4,822 putatív kódoló szekvenciát, 52 tRHS és 3 rRNS lókuszt tartalmaz. A törzs genommérete kisméretűnek tekinthető az eddig ismert genomok alapján a Rhodococcus nemzetségen belül, a *R. jostii* (RHA1) törzsnek 9,7 Mb, a *R. opacus* (B4) törzsnek 8,8 Mb. A genomszekvenálás alapján azonosított géneket összesítettük a 4.20. sz. ábrán. A szekvenálási eredmények 117 aromás vegyületek bontásáért felelős génkópiát azonosítottak. Ezen belül a szekvenálás igazolta, hogy az AK37-s törzs legalább hat

különböző gyűrűhasító útvonallal rendelkezik a monociklikus aromás szénhidrogének lebontásához, ez genetikai bizonyíték a törzs kiváló BTEX bontó képességére. Az alábbi aromás szénhidrogén hasításért felelős géneket sikerült azonosítani: katekol 1,2- és 2,3-dioxigenáz, protokatekvát 3,4-dioxigenáz, benzoát 1,2-dioxigenáz, homogentizát, 1,2-dioxigenáz, orto-halobenzoát, 1,2-dioxigenáz. A gyűrűhasító gének meglétéből adódóan az aromás szerkezetű mikotoxinok bontása is indokolt. Az általam vizsgált *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok nagy AFB1 bontási képességgel rendelkeztek. Alkán és bifenil bontáshoz szükséges kulcsenzimeket is azonosítottunk a projekt során. Továbbá, a 3-ketoszteroid-9α-hidroxiláz (ksh) gén jelenléte utal a szteroidbontó képességre. Ez a gén azon ösztrogénhatású anyagok bontására való képességet feltételezz, melyek az ösztrogénhez hasonló kémiai szerkezettel rendelkeznek, mint a ZEA. A rhodochrous klán két tagjánál, a *R. rhodochrous* és a *R. jostii* esetében már leírták a *kshA, kshB* gének több homológjának jelenlétét. A *R. rhodochrous* DSM 43269 izolátumnál 5 különböző gén kópiát találtak *kshA1-5,* melyek különböző szteroid származékok katabolizmusában vesznek részt, mint például szterolok, pregnánok, androsztének és epesavak (PETRUSMA ET AL., 2011). A Ksh enzimről megállapították, hogy kétkomponensű: a terminális oxigenáz *KshA*, és a ferredoxin reduktáz *KshB* (PETRUSMA ET AL., 2011). A *R. pyridinivorans* AK37 NCAIM PB1376 lajstromszámú törzs teljes nukleotid szekvenciája az AHBW00000000 azonosítószámon lett a DDBJ/EMBL/GenBank adatbázisban elhelyezve.

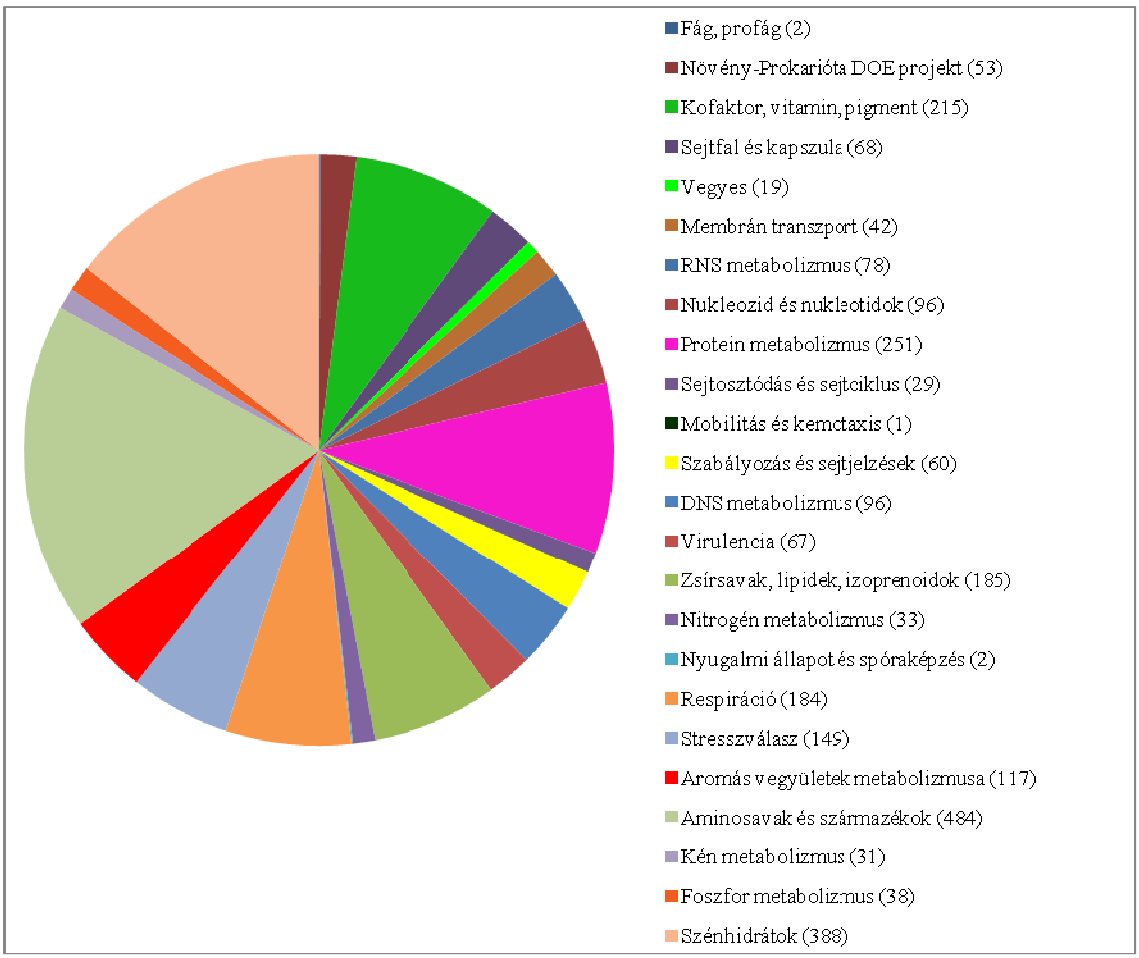
A genomszekvenálás során 67 db virulencia faktort azonosítottunk, melyek feldolgozása és pontos meghatározása folyamatban van. A szekvenáláskor az adott szoftver minden növényi és állati virulencia faktorra hasonlító génszakaszt ebbe a csoportba helyez el.

Ezidáig a fakultatív patogén *R. equi* (103S) törzsnek tárták fel részletesen a virulencia faktorok és a patogenitási képesség közötti kapcsolatokat gének szintjén (LETEK ET AL., 2010). Ez a törzs nem képes a szénhidrátok bontására, emiatt szénforrásként zsírsavakat hasznosít. Intracelluláris parazita baktériumként okoz megbetegedéseket állatokban és emberben, amelynek következtében számos antibiotikum nem képes kifejteni rá a hatását (LETEK ET AL., 2010).

A későbbiekben tervezem a meglévő genom adatok alapján ellenőrizni az *R pyridinivorans* AK37 törzsben azonosított virulencia faktorok összevetését az *R. equi* (103S) törzs génjeivel.



4.19. sz. ábra: *Rhodococcus pyridinivorans* faj filogenetikai helye a Rhodococcus nemzetségen belül



4.20. sz. ábra: Az AK37 izolátum teljes genom projektje során azonosított gének

4.4.2 A *Cupriavidus basilensis* ŐR 16 törzs genomja

A *Cupriavidus basilensis* ŐR16 törzset egy őrségi természetvédelmi területről 2008-ban izoláltam. Molekuláris taxonomiai vizsgálat alapján a *C. basilensis* faj képviselője, NCAIM BO2487 számon lett letétbe helyezve a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében. A metabolitikus tulajdonságai alapján jó kőolaj és mikotoxin (AFB1, OTA és T-2) bontó képességgel rendelkezik. A *C. basilensis* ŐR16 NCAIM BO2487 lajstromszámú törzs teljes nukleotid szekvenciája az AHJE00000000 azonosítószámon lett a DDBJ/EMBL/GenBank adatbázisban elhelyezve.

Az ŐR 16 jelű *C. basilensis* törzs teljes genomja 8,546,215 bázispárból áll, aminek GC tartalma 41,2% és 7,542 putatív kódoló szekvenciát tartalmaz. Az ŐR 16 törzs szekvenálása során azonosított génkópiák összesítését lásd a 4.21. számú ábrán.

A *C. basilensis* ŐR 16 genomjának áttekintése során az alábbiak határozhatók meg:

- A genomméret – 8,55 Mb – a legnagyobb a nemzetségen belül (Genbank adatbázis alapján), genom méret és szekvencia sorrendek alapján plazmid(ok) jelenléte szinte

biztosra vehető. Ezt alátámasztja a plazmid fenntartásáért, illetve replikációért felelős fehérjék megléte a vizsgált anyagban.

- 334 darab aromás gyűrű bontásáért felelős génszakaszt sikerült beazonosítani, melyek alapján a törzs rendelkezik katekol 1,2- és 2,3-dioxigenáz, protokatekvát 3,4-dioxigenáz, benzoát 1,2-dioxigenáz, (homo)gentizát 1,2-dioxigenáz (1 kópia), hidroxiquinol 1,2-dioxigenáz génekkel. A szteránvázas vegyületek bontására képes enzimet kódoló géneket is sikerült azonosítani: 3-ketoszteroid-9α-hidroxiláz.

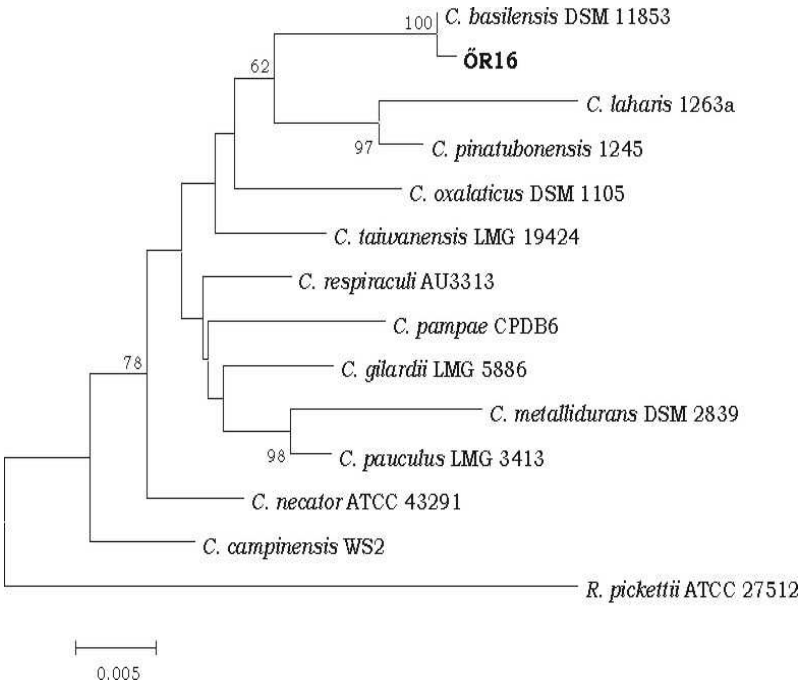
- A nehézfém toleranciáért felelős fehérjéket kódoló génszakaszok alapján az alábbi enzimeket, és azok által alkotott ion efflux rendszereket azonosítottuk: RND (Resistance, Nodulation, cell Division) családba tartozó permeázok, CDF (Cation Diffusion Factor) családba tartozó nehézfém transzporterek, P-típusú ATP-áz családba tartozó ion pumpák.

- Egyéb specifikus mechanizmusokat is észleltünk: CrO_4^{2-} efflux rendszer, $HAsO_4^{2}$-reduktáz és AsO^{2-} permeáz, Cu^{2+} periplazmatikus detoxifikációjáért felelős fehérjék.

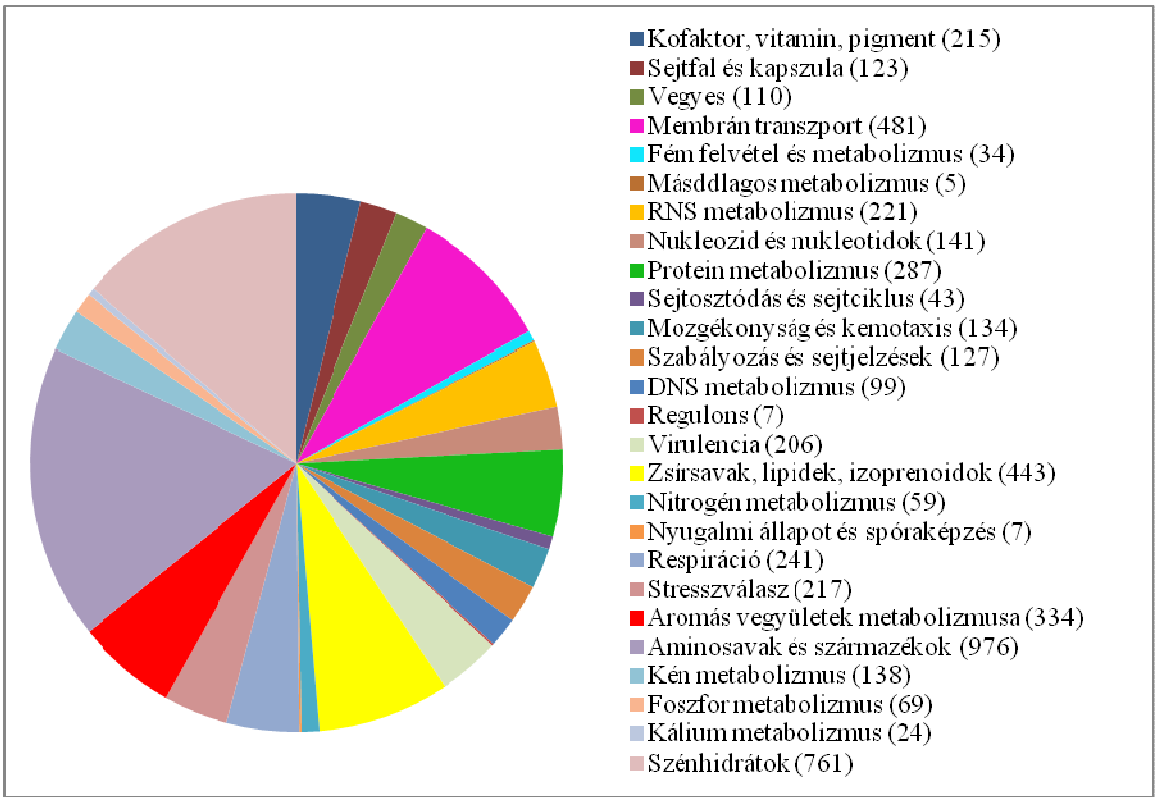
- Az ŐR16 egyedi metabolikus tulajdonsággal is rendelkezik a genom szekvencia alapján: glükózt tud hasznosítása szén- és energiaforrásként. A nemzetségében ez a törzs az egyetlen, amelynél glükóz porin (*OprB*) és glükóz-dehidrogenáz megtalálható a genomban. A *Cupriavidus* nemzetség tagjai nem képesek glükóz felvételére, mivel a porin hiányzik. Emiatt a nemzetség tagjai csak glükoneogenezis útján képesek glükóz-6-foszfát előállítására. Kivétel az általam izolált törzs, amely rendelkezik glükóz porin (*OprB*) és glükóz-dehidrogenáz kódoló génekkel és képes a glükóz bontására. Az ŐR16 törzs nemzetségen belül elfoglalt filogenetikai helyét lásd a 4.22. sz. ábrán.

Az utóbbi években több, a *Cupriavidus* nemzetségbe tartozó faj esetében figyeltek meg humánpatogenitást: *C. gillardi* - aplasztikus anemia, vérszegénység (KARAFIN ET AL., 2010), *C. pauculus* - extrakorporális membrán oxigenizáció során okozott fertőzés (STOVAL ET AL., 2010) és a *C. metalduriens* - nozokomiális vérmérgezés (LANGEVINET AL., 2011). Azonban mindegyik leírt esetben a beteg súlyos állapotban, legyengült immunrendszer mellett infektálódott az adott mikrobával.

A *C. metalduriens* faj genomszekvenálása során több virulencia faktort azonosítottak (JANSENN ET AL., 2010). A saját genom projektünk során is a *C. basilensis* fajnál 206 db virulencia faktort tártunk fel, melyek elemzése jelenleg folyamatban van.



4.21. sz. ábra: *Cupriavidus basilensis* ŐR16 nemzetségen belül elfoglalt filogenetikai helye



4.22. sz. ábra: Az ŐR16 izolátum teljes genom projektje során azonosított gének

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.5.1 fejezetben bemutatott eredmények alapján): (7. tézis) Elkészült az aflatoxin-B1 és zearalenon biodetoxifikációjára képes *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 mikroba teljes *de novo* genom projektje.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.5.2 fejezetben bemutatott eredmények alapján): (8. tézis) Elkészült az ochratoxin-A biodetoxifikációjára képes *Cupriavidus basilensis* ŐR16 mikroba teljes *de novo* genom projektje.

5. KUTATÁSOM SORÁN SZÜLETET ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Feltártam a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó 8 faj, 33 törzsének mikotoxinbontó képességét. A nemzetségen belül eddig toxinbontási tulajdonságáról ismeretlen 3 fajnál (*R. globerulus, R. pyridinivorans, R. rhodochrous)* aflatoxin-B1, 2 fajnál (*R. pyridinivorans, R. erythropolis)* pedig zearalenon biodetoxifikációs képességet mutattam ki. További 5 fajnál *(R. erythropolis, R. globerulus, R. rhodochrous, R. coprophilus, R. gordoniae)* elsőként írtam le T-2 toxin biodegradációját.

2. A *Cupriavidus* és *Sphingopyxis* nemzetség esetében ochratoxin-A; a *Microbacterium, Pseudoxanthomonas* nemzetség esetében T-2 toxin; a *Pseudomonas* nemzetség esetében aflatoxin-B1 biodegradációt mutattam ki.

3. A prokarioták esetében elsőként mutattam ki multimikotoxin biodegradációt és biodetoxifikációt. Az aflatoxin-B1 és a zearalenon detoxifikálására, továbbá a T-2 toxin bontására képes a *R. erythropolis* NI1 jelzésű törzsnél. Két mikotoxin, az aflatoxin-B1 és a zearalenon együttes biodetoxifikációjára képes a *R. pyridinivorans* K408 jelzésű törzs, valamint az aflatoxin-B1 detoxifikálására és T-2 toxin együttes bontására képes a *R. rhodochrous* NI2 jelzésű törzs.

4. Az aflatoxin-B1 mikotoxin biodetoxifikációjára alkalmazott *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 baktériumtörzs hatékonysága *in vitro* laboratóriumi kísérletek mellett, ponty és brojlercsirke etetési tesztekben is igazolásra került. Az aflatoxin-B1 toxinnal szennyezett takarmány káros biológiai hatását a *R. pyridinivorans* AK37 baktériumtörzs sikeresen megszűntette, a szennyezett takarmány biodetoxifikációs kezeléssel már nem váltotta ki a toxikózis tüneteit a kísérleti állatokon.

5. A zearalenon mikotoxin biodetoxifikációjára alkalmazott *Rhodococcus pyridinivorans* K408 baktériumtörzs hatékonysága az *in vitro* laboratóriumi biodegradáció mellett patkány modell kísérletekben is igazolásra került. A zearalenon toxinnal szennyezett takarmány káros biológiai hatását a *R. pyridinivorans* K408 baktériumtörzs sikeresen megszűntette, a szennyezett takarmány biodetoxifikációs kezeléssel már nem váltotta ki toxikózis tüneteit a kísérleti állatokon.

6. Az ochratoxin-A mikotoxin biodetoxifikációjára alkalmazott *Cupriavidus basilensis* ŐR16 baktériumtörzs hatékonysága az *in vitro* laboratóriumi biodegradáció mellett egér modell kísérletekben is igazolásra került. Az ochratoxin-A toxinnal szennyezett takarmány káros biológiai hatását a *C. basilensis* ŐR16 baktériumtörzs sikeresen megszűntette, a szennyezett

takarmány biodetoxifikációs kezeléssel már nem váltotta ki, toxikózis tüneteit a kísérleti állatokon.

7. Elkészült az aflatoxin-B1 és zearalenon biodetoxifikációjára képes *Rhodococcus pyridinivorans* mikroba teljes *de novo* genom projektje.

8. Elkészült az ochratoxin-A biodetoxifikációjára képes *Cupriavidus basilensis* mikroba teljes *de novo* genom projektje.

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Kutatásom évei alatt nem csak mikroorganizmusokkal foglalkoztam, hanem gyakorló mezőgazdászként nap, mint nap tapasztaltam az időjárási anomáliák egyre gyakoribbá válásából, hogy a klímaváltozással kapcsolatos előrejelzések és szcenáriók nem a század második felében következnek be, hanem már itt vannak. Ez már nem a megelőzés, hanem az alkalmazkodás időszaka. Kutatócsoportunk igazolta elsőként az aflatoxin termelő gombák megjelenését az országban (DOBOLYI ET AL., 2011), ami kezdetben heves vitákat váltott ki. Sajnálatos módon az élet igazolta a forgatókönyvet, amit laboratóriumi körülmények között már korábban láttunk – 2012-ben az ország tejiparát egy hajszál választotta el az összeomlástól az AFB1 tartalmú takarmányok jelenléte miatt. A 2012-es világaszály megmutatta, hogy nem az a kérdés, van-e mikotoxin mentes gabonánk, hanem van-e egyáltalán gabonánk a népesség számára. Azaz a megtermelt gabona mikotoxin mentességét szinte lehetetlen lesz betartani növénytermesztési technológiákkal. A már megtermelt és betárolt gabonában különböző módszerekkel kell csökkentenünk a mikotoxinok szintjét, ehhez nyújthat egy lehetséges megoldást a jelen munkám.

Kutatásom során sikerült több mikroorganizmust azonosítanom, amelyek káros metabolitok nélkül képesek a különféle mikotoxinok bontására, biodegradációjára. Korábbi vizsgálatokban egyes kutatócsoportok bizonyították egy-egy mikroorganizmus, vagy azok által termelt enzim mikotoxinbontó képességét, de hasonló volumenű tanulmány, amelyben több mint hatvan mikroszervezet átvizsgálása történt meg, és közel harminc mikroszervezet mikotoxinbontó képességét mutatták be, nem létezik. Ezáltal a tudomány és a gyakorlat számára is sikerült bővítenem jelentős mértékben a rendelkezésre álló és felhasználható mikrobák számát a mikotoxin-mentesítés és biodegradáció terén.

Az általam vizsgált mikotoxinok biodegradácójára képes törzsek detoxifikációs képességét több módszerrel is igazoltam: proteináz-K vizsgálat, pellet vizsgálat, és biotesztekkel történő geno- és citotoxicitás, EDC hatáselemzés, valamint állatetetési és kezelési kísérletek. A munkám során azonosított és mikotoxinok biodegradációjára képes törzsek esetében sikerült feltérképezni és bemutatni, hogy melyek képesek káros mellékhatások és metabolitok nélkül lebontani az adott toxinokat, ami jelenleg EFSA előírás az EU-ban (EFSA, 2009).

Vizsgálataim fókusza elsősorban a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó törzsekre irányult, mivel ez egy rendkívüli anyagcsere folyamatokkal megáldott nemzetség és a tanszékünk is jelentős számú szénhidrogének bontására képes izolátummal rendelkezik. Több faj esetében már évtizedek óta létező konkrét ipari hasznosítási eljárások vannak pl: sztirén

gyártás stb. 2005-ben Teniola és munkatársai végeztek az AFB1 esetében bontási kísérletet, amely jelen munkának is az egyik kiindulási pontja. A német és afrikai kutatókból álló csoport a *R. erythropolis* extracelluláris enzimeivel sejtmentes mátrixban sikeresen megszűntette az AFB1 mutagén hatását. A *Rhodococcus* nemzetségen belül más mikotoxin bontásáról nem volt fellelhető szakirodalmi adat. Munkám során harmincnál több *Rhodococcus* faj toxinbontási profilját vettem fel, ami alapján azt a következtetést vontam le, hogy *R. erythropolis* fajon kívül, AFB1 bontásra képes faj a *R. ruber, R. globerulus, R. coprophilus, R. gordoniae, R. pyridinivorans* és *R. erythropolis* képviselői. Az eredményeim alapján az is elmondható, hogy a bontási képesség szempontjából nemcsak a fajok között, hanem egy fajon belül is jelentős eltérések lehetnek. Mindezek mellett a toxinbontási profil arra is rámutatott, hogy az AFB1 toxinon kívül a *Rhodococcus* nemzetség egyes tagjai jelentős ZEA (*R. pyridinivorans, R. erythropolis és R. ruber*) és T-2 (*R. erythropolis, R. globerulus, R. rhodochrous, R. coprophilus* és *R. gordoniae)* bontó tulajdonsággal is rendelkeznek. Bár két toxin (ZEA-OTA) szimultán bontásáról a szakirodalom egy mikroorganizmus esetében már beszámolt (*Trichosporon mycotoxinivorans*), két további mikroszervezet (*R. pyridinivorans és R. rhodochrous)* két mikotoxin (AFB1-ZEA, AFB1-T-2) párhuzamos bontása és a *R. erythropolis* N11 multimikotoxin bontása (AFB1, ZEA és T-2) a területen eddig publikált eredmények szerint egyedülálló tulajdonság.

A *Rhodococcus* nemzetségeken kívül kiemelném a *Cupriavidus* nemzetséget, amelyből a *C. basilensis* jelentős OTA bontási képességgel rendelkezik, ezen faj mikotoxin bontási képessége ezidáig ismeretlen volt és egyre több, a tudomány számára új és izgalmas információ lát napvilágot, miszerint a faj aromás gyűrűk bontására alkalmas enzimrendszerekkel rendelkezik. Kutatásom eredményeivel és két *de novo* genom projekt elvégzésével új felhasználási lehetőségek nyílnak meg a *Rhodococcus* és *Cupriavidus* nemzetségbe tartozó törzsek gyakorlati felhasználásában.

Az egyik lehetőség a törzsek stabilizált enzim rendszereinek takarmány kiegészítőként történő felhasználása annak érdekében, hogy a mikotoxinok hatása csökkenjen. Ugyanakkor a genom projektek más, a vegyipar és környezetvédelem számára is izgalmas lehetőségeket tartogatnak. A teljes genomelemzéssel sikerült azonosítani és kialakítani az enzimrendszerek tanulmányozásának a bázisát a *Rhodococcus* és *Cupriavidus* törzsek esetében. A mikotoxinok esetében új takarmányokhoz adagolható mikroba vagy enzim alapú készítmények kifejlesztésére nyílik mód, továbbá az enzimrendszerek feltárásával az aromás szerkezetű szennyezőanyagok ártalmatlanításának lehetősége is előtérbe kerülhet. Előbbi létjogosultságát alátámasztja, hogy az eddig rendelkezésre álló lehetőségek száma kevés és az ismereteink bővülésével bizonyos alkalmazásokat el kell vetnünk pl: a kémiai kezelések már ma sem

engedélyezettek az Európai Unióban a beavatkozások hatására keletkező toxikus metabolitok miatt, egyes mikotoxinok esetében alkalmazott agyagásványok adszorpciós hatékonyságát egyre többször megkérdőjelezik, vagy a biodetoxifikációs ágensként alkalmazott mikrobáról derül ki humán patogenitása.

A munkám során kiválasztott mikotoxin-biodegradációra képes három törzs (AK37, K408 és ŐR16) hatékonyságát több módszerrel is ellenőriztem, tekintettel a mikotoxinok és azok bomlástermékeinek hatásának megszűnésére. Az AFB1 esetében az SOS-Chromo teszt, valamint két állatetetési (hal, brojlercsirke) kísérlettel sikerült igazolni a mikotoxin-detoxifikációs képesség hatékonyságát. A ZEA esetében az EDC hatás vizsgálatára kifejlesztett BLYES tesztrendszerrel, valamint egy patkánykezelési kísérlet eredményeivel sikerült alátámasztani a törzs káros metabolitoktól mentes mikotoxinbontó képességét. Az OTA esetében pedig egy egérkezelési kísérlet eredményei igazolták a mikotoxinbontó és detoxifikáló képesség meglétét. Ezen bioteszteken és állatmodelleken lefolytatott vizsgálatokkal sikerült igazolnom azok biodegradációs képességük hatékonyságát. A T-2 tekintetben javasolható egy, a toxinra fejlesztett biológiai teszt alkalmazása és adaptálása, mivel a vizsgált mikotoxinok közül ez az egyetlen, amely bontási maradékát vagy a toxin hatását nem volt lehetőségem vizsgálni.

Az előző bekezdésben említett biológiai hatásvizsgálatok közül a magasabb rendű szervezeteken végzett kísérleteket számba véve:

(i) Az AK37 *Rhodoccocus pyridinivorans* törzzsel kezelt aflatoxinnal szennyezett kukoricát brojlercsirke és hal etetési tesztben sikeresen alkalmaztam.

A brojlercsirke etetési kísérlet során a kiválasztott törzzsel kezelt kontroll takarmánnyal etetett csirkék magasabb testtömeg értékeket mutattak, mint a mikrobamentes kontroll takarmánnyal etetett csirkék, bár a különbség nem volt szignifikáns. Erre a testtömeg különbségre magyarázatot adhat, hogy a kísérletemben a biodetoxifikációra kiválasztott törzs (*R. pyridinivorans)* egy nemzetségébe tartozik azzal a *R. opacus* törzzsel, amiről leírták, hogy a trigliceridek felvételét serkentő probiotikus hatással rendelkezik, amelyet malacokkal folytatott kísérlet során tapasztaltak (American Society of Animal Science, 2013, HTTP3). Ez a megfigyelés további irányt adhat a munkám során kiválasztott *Rhodococcus* törzsek takarmányok kezelésére történő alkalmazására.

(ii) A K408 *Rhodoccocus pyridinivorans* törzs ZEA bontási maradékát patkánykezelési modell kísérletben ellenőriztük.

Mind a két *Rhodoccocus pyridinivorans* törzs az addigi mikrobiológiai és bioteszt vizsgálatokkal megegyező eredményeket adott, azaz biztonságosan felhasználhatóak az adott mikotoxin biodegradációjára.

(iii) Az ŐR16 *Cupriavidus basilensis* törzzsel egérkezelési modell kísérletben ellenőriztük a törzs anyagcseretermékeinek és az ochratoxin-A biodegradációs mellék- és bomlástermékek biztonságosságát. Az eredmények alapján az általam kiválasztott törzsek hatékonyan és biztonságosan felhasználhatóak takarmányokban mikotoxin mentesítés céljára.

Az előző bekezdésekben említett *R. pyridinivorans* (AK37, K408) és *C. basilensis* törzsek (ŐR16) toxinbontási képességéhez hasonló eredmények a szakirodalomban fellelhetők (2.6 sz. táblázat), de a biodetoxifikáció igazolására hasonlóan széleskörű toxikológiai felmérés nem készült, gyakorlati felhasználásban pedig ezidáig egyetlen a kereskedelemi forgalomban is kapható készítmény létezik. Ennek egyik alapanyaga a *Trichosporon mycotoxinivorans* élesztő újszerű és egyedi fajnak volt tekinthető OTA és ZEA bontásának köszönhetően (MOLNÁR ET AL., 2004). A törzs hatásosan csökkentette a ZEA és OTA toxicitását haszonállatokon tesztelve (POLITIS ET AL., 2005; HOFSTETTER ET AL., 2006). Az utóbbi években azonban Hickey és munkatársai (2009) a *T. mycotoxinivorans* mikroszervezet humán patogén tulajdonságait fedezték fel, ami a készítmény biztonságos alkalmazhatóságát kérdőjelezi meg. A *T. mycotoxinivorans* patogén tulajdonságát azonban Tintelnot és munkatársai 2011-ben cáfolták.

Az általam feltárt mikotoxinbontó törzsek biztonságosan alkalmazhatóak a különböző biodetoxifikációs eljárások során, amennyiben a további toxikológiai vizsgálatokban sem merül fel negatív hatás. Másik felhasználási lehetőségként a törzsek által termelt enzimekből előállított készítmény potenciális biodetoxifikáló ágens lehet, amelyhez az elvégzett két genom projekt megteremti a mikotoxinok bontásában részvevő enzimek feltárásának bázisát.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásom során különböző mikotoxinok biodegradációjára képes mikroorganizmusok izolálása, szelektálása valamint gyakorlati hasznosítási lehetőségük vizsgálata volt a fő célom.

A kísérletekbe vont mikroorganizmusokat folyékony tápoldatos (LB) rázatásos tenyészetben teszteltem hat gazdaságilag jelentős mikotoxinra (AFB1, ZEA, OTA, T-2, DON, FB1). Az első lépésben közel háromszáz mikroszervezet mikotoxin-bontási tulajdonságukra irányuló válogatását végeztem el immunanalitikai és kémiai analitikai eszközrendszer adaptálásával és fejlesztésével (ELISA és HPLC). Vizsgálataim során tizenhárom nemzetség huszonegy fajának ötvennégy törzséről bizonyítottam, hogy mikotoxin degradációra képesek; ezek közül szelektáltam a leghatékonyabb AFB1, ZEA, OTA és T-2 bontásra képes mikroszervezeteket, amelyek döntően a *Rhodococcus* nemzetségbe tartoztak.

Összesen harminchárom baktérium törzs esetében sikerült több mikotoxin esetében biodegradációs képességet (multi mikotoxinbontás) kimutatni, amelyek közül a *Rhodococcus erythropolis* N11 multimikotoxin bontása (AFB1, ZEA és T-2) a területen eddig publikált eredmények szerint egyedülálló tulajdonság.A kiemelkedő degradációs képességgel rendelkező törzsek biológiai hatásmérésen alapuló szelektálását AFB1 és ZEA esetében, pro- és eukarióta tesztszervezeteken végeztem el. A vizsgálati eredmények ismeretében egy negyvenöt tételből álló mikroba törzsgyűjteményt alakítottam ki, amely tételek biztonságosan, káros citotoxikus, genotoxikus és hormonhatású metabolitok nélkül képesek adott mikotoxin biodegradációjára.

A mikotoxin biodegradáció genetikai alapjainak fejlesztésére AFB1, ZEA és OTA bontó *Rhodococcus pyridinivorans* és *Cupriavidus basilensis* törzsek *de novo*, teljes genom projektjeit készítettem el, amelynek fontos szerepe lesz a mikotoxinok lebontásáért felelős anyagcsere-folyamatok és enzimrendszerek azonosításában.

Sikerült a tanszékünk által izolált Zt80 AFB1 termelő *Aspergillus* gombatörzzsel fertőzött kukoricát (amely nagy mennyiségű AFB1 koncentrációt mutatott a laborvizsgálatok során) szárazfermentációs eljárásban az AK37 jelzésű *Rhodococcus pyridinivorans* törzzsel biodetoxifikálnom; és ezáltal alapanyagot előállítani állatetetési kísérletekhez, amelyekkel ellenőrizhettem a mikotoxinbontásra képes mikroszervezet hatékonyságát és alkalmazhatóságát. Ennek az AFB1-el szennyezett kísérleti alapanyagnak az előállítása alkalmas lehet további állatetetési kísérletek tervezéséhez és kivitelezéséhez.

A mikotoxin biodetoxifikáció gyakorlati lehetőségeinek állatetetési és kezelési tesztekben történő demonstrálását hal, madár és emlős modellekben, AFB1, ZEA és OTA-bontó mikrobák felhasználásával sikerült igazolnom.

A hal etetési teszt eredményei szerint az 1 µg/ml körüli aflatoxin szennyezés a takarmányban jelentős elhullást okozott, a máj degeneratív, mérgezésre utaló elváltozását detektáltuk, míg a biodetoxifikált takarmányon nevelt pontyoknál tizedannyi elhullást, mérsékelt májelváltozást tapasztaltuk.

A brojlercsirke etetési tesztnél az aflatoxinos takarmánnyal etetett csirkéknél étvágytalanságot, a napi súlygyarapodás csökkent szintjét, szignifikáns testtömeg csökkenést, a fittségben, egészségállapotban megfigyelhető leromlást tapasztaltunk. A biodetoxifikált takarmányt használva a testtömeg nem tért el szignifikánsan a toxinmentes kontrolltól, normál egészségi állapot volt tapasztaltható, viszont a toxintartalmú takarmányt fogyasztó csoporthoz képest a 42 napos kísérlet végén, mintegy 40 dekagrammos testtömeg növekedés volt megfigyelhető, a biodetoxifikált takarmánnyal etetett csirkék javára. A brojlercsirke etetési eredmények alapján nem zárható ki, hogy a biodetoxifikációra kiválasztott *Rhodococcus* törzseknek lehet probiotikus hatása is; ahogyan azt már korábbi vizsgálatok során is feltételezték (American Society of Animal Science, 2013, HTTP3), ez további kutatásokat tesz szükségessé.

Patkánykezelési kísérletben ellenőriztük a *R. pyrinidivorans* K408 törzs ZEA-bontási képességének biztonságát. A kísérletben a törzs ZEA-bontási maradékának ösztrogénhatását vizsgáltuk egy összetett (BLYES teszt, ELISA, HPLC és patkánykezelési teszt) vizsgálati módszerrel.

Az eredmények alapján a *Rhodococcus pyridinivorans* K408 törzs sikeresen elbontotta a beállított ZEA koncentrációt folyékony LB tápoldatban, káros bomlástermék nélkül. Az így kezelt (biodetoxifikált) és liofilizált tápoldat patkányokkal történő etetését követően nem tapasztaltunk elváltozást a patkányokban a kontroll csoportokhoz viszonyítva, amely igazolja a BLYES tesztben kapott eredményeket, miszerint a *R. pyridinivorans* K408 jelzésű törzs ZEA sikeres biodetoxifikációjára képes.

Az ŐR16 jelű *Cupriavidus basilensis* törzzsel végzett OTA bontási kísérletek és azokon alapuló egérkezelési vizsgálatok során gyulladási, detoxifikációs és stressz folyamatokat jelző markergének kifejeződésének vizsgálatával igazoltuk, hogy az ŐR16 törzs hatékony és biztonságos biodetoxifikációs eszközzé válhat.

A bemutatott eredmények alapján az általam feltárt mikotoxinbontó törzsek potenciális lehetőséget nyújtanak a különböző biodetoxifikációs eljárásokban. A jövőben számolnunk kell a gyakori mikotoxin szennyezettséggel, amely ellen az egyik védekezési forma a szennyezett alapanyagok ártalmatlanítási és hasznosítási lehetősége, a disszertációmban is ismertetett eljárások alkalmazásával.

8. ENGLISH SUMMARY

The major goal of my research was to isolate and select effective mycotoxin degrading microbes that could be applicable for practical purposes.

Microbes applied in my experiments were grown in liquid medium (LB), together with 6 economically important mycotoxins (AFB1, ZEA, OTA, T-2, DON, FB1). In the firt step three hundred microbes were screened for their mycotoxin degrading potential by the application of ELISA and HPLC methods. During my research mycotoxin degrading potential of fifty-four strains belong to twenty-one species in thirteen genus was proved. From the fifty-four strains the best degraders for AFB1, ZEA, OTA and T-2 were selected, which strains for the most part were the members of the *Rhodococcus* genus.

Altogether thirty-two strains could degrade two or more mycotoxins (multi-mycotoxin degradation). Out of these multi-mycotoxin degraders the *Rhodococcus erythropolis* N11 strain that is applicable against three mycotoxins (AFB1, ZEA and T2 AFB1, ZEA and T-2) is unique among so far published mycotoxin degraders.

Strains with outstanding degradation ability were investigated for biodetoxification in the case of AFB1 and ZEA by pro- and eukaryote test organisms. On the base of results, forty-five strains were collected, which can degrade mycotoxins without genotoxic or endocrine disrupting effect.

For developing the genetic base of mycotoxin biodegradation, *de novo* genome project of AFB1-ZEA and OTA degrader strains (*Rhodococcus pyridinivorans* and *Cupriavidus basilensis)* were accomplished. These results contribute to the identification of the metabolic pathways and enzyme systems playing role in the mycotoxin degradation.

For the biodetoxification of AFB1 contaminant corn, a dry-fermentation method was successfully developed using AK37 *Rhodococcus pyridinivorans* strain. The corn was infected by the Zt80 *Aspergillus flavus* strain that was isolated and proved for high AFB1 production by our Department. Hereby, feed was prepared for animal tests to verify the effectiveness and usefulness of the selected mycotoxin degraders. This strategy for producing AFB1 contaminated row material support the construction and implementation of further animal feeding experiments.

The practical utility of mycotoxin (AFB1, ZEA and OTA) biodetoxification was demonstrated in animal tests by applying fish, bird and mammal models, in the case of degrader microbes.

According to the result of the fish feeding experiment, 1 µg/ml AFB1 contamination resulted significant mortality and liver degeneration; while in groups with animals treated by biodetoxificated feed, the mortality were one-tenth and the liver degeneration was moderate.

During the animal feeding experiment applying broiler chickens, the AFB1 contaminated feed produced lack of appetite, decreased daily weight gain, significant decrease of body weight, loss of fitness and health conditions. Biodetoxificated feed did not cause significant difference in the body weight compared to the Control group without mycotoxin, and also the health condition of the chickens was normal. Moreover, at the end of the 42 day long experiment an increase with 0,4 kg bodyweight was detected for the benefit of chickens feeded by the detoxificated fodder. On the base of these results *Rhodococcus* strains selected for the biodetofication may have probiotic effect, as it was presumable in other experiments (American Society of Animal Science, 2013, HTTP3). However, further studies are needed to enhance this observation.

During a rodent based *in vivo* toxicological experiment the effectiveness and safety of ZEA degradation by *R. pyrinidivorans* K408 strain was investigated. In this experiment the endocrine disrupting effect of adventitious metabolites of ZEA was studied and confirmed by a complex method (BLYES, ELISA, HPLC).

According to the results the *Rhodococcus pyridinivorans* K408 strain successfully degraded the ZEA in liquid LB medium, without any harmful metabolites; since no changes were observed regarding rats treated by this biodetoxificated and lyophilized medium compared to the control group, which confirms the results of the BLYES test, which also indicated that the *R. pyridinivorans* K408 strain is able to biodetoxificate the ZEA.

A similar experiment was carried out by the *Cupriavidus basilensis* ŐR16 strain. The OTA biodegradation ability of the strain ŐR16 was investigated in *in vivo* toxicological tests. The expression of genotoxic, apoptotic, detoxification and inflammation related genes were monitored. This study has demonstrated that *C. basiliensis* Őr16 efficiently degrade OTA without producing toxic adventitious metabolites

According to the presented results, mycotoxin degrading microbes that were revealed in my work are providing an ideal opportunity for the biodetoxification methods.

In the future we have to take account of frequent mycotoxin contaminations. Against the mycotoxin contaminated row materials potential remediation processes could be those methods that are described in this dissertation.

9. MELLÉKLETEK

1. számú melléklet: Irodalomjegyzék

1. ABBAS, H.K., MIROCHA, C.J., AND SHIER, W.T., (1984): Toxicity of mycotoxins produced from fungi isolated from food stuffs and soil: comparison of toxicity in fibroblasts and rat feeding tests. Applied and Environmental Microbiology. 48, 654-61. p.

2. ABRAMSON, D., MILLS, J. T., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A. (1997): Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from western Canada, *1982-1994.* Canadian Journal of Veterinary Research 61, 49-52. p.

3. ABRUNHOSA L., SANTOS L., VENÂNCIO A., (2006): Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*, Food Biotechnology. 20 , 231–242. p.

4. AISLABIE J, SAUL DJ, FOGHT JM (2006) Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. Extremophiles 10:171–179. p.

5. ALTALHI, A.D. (2007): Plasmid-mediated detoxification of mycotoxin zearalenone in *Pseudomonas sp.* ZEA-1, American Journal of Biotechnology and Biochemistry 3 (3): 150-158. p.

6. ALTALHI, A.D. & EL-DEEB, B. (2009): Localization of zearalenone detoxification gene(s) in pZEA-1 plasmid of *Pseudomonas putida* ZEA-1 and expressed in *Escherichia coli*. Journal of Hazardous Materials, 161 (2-3) 1166–1172. p.

7. ALVAREZ HM, MAYER F, FABRITIUS D, STEINB€UCHEL A (1996): Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by Rhodococcus opacus strain PD630. Archives of Microbiology 165:377–386. p.

8. ALY HA, HUU NB, WRAY V, JUNCA H, PIEPER DH (2008): Two angular dioxygenases contribute to the metabolic versatility of dibenzofuran-degrading Rhodococcus sp. strain HA01. Applied and Environmental Microbiology 74:3812–3822. p.

9. AMADOU C, PASCAL G, MANGENOT S, GLEW M, BONTEMPS C, CAPELA D, CARRÈRE S, CRUVEILLER S, DOSSAT C, LAJUS A, MARCHETTI M, POINSOT V, ROUY Z, SERVIN B, SAAD M, SCHENOWITZ C, BARBE V, BATUT J, MÉDIGUE C, MASSON-BOIVIN C., (2008): Genome sequence of the beta-rhizobium Cupriavidus *taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. Genome Research 18: 1472-1483. p.

10. AOAC OFFICIAL METHOD 990.33 Aflatoxins in corn and peanutbutter (KSZ-89)

11. APSIMON, J. W. ,BLACKWELL, B. A. , BLAIS, L. , FIELDER, D. A. , GREENHALGH, R. , KASITU, G. , MILLER, J. D. , SAVARD, M. (1990): Mycotoxins from *Fusarium* species: detection, determination and variety. Pure and Applied Chemistry. 62, 339-346. p.

12. ASPRAY TJ, HANSEN SK, BURNS RG (2005): A soil-based microbial biofilm exposed to 2, 4-D: bacterial community development and establishment of conjugative plasmid pJP4. FEMS Microbiol Ecology 54:317–327. p.

13. AUFFRAY, Y. & BOUTIBONNES, P. (1984): Genotoxic activity of some mycotoxins using the sos chromotest. Mycopathologia, 100 (1) 49–53. P.

14. AUFFRET, M., LABBE,D., THOUAND,G., GREER,C.W. AND FAYOLLE-GUICHARD,F. (2009): Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by Rhodococcus aetherivorans and Rhodococcus wratislaviensis Applied and Environmental Microbiology. 75 (24) 7774-7782. p.

15. BARNES MR, DUETZ WA, WILLIAMS PA., (1997): A 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid catabolic pathway in Rhodococcus globerulus PWD1: cloning and characterization of the hpp operon. Journal of. Bacteriology. 179 (19) 6145-53. p.

16. BEDARD, L.L. & MASSEY, T.E. (2006): Aflatoxin-B1-indicated DNA damage and its repair. Cancer Letters, 241 (2) 174–183. p.

17. BELL, R.M., HANNUN. Y.A., MERRILL, A.H. (1993): Advances in lipid research: sphingolipids and their metabolites. Orlando, Florida, Academic Press, vol 25-26.

18. BENNETT, J. W. & KLICH, M. (2003): Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews, 16 (3) 497–516. p.

19. BENEDETTI, R., NAZZI, F., LOCCI, R., FIRRAO, G., (2006): Degradation of fumonisin B1 by a bacterial strain isolated from soil, Biodegradation 17, 31–38. p.

20. BERNSTEIN A, ADAR E., NEJIDAT A., RONEN Z., (2011): Isolation and characterization of RDX-degrading Rhodococcus species from a contaminated aquifer, Biodegradation

21. BERTHILLER, F., SCHUHMACHER R., ADAM, G. AND KRSKA, R., (2009): Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. Analytical and Bioanalytical Chemistry 395, 1243-1252. p.

22. BETINA, V. (1989): Mycotoxins: Chemical, biological and environmental aspects. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 437. p.

23. BINDER J, HORVATH EM, SCHATZMAYR G, ELLEND N, DANNER H, KRSKA R, BRAUN R (1997): Screening for deoxynivalenol-detoxifying anaerobic rumen microorganisms. Cereal Research Communication 25, 343–346. p.

24. BIRÓ G. (1999): Élelmiszer-higiénia. Budapest., (szerk.) Agroinform

25. BORRATHYBAY,E., GONG,F., NAZIERBIEKE,W., PENG,Z. (2011): Cloning and expression of a cyclohexanone monooxygenase gene from Rhodococcus ruber JDM312, Unpublished, Submitted (11-mar-2011) College of Biology and Environmental Sciences Jishou University

26. BOUDERGUE, C., BUREL, C., DRAGACCI, S., FAVROT, M-C., FREMY, J-M., MASSIMI, C., PRIGENT, P. ; DEBONGNIE, P., PUSSEMER, L.; BOUDRA, H., MORGAVI, D. ; OSWALD, I.; PEREZ, A.; AVANTAGGIATO, G. (2009): Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Scientific Report, EFSA, CFP/EFSA/FEEDAP/01, 192. p.

27. BRIGLIA M, RAINEY FA, STACKEBRANDT E, SCHRAA G, SALKINOJA-SALONEN M (1996): Rhodococcus percolatus sp. nov., a bacterium degrading 2, 4, 6-trichlorophenol, International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 23–30. p.

28. BURDITT, S.J., HAGLER, W.M. JR, AND HAMILTON, P.B. (1984): Feed refusal during ochratoxicosis in turkeys. Poultry Science, 63, 2172-2174. p.

29. BÚZA L. & MARTHNÉ SCHILL. J. (2010): A mikotoxinok vizsgálati módszerei, eredményei, előfordulásuk a hazai takarmányokban 13–19. p. In: Kovács M. (szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Agroinform Kiadó, Budapest, 156. p.

30. BÜCHMANN NB, HALD B. (1985): Analysis, occurrence and control of Ochratoxin A residues in Danish pig kidneys, Food Additives and Contaminants., Jul-Sep; 2 (3):193-9. p.

31. CAHILL,O., GILMARTIN,N., COFFEY,L., LIU,X., JENNINGS,L.,DOWLING,D.N., O'REILLY,C.,(2005): Rhodococcus erythropolis ITCBP - a novel PCB and nitrile metabolising bacterium, Unpublished

32. CHAO,W.L., LIN,C.M., SHIUNG,I.I., KUO,Y.L. (2006): Degradation of di-butyl-phthalate by soil bacteria, Chemosphere 63 (8) 1377-1383. p.

33. CHEN W-M, CHANG J-S, WU C-H, CHANG S-C (2004): Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium Ralstonia taiwanensis, Research in Microbiology, Volume 155, Issue 8, 672–680. p.

34. CHEN, W.-M., LAEVENS, S., LEE, T.-M., COENYE, T., DE VOS, P., MERGEAY, M. & VANDAMME, P. (2001): *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a *cystic fibrosis* patient. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 1729–1735. p.

35. CHEN, H., HU, J., YANG, J., WANG, Y., XU, H., JIANG, Q., GONG, Y., GU, Y., SONG, H. (2010): Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens. Aquatic Toxicology. 96, 53-61. p.

36. CHIEN,C.C., HONG,C.C., SOO,P.C., WEI,Y.H., CHEN,S.Y., CHENG,M.L. AND SUN,Y.M. (2010): Functional expression of phaCAB genes from *Cupriavidus taiwanensis* strain 184 in *Escherichia coli* for polyhydroxybutyrate production Applied Biochemistry Biotechnology 162 (8) 2355-2364. p.

37. CIEGLER, A., PETERSON, R. E., (1966): Aflatoxin Detoxification: Hydroxydihydro-Aflatoxin B1, Applied Microbiology, Apr. 196, 665-666. p.

38. CLARK, H.A., SNEDEKER, S.M. (2006): Ochratoxin A: its cancer risk and potential for exposure. Journal of Toxicolology and Environmental Health Part B: Critical Reviews, 9, 265-296. p.

39. COENYE T, FALSEN E, VANCANNEYT M, HOSTE B, GOVAN JR, KERSTERS K, VANDAMME P. (1999): Classification of Alcaligenes faecalis-like isolates from the environment and human clinical samples as Ralstonia gilardii sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 49, 405-413. p.

40. COENYE, T., VANDAMME, P. & LIPUMA, J. J. (2003).: *Ralstonia respiraculi* sp. nov., isolated from the respiratory tract of cystic fibrosis patients. International Journal Systematic Evolutionary Microbiology 53, 1339–1342. p.

41. CSEH S. & KOVÁCS M. (2010): Mikotoxinok reprodukcióra kifejtett hatásai 73–83. p. In: Kovács M. (szerk.): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Agroinform Kiadó: Budapest, 156. p.

42. CUADRADO V, GOMILA M, MERINI L, GIULIETTI AM, MOORE ER. (2010): *Cupriavidus pampae* sp. nov., a novel herbicide-degrading bacterium isolated from agricultural soil. International Journal of Systematic Evolution Microbiology, 60, 2606-2612. p,

43. CUI X, ZHOU J, QIU J, JOHNSON MR, MRUG M., (2009): Validation of endogenous internal real-time PCR controls in renal tissues. American Journal of Nephrology.;30 (5) 413-7. p.

44. DE MARCO P, PACHECO CC, FIGUEIREDO AR, MORADAS-FERREIRA P (2004): Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. FEMS Microbiology Letters 234, 75–80. p.

45. DENGER K, RUFF J, SCHLEHECK D, COOK AM (2004): *Rhodococcus opacus* expresses the xsc gene to utilize taurine as a carbon source or as a nitrogen source but not as a sulfur source. Microbiology 150, 1859–1867. p.

46. DE NIJS, M., ROMBOUTS, F. , NOTERMANS, S. (1996): *Fusarium molds and their mycotoxins.* Journal of Food Safety 16, 15-58. p.

47. DENIS-LAROSE C, LABBE´ D, BERGERON H, JONES AM, GREER CW, AL-HAWARI J, GROSSMAN MJ, SANKEY BM, LAU PC (1997): Conservation of plasmid-encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several rhodococci. Applied and Environmental Microbiology 63, 2915–2919. p.

48. DE SCHRIJVER, A., NAGY,I., SCHOOFS,G., PROOST,P., VANDERLEYDEN,J.,VAN PEE,K.H., DE MOT,R. (1997): Thiocarbamate herbicide-inducible nonheme haloperoxidase of Rhodococcus erythropolis NI86/21, Applied and Environmental Microbiology. 63 (5) 1911-1916. p.

49. DI GENNARO,P., TERRENI,P., MASI,G., BOTTI,S., DE FERRA,F. BESTETTI,G. (2010): Identification and characterization of genes involved in naphthalene degradation in Rhodococcus opacus R7 Applied Microbiology and Biotechnology. 87 (1) 297-308. p.

50. DOBOLYI CS., SEBÔK 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-termelô *aspergillus flavus* törzsek elôfordulása hazai kukorica szemtermésben, Növényvédelem 47 (4) p.

51. DUTTON, M.F. (1996): Fumonisins, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. Pharmacology and Therapeutics., 70, 137-161. p.

52. DUVICK, J., T. A. ROOD, J. R. MADDOX AND J.GILLIAM, (1998): Advances in ochratoxin A biosynthesis. Book of Abstracts , International Conference on “Advances on genomics , biodiversity and rapid systems for detection of toxigenic fungi and mycotooxins” September 26-29 , Italy .39.

53. EHLING, G., COCKBURN, A., SNOWDON, P., BUSCHHAUS, H. (1997): The significance of the Fusarium toxin deoxinivalenol (DON) for human and animal health. Proc. V. European Fusarium Seminar, Szeged

54. ELDRIDGE M.L., SANSEVERINO J., LAYTON A.C., EASTER J.P., SCHULTZ T.W., SAYLER G.S. (2007): *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS, a new bioluminescent bioreporter for detection of androgenic compounds. Applied and Environmental Microbiology, 73 (19) 6012-6018. p.

55. EL-NEZAMI H.S., POLYCHRONAKI N., SALMINEN S., MYKKLÄNEN H. (2002): Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food grade Lactobacillus strains with zearalenone and its derivatives α-zearalenol. Applied and Environmental Microbiology 68, 3545–3549. p.

56. EL-SHARKAWY, S.H. & ABUL-HAJJ, Y.J. (1988): Microbial transformation of zearalenone. 2. Reduction, Hydroxylation and Methylation Produts, Journal of Organic Chemistry 53, 515-519. p.

57. ERIKSEN, G.S., PETTERSSON H. (2004): Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. Animal Feed Science and Technology 114, 205–239. p.

58. ERIKSEN GS, ALEXANDER J (eds.), (1998): Fusarium toxins in cereals – a risk assessment. Nordic Council of Ministers; TemaNord: 502, 7-27 and 45-58; Copenhagen.

59. ESTRADA-DE LOS SANTOS P., MARTÍNEZ-AGUILAR L., LÓPEZ-LARA I.M. AND CABALLERO-MELLADO J. (2012): *Cupriavidus alkaliphilus* sp. nov., a new species associated with agricultural plants that grow in alkaline soils. Systcematic Applied Microbiology, 35, 310-314. p.

60. ETIENNE, M., DOURMAD, J. Y. (1994): Effects of zearalenon or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. Livestock Production Science, 40, 99–113. p.

61. FAHY A, MCGENITY T, TIMMIS K, BALL A (2006): Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. FEMS Microbiol Ecology 58, 260–270. p.

62. FAIRHURST, S. , MAXWELL, S. A. , SEAWIN, J. W. , SWANSTON, D. W. (1987): Skin effects of trichotecenes and their amelioration by decontamination. Toxicology 46, 307-319. p.

63. FARAGÓ, Á., MANCHOVICH, M., (1996): Orvosi biokémia. Semmelweis Kiadó.

64. FARZANEH M., SHI Z-Q., GHASSEMPOUR A., SEDAGHAT N., AHMADZADEH M., MIRABOLFATHY M., JAVAN-NIKKHAH M., (2012): Aflatoxin B1 degradation by Bacillus subtilis UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran Food Control 23, 100-106. p.

65. FAZEKAS, B., BAJMÓCY, S., GLÁVITS, R., FENYVESI, A. (1997):. Fumonizin mikotoxikózisok Magyarországon: lovak agylágyulása, sertések hízlalási tüdõvizenyõje. Magyar Állatorvosok Lapja. 119, 137-139. p.

66. FEINBERG, B. – MCLAUGHLIN, C. S. (1989): Biochemical mechanism of action of trichotecene mycotoxins. In: In: Beasley, V.R. (Ed.): *Trichotecene mycotoxicosis:* Pathophysiologic effects. CRC Press, Boca Raton, 27-35. p.

67. FERNANDEZ-ALBA, A.R., GUIL, M.D.H., LOPEZ, G.D., CHISTI, Y. (2002): Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. Analytica Chimica Acta 451, 195–202. p.

68. FERNANDEZ L., GARCIA E., NAVARRO J.M., PERERA J., DRZYZGAV O. 2009, Morphological, Physiological, and Molecular Characterization of a Newly Isolated Steroid-Degrading Actinomycete, Identified as Rhodococcus ruber Strain Chol-4, Current Microbiology 59, 548–553. p.

69. FISCHER J, KAPPELMEYER U, KASTNER M, SCHAUER F, HEIPIEPER HJ. (2010): The degradation of bisphenol A by the newly isolated bacterium *Cupriavidus basilensis* JF1 can be enhanced by biostimulation with phenol. International Biodeteriation and Biodegradation 64, 324-330. p.

70. FRASCARI D, PINELLI D, NOCENTINI M, FEDI S, PII Y, ZANNONI D (2006): Chloroform degradation by butane-grown cells of Rhodococcus aetherovorans BCP1. Applied Microbiology and Biotechnology 73, 421–428. p.

71. FREDRICKSON JK, ZACHARA JM, BALKWILL DL, KENNEDY D, LI SM, KOSTANDARITHES HM, DALY MJ, ROMINE MF, BROCKMAN FJ (2004): Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, washington state. Applied and Environmental Microbiology70, 4230–4241. p.

72. FRISVAD, J.C., FRANK, J.M., HOUBRAKEN, J.A.M.P., KUIJPERS, A.F.A., AND SAMSON, R.A. (2004): New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section Circumdati. Studies in Mycology, 50, 23-43. p.

73. FROEHNER, K., BACKHAUS, T. & GRIMME, L.H. (2000): Bioassasys with Vibrio fischeri for the assessment of delayed toxicity. Chemosphere, 40 (8) 821-828. p.

74. FUTAMATA H, UCHIDA T, YOSHIDA N, YONEMITSU Y, HIRAISHI A (2004): Distribution of dibenzofurandegrading bacteria in soils polluted with different levels of polychlorinated dioxins. Microbes and Environments 19, 172–177. p.

75. GAJA M, KNAPP J (1997): The microbial degradation of benzothiazoles. Journal of Applied Microbiology 83, 327–334. p.

76. GALTIER, P., ALVINERIE, M. AND CHARPENTEAU, J.L. (1981): The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. Food and Cosmetics Toxicology, 19, 735-738. p.

77. GELDERBLOM, W.C.A., JASKIEWICZ. K., MARASAS. W.F.O. AND THIEL. P.G. HORAK, R.M., VLEGGAAR. R. AND KRIEK, N.P.J. (1988): Fumonisins - novel mycotoxins with cancerpromoting activity produced by Fusarium moniliforme. Applied and Environmental Microbiology. 54, 1806-1811. p.

78. GELDERBLOM W.C.A., KRIEK, N.P.J., MARASAS. W.F.O. AND THIEL P.G. (1991): Toxicity and carcinogenecity of the Fusarium moniliforme metabolite, fumonisin B_1, in rats. Carcinogenesis. 12, 1247-1251. p.

79. GELDERBLOM, W.C.A., SEMPLE. F., MARASAS. W.F.O., FARBER. E. (1992): The cancer initiating potencial of fumonisin B mycotoxins. Carcinogenesis, 13, 433-437. p.

80. GHOSH,A., KHURANA,M., CHAUHAN,A., TAKEO,M., CHAKRABORTI,A.K. AND JAIN,R.K. (2010): Degradation of 4-nitrophenol, 2-chloro-4-nitrophenol, and 2,4-dinitrophenol by *Rhodococcus imtechensis* strain RKJ300 Environmental Science and Technology. 44 (3), 1069-1077. p.

81. GHOSH A., PAUL D., PRAKASH D., MAYILRAJ S. AND JAIN R.K.: *Rhodococcus imtechensis* sp. nov., a nitrophenol-degrading actinomycete. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology., 56, 1965-1969. p.

82. GOETHALS, K., VEREECKE, D., JAZIRI, M., VAN, M. AND HOLSTERS, M. **(**2001): Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians.* Annual Review of Phytopathology. 39**,** 27-52. p.

83. GOODFELLOW M, ALDERSON G (1977): The *actinomycete*-genus *Rhodococcus*: a home for the 'rhodochrous' complex. Journal of General Microbiology 100, 99–122. p.

84. GOODFELLOW M, ALDERSON G (1979): Validation of new names and combinations previously effectively published outside IJSB. List No. 2. International Journal of Systematic Bacteriology 29:79–80. p.

85. GOODFELLOW, M., ALDERSON, G., CHUN, J.**(**1998**):** Rhodococcal systematics: problems and developments, Antonie van Leeuwenhoek, 74, 1–12.

86. GOODFELLOW M, CHUN J, STACKEBRANDT E, KROPPENSTEDT RM (2002): Transfer of *Tsukamurella wratislaviensis* Goodfellow et a. 1995 to the genus *Rhodococcus* as *Rhodococcus wratislaviensis* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 749–755. p.

87. GOODFELLOW M., JONES, A. L., MALDONADO L. A., SALANITRO J., (2004): *Rhodococcus aetherivorans* sp. nov., A New Species that Contains Methyl t-butyl Ether-Degrading Actinomycetes Systematic and Applied Microbiology Volume 27, Issue 1., 61-65. p.

88. GOODFELLOW M, WEAVER CR, MINNIKIN DE (1982): Numerical classification of some rhodococci, corynebacteria and related organisms. Journal of General Microbiology 128, 731–745. p.

89. GOODFELLOW M (1984): Reclassification of Corynebacterium fascians (Tilford) Downson in the genus Rhodococcus as Rhodococcus fascians comb. nov. Systematic and Applied Microbiology 5, 225–229. p.

90. GORIS J, ET AL. (2001): Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotipes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51, 1773-1782. p.

91. GRAY, L. E., JR. (1998). Xenoendocrine disrupters: Laboratory studies on male reproductive effects. Toxicology Letters 102-103, 331–335. p.

92. GRAY, L. E., JR., KELCE, W. R., WIESE, T., TYL, R., GAIDO, K., COOK, J., KLINEFELTER, G., DESAULNIERS, D., WILSON, E., ZACHAREWSKI, T., (1997). Endocrine Screening Methods Workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. Reproductive Toxicology 11, 719–750. p.

93. GRAY, L. E., JR., OSTBY, J., FERRELL, J., REHNBERG, G., LINDER, R., COOPER, R., GOLDMAN, J., SLOTT, V., AND LASKEY, J. (1989): A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development

94. GRAY, L. E., JR., OSTBY, J., SIGMON, R., FERRELL, J., REHNBERG, G., LINDER, R., COOPER, R., GOLDMAN, J., AND LASKEY, J. (1988): The development of a protocol to assess reproductive effects of toxicants in the rat. Reproductive Toxicology 2, 281–287. p.

95. GRAY, L. E., JR., AND OSTBY, J. S. (1995): In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. Toxicology and Applied Pharmacology 133, 285–294. p.

96. GRAY, L. E., OSTBY, J. S., AND KELCE, W. R. (1997). A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. Toxicology and Applied Pharmacology. 146, 11–20. p.

97. GRAY, L. E., WOLF, C., MANN, P., AND OSTBY, J. S. (1997). In utero exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. Toxicology and Applied Pharmacology. 146, 237–244. p.

98. GRENNI, P., GIBELLO, A., CARACCIOLO A-B., FAJARDO C., NANDE M., VARGAS R., SACCA, M-L., MARTINEZ-IÑIGO M.J., CICCOLI R., MARTIN M., (2009): A new fluorescent oligonucleotide probe for *in situ* detection of *s*-triazine-degrading *Rhodococcus wratislaviensis* in contaminated groundwater and soil samples Water Research Volume 43, Issue 12, 2999–3008. p.

99. GROENING,J.A.D., EULBERG,D., BENNDORF,D., KASCHABEK,S.R.,ARCHER,J.A.C. AND SCHLOEMANN,M. (2008): Identification and expression analysis of three two-component

(chloro)phenol hydroxylases in Rhodococcus opacus 1CP Unpublished (bases 1 to 8053) Groening,J.A.D. Direct Submission Submitted (24-NOV-2008) to the INSDC. Groening J.A.D.,Environmental Microbiology, TU Bergakademie Freiberg, Leipziger Str. 29, Freiberg, 09599.

100. GROMADZKA, K., WASKIEWICZ, A., CHELKOWSKI, J. & GOLINSKI, P. (2008): Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. World Mycotoxin Journal, 1(2) 209-220. p.

101. GRUIZ K., HORVÁTH B. & MOLNÁR M. (2001): Környezettoxikológia. Műegyetem Kiadó, 171. p.

102. GUERRE, P., EECKHOUTTE, C. , BURGAT, V. , GALTIER, P. (2000): The effects of T-2 toxin exposure on liver drug metabolising enzymes in rabbit. Food Additives and Contaminants. 12, 1019-1026. p.

103. GUPTA, R. K., PATTERSON, S. S., RIPP, S., SIMPSON, M. L. & SAYLER, G. S. (2003): Expression of the Photorhabdus luminescens lux genes (luxA, B, C, D, and E) in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 4 (3) 305-313. p.

104. HAMMER, R., HARPER, D.A.T., & RYAN, P.D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaentologia Electronica, 4 (1) 9. p.

105. HARRISON. L.R., COLVIN, B.M., GREENE. J.T., NEWMAN, L.E. AND COLE, J.R. (1990): Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin-B_1, a toxic metabolite of Fusarium moniliforme. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2, 217-221. p.

106. HEALD SC, BRANDA PFB, HARDICRE R, BULL AT (2001): Physiology, biochemistry and taxonomy of deep-sea nitrile metabolising Rhodococcus strains. Antonie Van Leeuwenhoek 80, 169–183. p.

107. HEINL S., HARTINGER D., THAMHESL M., VEKIRU E., RUDOLF KRSKA R., SCHATZMAYR G., MOLL W-D., GRABHERR R. (2010): Degradation of fumonisin B1 by the consecutive action of two bacterial enzymes, Journal of Biotechnology, Volume 145, Issue *2*, 120-129. p.

108. HELMKE E, WEYLAND H (1984): *Rhodococcus marinonascens* sp. nov. An actinomycete from the sea. International Journal of Systematic Bacteriology34, 127–138. p.

109. HENDRICKX B, JUNCA H, VOSAHLOVA J.,(2006): Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. Journal of Microbiology Methods 64, 250–265. p.

110. HENEWEER, M., HOUTMAN, R., POORTMAN, J., GROOT, M., MALIEPAARD, C., PEIJNENBURG, A. (2007): Estrogenic effects in the immature rat uterus after dietary exposure to ethinylestradiol and zearalenone using systems biology approach. Toxicology Science. 99, 303-14. p.

111. HERSHBERGER, L. G., SHIPLEY, E. G., AND MEYER, R. K. (1953): Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 175–180. p.

112. HICKEY, P.W.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; RINALDI, M.G.; WICKES, B.L.; SCHMIDT, H.J.; WALSH, T.J., (2009): *Trichosporon mycotoxinivorans*: A novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. Journal of Clinical Microbiology. 47, 3091–3097. p.

113. HOFSTETTER, U., SCHATZMAYR, D., BINDER, E. M. (2005): Biotransformation –A succesful way to deactivate T-2 toxin in growing broiler chicken. Proc.15th Eur. Symp. Poultry Nutrition, Balatonfüred, 618-620. p.

114. HOLDER JW, ULRICH JC, DEBONO AC, GODFREY PA, DESJARDINS CA, ET AL. (2011): Comparative and Functional Genomics of *Rhodococcus opacus* PD630 for Biofuels Development. PLoS Genet 7(9): e1002219. doi:10.1371/journal.pgen.1002219

115. HOLLADAY, S. D., SMITH, B. J., LUSTER, M. I. (1995): B-lymphocyte precursor cells represent sensitive tartgets of T2 mycotoxin exposure. Toxicology and Applied Pharmacology. 131, 309-315. p.

116. HORMISCH, D., BROST, I., KOHRING, G.-W., GIFFHORN, F., KRIPPENSTEDT, R.M., STACKEBRANDT, E., FARBER, P. & HOLTZAPFEL, W.H. (2004): *Mycobacterium fluoranthenivorans sp. nov.*, a fluoranthene and aflatoxin-B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant, Systematic and Applied Microbiology 27, 553–660. p.

117. HWANG, C.A., AND DRAUGHON, F.A. (1994):Degradation of ochratoxin A by Acinetobacter calcoaceticus. Journal of Food Protection, 57, 410-414. p.

118. IIDA T, MUKOUZAKA Y, NAKAMURA K, YAMAGUCHI I, KUDO T (2002): Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading actinomycetes: analysis of multiple extradiol dioxygenase genes in dibenzofuran-degrading Rhodococcus species. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 66, 1462–1472. p.

119. IKUNAGA Y, SATO I, GROND S, NUMAZIRI N, YOSHIDA S, YAMAYA H, HIRADATE S, HASEGAWA M, TOSHIMA H, KOITABASHI M, ITO M, KARLOVSKY P, TSUSHIMA S (2011): Nocardioides sp. strain WSN05-2, isolated from a wheat field, degrades deoxynivalenol, producing the novel intermediate 3-epi-deoxynivalenol. Applied Microbiology and Biotechnology 89, 419–427. p.

120. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (1993): Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic amines and mycotoxins. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Lyon, France, 56. p.

121. IPCC (2007): Intergovernmental panel on climate change report. Climate Change: Synthesis Report, 52. p.

122. IWAKI H, NAKAI E, NAKAMURA S, HASEGAWA Y (2008): Isolation and characterization of new cyclohexylacetic acid-degrading bacteria. Current Microbiology 57, 107–110. p.

123. JANG J, KIM D, BAE H, CHOI K, CHAE J, ZYLSTRA G, KIM Y, KIM E (2005): Isolation and characterization of a Rhodococcus species strain able to grow on ortho-and para-xylene. Journal of Microbiology 43, 325. p.

124. JANSSEN PJ., VAN HOUDT R., MOORS H., MONSIEURS P., MORIN N., MICHAUX A., BENOTMANE M. A., LEYS N., VALLAEYS T., LAPIDUS A., MONCHY S., MÉDIGUE C., TAGHAVI S., MCCORKLE S., DUNN J., VAN DER LELIE D., MERGEAY M., (2010): The Complete Genome Sequence of *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34, a Master Survivalist in Harsh and Anthropogenic Environments. PLoS ONE 5(5): e10433. doi:10.1371/journal.pone.0010433

125. JARLIER, V. & NIKAIDO, H. **(**1994**).** Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiology Letters 123, 11–18. p.

126. JIN DC, LIANG RX, DAI QY, ZHANG RY, WU XL, CHAO WL. (2010): Biodegradation of di-n-butyl phthalate by Rhodococcus sp. JDC-11 and molecular detection of 3, 4-phthalate dioxygenase gene. Journal of Microbiology and Biotechnology 1440-5. p.

127. JOFFE, B. I. NOVIS, B. SEFTEL, H. C. KRUT, L. BANK, S. (1971): IschÆmic heart-disease and pancreatic diabetes. Lancet 298, 269. p.

128. JONES AL, BROWN JM, MISHRA V, PERRY JD, STEIGERWALT AG, GOODFELLOW M (2004): Rhodococcus gordoniae sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol-contaminated soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 407–411. p.

129. JUNG, I. G., PARK, C. H. (2004): Characteristics of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, m-xylene (BTX), and their mixtures. Journal of Bioscience and Bioengeneering 97, 429-31. p.

130. JUNG, I. G., PARK C. H. (2005): Characteristics of styrene degradation by *Rhodococcus pyridinovorans* isolated from a biofilter. Chemosphere. 61, 451-6. p.

131. KAGEYAMA C;OHTA T;HIRAOKA K;SUZUKI M;OKAMOTO T;OHISHI K; (2005) Chlorinated aliphatic hydrocarbon-induced degradation of trichloroethylene in *Wautersia numadzuensis* sp. nov. Archives of Microbiology. 183, 56-65. p.

132. KAMIMURA H (1986): Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by *Rhizopus sp*. Applied and Environmental Microbiology, 52, 515–519. p.

133. KÄMPFER P., WELLNER S., LOHSE K., LODDERS N. AND MARTIN K (2013): *Rhodococcus cerastii* sp. nov. and *Rhodococcus trifolii* sp. nov., two novel species isolated from leaf surfaces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 1024-1029. p.

134. KARAFIN M., ROMAGNOLI M., FINK D.L., HOWARD T., RAU R., MILSTONE A.M., CARROLL K.C., (2010): Fatal Infection Caused by *Cupriavidus gilardii* in a Child with Aplastic Anemia, doi: 10.1128/JCM.01482-09 Journal of Clinical Microbiology March vol. 48 no. 3, 1005-1007. p.

135. KIDD, M. T. , HAGLER, JR., W. M., QURESHI, M. A. (1995): *Trichotecene mycotoxins* depress the mononuclear-phagocytic system of young turkeys. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 17, 385-398. p.

136. KIM, J. M., LE, N. T., CHUNG, B. S., PARK, J. H., B, J-W., MADSEN, E. L., JEON, C. O. (2008): Influence of Soil Components on the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-Xylenes by the Newly Isolated Bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. Applied and Environmental Microbiology, 74(23), 7313-7320. p.

137. KIM MK, SINGLETON I, GOODFELLOW M, LEE ST. (2006): Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. Journal of Applied Microbiology. Feb;100(2), 325-33. p.

138. KIM YH, KANG U, KONISHI K, LEE C (2006): Rhodococcus sp. strainTM1 plays a synergistic role in the degradation of piperidine by Mycobacterium sp. strain THO100. Archives of Microbiology 186, 183–193. p.

139. KIM Y, ENGESSER K, KIM S (2007): Physiological, numerical and molecular characterization of alkyl ether-utilizing rhodococci. Environmental Microbiology 9, 1497–1510. p.

140. KITAGAWA,W., KIMURA,N., KAMAGATA,Y. (2004): A novel p-nitrophenol degradation gene cluster from a gram-positive bacterium, Rhodococcus opacus SAO101, Journal of Bacteriology 186 (15), 4894-4902. p.

141. KLATTE S, JAHNKE K, KROPPENSTEDT R, RAINEY F, STACKEBRANDT E (1994): *Rhodococcus luteus* is a later subjective synonym of Rhodococcus fascians. International Journal of Systematic Bacteriology 44, 627–630. p.

142. KOHYAMA E, YOSHIMURA A, AOSHIMA D, YOSHIDA T, KAWAMOTO H, NAGASAWA T. (2006): Convenient treatment of acetonitrile-containing wastes using the tandem combination of nitrile hydratase and amidase-producing microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology Sep;72(3):600-6. Epub 2006 Jan 10.

143. KOOPMAN F, WIERCKX N, DE WINDE JH, RUIJSSENAARS HJ. (2010): Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. Proceedings of the National Academy of Science U. S. A. 107, 4919-4924. p.

144. KOVÁCS F. (2001): Penészgombák–mikotoxinok 13-20. p. In: Kovács F. (szerk) Penészgombák, mikotoxinok a táplálékláncban. MTA Agrártudományos Osztálya, Budapest, 212. p.

145. KOVÁCS, F., SÁNDOR, G., VÁNYI, A., DOMÁNY, S., ZOMBORSZKY-KOVÁCS, M. (1995): Detection of ochratoxin A in human blood and colostrum. Acta Veterinaria Hungarica, 43, 393-400. p.

146. KOVÁCS, M., (2004): Mikotoxinok táplálkozás-egészségügyi vonatkozásai. Orvosi Hetilap 145. évf. 34. szám 1739-1746. p.

147. KRIFATON CS., KRISZT, B., SZOBOSZLAY, S., CSERHÁTI, M., SZŰCS, A., KUKOLYA, J. (2011): Analysis of aflatoxin-B1-degrading microbes by use of a combined toxicity-profiling method. Mutation Research 726, 1-7. p.

148. KRIFATON, CS., KRISZT, B., RISA, A., SZOBOSZLAY, S., CSERHÁTI, M., HARKAI, P., ELDRIGE, M., WANG, J., KUKOLYA, J., 2012. Application of a yeast estrogen reporter system for screening zearalenone degrading microbes. Journal of Hazardous Materials 244–245, 429–435. p.

149. KRIFATON CS, KUKOLYA J, SZOBOSZLAY S, CSERHÁTI M, SZŰCS Á, KRISZT B (2010): Adaptation of bacterial biotests for monitoring mycotoxins. WIT Transactions on Ecology and the Environment: Environmental Toxicology III. 132, 143-154. p.

150. KRISTÓF J. (szerk.) (2000): Kémiai analízis II. (Nagyműszeres analízis). Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém, 192 p.

151. KRUSE W., (1896): Systematik der Streptothrickeen und Bakterien. In: Flugge C (ed) Die Mikroorganismen, vol 2. FCW Vogel, Liepzig, 48–66. p,

152. KRUTSAY M., (1980): Szövettani technika, Medicina Kiadó, Bp. 61. p.

153. KUNDU D, HAZRA C, DANDI N., CHAUDHARI A., (2013): Biodegradation of 4-nitrotoluene with biosurfactant production by Rhodococcus pyridinivorans NT2: metabolic pathway, cell surface properties and toxicological characterization. Biodegradation.

154. KUNIHIRO N, HARUKI M, TAKANO K, MORIKAWA M, KANAYA S (2005): Isolation and characterization of Rhodococcus sp. strains TMP2 and T12 that degrade 2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane (pristane) at moderately low temperatures. Journal of Biotechnology 115, 129–136. p.

155. LACZAY, P. (2004): Állati eredetű élelmiszereink kémiai-toxikológiai biztonsága 3. Biológiai eredetű szennyező anyagok. Magyar Állatorvosok Lapja 126, 371-380. p.

156. LANGEVIN S., VINCELETTE J., BEKAL S., GAUDREAU C., (2011): First Case of Invasive Human Infection Caused by Cupriavidus metallidurans, Published ahead of print 24 November, doi: 10.1128/JCM.01947-10 Journal of Clinical Microbiology February vol. 49 no. 2 744-745. p.

157. LARKIN, M.J., ALLEN, C.C.R. AND KULAKOV, L.A. (2006): Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus* - biochemistry, physiology and genetic adaptation. Advances in Applied Microbiology, vol 59.

158. LARKIN, M.J., DE MOT, R., KULAKOV, L.A. AND NAGY, I. (1998): Applied aspects of *Rhodococcus* genetics. Antonie van Leeuwenhoek, 74, 133-153. p. (Review)

159. LARKIN, M.J., KULAKOV, L.A. AND ALLEN, C.C.R. (2005): Biodegradation and *Rhodococcus* - masters of catabolic versatility. Current Opinion in Biotechnology, 16(3), 282 - 290. p.

160. LEE M, KIM M, SINGLETON I, GOODFELLOW M, LEE S (2006): Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. Journal of Applied Microbiology 100, 325–333. p.

161. LEGAULT, R., BLAISE, C., ROKOSH D. & CHONG-KIT R. (1994): Comparative Assessment of the SOS Chromotest Kit and the Mutatox Test with the *Salmonella* plate Incorporation (Ames Test) and Fluctuation Test for Screening Genotoxic Agents, Envinronmental Toxicology and Water Quality, 9 (1) 45–57. p.

162. LETEK M., GONZÁLEZ P., MACARTHUR I., RODRÍGUEZ H., FREEMAN T. C., VALERO- RELLO A., BLANCO M., BUCKLEY T., CHEREVACH I., FAHEY R., HAPESHI A., HOLDSTOCK J., LEADON D., NAVAS J., OCAMPO A., QUAIL M. A., SANDERS M., SCORTTI M. M., PRESCOTT J. F., FOGARTY U., MEIJER W. G., PARKHILL J., BENTLEY S.D., VÁZQUEZ-BOLAND J.A., (2010): The Genome of a Pathogenic *Rhodococcus*: Cooptive Virulence Underpinned by Key Gene Acquisitions, PLoS Genet, September; 6(9): e1001145., Published online September 30. doi: 10.1371/journal.pgen.1001145

163. LETEK M, OCAMPO-SOSA AA, SANDERS M, FOGARTY U, BUCKLEY T, LEADON DP, GONZALEZ P, SCORTTI M, MEIJER WG, PARKHILL J, BENTLEY S, VAZQUEZ-BOLAND JA (2008): Evolution of the *Rhodococcus equi* vap pathogenicity island seen through comparison of host-associated vapA and vapB virulence plasmids. Journal of Bacteriology 190, 5797–5805. p.

164. LI B., FURIHATA K., DING L.X. AND YOKOTA A. (2007): *Rhodococcus kyotonensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57, 1956-1959. p.

165. LI Y, KAWAMURA Y, FUJIWARA N, NAKA T, LIU H, HUANG X, KOBAYASHI K, EZAKI T (2004): *Rothia aeria* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter russicus* sp. nov., isolated from air in the Russian space laboratory Mir. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 827–835. p.

166. LI J., ZHAO G.Z., LONG L.J., WANG F.Z., TIAN X.P., ZHANG S. AND LI W.J. (2012): *Rhodococcus nanhaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from marine sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62, 2517-2521. p.

167. LIOI, M. B., SANTORO, A., BARBIERI, R., SALZANO, S. & URSINI, M. V. (2004): Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell deaths induced in bovine lymphocytes. Mutation Research, 557 (1) 19-27. p.

168. LUHE A, HILDEBRAND H, BACH U, DINGERMANN T, AHR HJ. (2003): A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays. Toxicology Science.73(2), 315-28. p.

169. LYKIDIS A., PÉREZ-PANTOJA D., LEDGER T, MAVROMATIS K, ANDERSON I.J., IVANOVA N.N, D. HOOPER S.D., LAPIDUS A., LUCAS S., GONZÁLEZ B., KYRPIDES N.C., (2010): The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a versatile pollutant degrader. PLoS ONE 5: e9729.

170. MAAROUFI, K., CHEKIR, L., CREPPY, E. E., ELLOUZ, F. & BACHA, H. (1996): Zearalenone induces modifications in haematological and biochemical parameters in rats. Toxicon, 34, 534-540. p.

171. MACDONALD'S, CASTLE L, (1996): A UK retail survey of aflatoxin in herbs and spices and their fate during cooking. Food Additives and Contaminants 13 (1) 121-128. p.

172. MAKKAR N.S. AND CASIDA JR. L.E.(1987): *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. International Journal Sysematic Bacteriology, 37, 323-326. p.

173. MAMBER, S. W., OKASINSKI, W.G., PINTER C.D., & TUNAC, J.B.. (1986): The *Escherichia coli* K-12 SOS Chromotest agar spot test for simple, rapid detection of genotoxic agents. Mutation Research, 171, 83–90. p.

174. MANN, R. & REHM, H.J. (1977): Degradation of aflatoxin-B1 by various microorganisms. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung, 163 (1) 39–43. p.

175. MARAGOS, C.M. (1997): Measurement of mycotoxins in food with a fiber-optic immunosensor. Journal of Clinical Lig. Assay. 20, 136–140. p.

176. MARASAS, W.F.O. (1995): Fumonisins: their implications for human and animal health Natural Toxins, 3 197-198. p.

177. MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A. (1992): A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. Journal of Animal Science, 70, 3968-3988. p.

178. MARTINKOVA, L., UHNAKOVA, B., PATEK, M., NESVERA, J. & KREN, V. (2009): Biodegradation potential of the genus Rhodococcus. Environment International 35, 162–177. p.

179. MARUYAMA T, ISHIKURA M, TAKI H, SHINDO K, KASAI H, HAGA M, INOMATA Y, MISAWA N. (2005): Isolation and characterization of o-xylene oxygenase genes from *Rhodococcus opacus* TKN14. Applied and Environmental Microbiology. 71(12) 7705-15. p.

180. MATSUMURA E, OOI S, MURAKAMI S, TAKENAKA S, AOKI K (2004): Constitutive synthesis, purification, and characterization of catechol 1, 2-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium Rhodococcus sp. AN-22. Journal of Bioscience and Bioengeneering 98, 71–76. p.

181. MATSUYAMA H, YUMOTO I, KUDO T, SHIDA O (2003): *Rhodococcus tukisamuensis* sp. nov., isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 1333–1337. p.

182. MÁTRAI T., RAFAI P. & SZIGETI G (2003): A takarmányok penészgombás fertőzöttségének állat-egészségügyi jelentősége 208–229. p. In: Rafai P. (szerk.): Állathigiénia. Agroinform Kiadó, Budapest, 343. p.

183. MAURICE, O. M. (1983): Mycotoxins. Mycological Research. 100, 513-523. p.

184. MAYILRAJ S, KRISHNAMURTHI S, SAHA P, SAINI HS (2006): *Rhodococcus kroppenstedtii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a cold desert of the Himalayas, India. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 979–982. p.

185. MCLEOD, M. P., ET AL. (2006): The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. Proceedings of the National Academy of Science U. S. A. 103**,** 15582–15587. p.

186. MEGHARAJ, M., GARTHWAITE, I., THIELE, J.H. (1997): Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture, Letters in Applied Microbiology, 24 (5), 329–333. p.

187. MÉZES M. (1997): Takarmányártalmak, takarmánytoxikológia, (Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Takarmányozási Tanszék) Gödöllő, 60. p.

188. MÉZES M. (2009): Mikotoxikózisok. In: Mézes M. (szerk.) Takarmánytoxikológia. Egyetemi Jegyzet, Gödöllő, 99. p.

189. MÉZES M., BALOGH K., & TÓTH K. (2010): A takarmány alapanyagok mikotoxin tartalmának és a mikotoxin szennyezettség által előidézett toxikus hatások mérséklésére alkalmas megelőző módszerek. In: Kovács M. (szerk.): Aktualitások a mikotoxin kutatásban. Agroinform Kiadó Budapest 141–147. p.

190. MÉZES, M., BARTA, M., NAGY, G. (1998): Comparative investigation ont he effect ot T-2 mycotoxin on lipid peroxidation and antioxidatn status of different poultry species. Research in Veterinary Science 66, 19-23. p.

191. MILLER, J.D. (1995): Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. Journal of Stored Product Research, 31, 1-16. p.

192. MOLNÁR O., SCHATZMAYR, G., FUCHS, E., PRILLINGER, H. (2004): *Trichosporon mycotoxinivorans sp. nov*., A New Yeast Species Useful in Biological Detoxification of Various Mycotoxins. Systematic and Applied Microbiology, 27 (6) 661-671. p.

193. MORII,S., SAWAMOTO,S., YAMAUCHI,Y., MIYAMOTO,M., IWAMI,M., ITAGAKI,E. (1999): Steroid monooxygenase of Rhodococcus rhodochrous: sequencing of the genomic DNA, and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme, Journal of Biochemistry 126 (3) 624-631. p.

194. MORIMOTO,S., TOGAMI,K., OGAWA,N., HASEBE,A. AND FUJII,T. (2005): Analysis of a bacterial community in 3-chlorobenzoate-contaminated soil by PCR-DGGE that targets 16S rDNA and the benzoate 1,2-dioxygenase gene (benA), Microbes Environment 20, 151-159. p.

195. MORTENSEN GK, STROBEL BW, HANSEN HCB, (2006): DEGRADATIon of zearalenone and ochratoxin A in three Danish agricultural soils. Chemosphere;62, 1673–80. p.

196. MOSS, M.O. (1996): Mode of formation of ochratoxin a. Food additives and contaminants, 13 (suppl.): 5-9. P.

197. NALLII S, COOPER DG, NICELL JA. (2002): Biodegradation of plasticizers by Rhodococcus rhodochrous. Biodegradation. 2002;13(5) 343-52. p.

198. NIMAICHAND S., SANASAM S., ZHENG L.Q., ZHU W.Y., YANG L.L., TANG S.K., NINGTHOUJAM D.S. AND LI W.J.(2013): *Rhodococcus canchipurensis* sp. nov., an actinomycete isolated from a limestone deposit site. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 114-118. p.

199. NIYO, K. A., RICHARD, J. L., NIYO, Y., TIFFANY, L. H. (1988): Effects of T-2 mycotoxin ingestion on phagocytosis of Aspergillus fumogatus conidia by rabbit alveolar macrophages and on hematologic, serum biochemical, and pathologic changes in rabbits. American Journal of Veterinary Research. 49, 1766-1773. p.

200. NORRED. W. P, VOSS. K.A. (1994): Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. Journal of Food Protection 57, 522-527. p.

201. NOUMURA T, HABE H, WIDADA J, CHUNG JS, YOSHIDA T, NOJIRI H, OMORI T (2004): Genetic characterization of the dibenzofuran-degrading Actinobacteria carrying the dbfA1A2 gene homologues isolated from activated sludge. FEMS Microbiology Letters 239, 147–155. p.

202. OECD. (2007 A). Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

203. OECD (2007 B). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

204. OGAWA,N. AND MIYASHITA,K. (1999): The chlorocatechol-catabolic transposon Tn5707 of Alcaligenes eutrophus NH9, carrying a gene cluster highly homologous to that in the 1,2,4-trichlorobenzene-degrading bacterium Pseudomonas sp. strain P51, confers the ability to grow on 3-chlorobenzoate Applied and Environmental Microbiology65 (2) 724-731. p.

205. OLSEN, R. H., ARBOR, A. (1985): *Pseudomonas* degradation of hydrocarbons. United States Patent, 4508824, 1-6. p.

206. PASCALE, M., HAIDUKOWSKI, M., VISCONTI, A. (2003). Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1 anthroylnitrile, Journal of Chromatography A, Vol. 989, No. 2, 257-264, ISSN 0021-9673. p.

207. PATEK, M., PAVLIK,A., KRACIK,M., NESVERA,J. (2012): Rhodococcus erythropolis CCM2595 aldoxime dehydratase, amidase and nitrile hydratase gene cluster (oxd, nhr2, nhr1, ami, nha1, nha2,nhr3)Unpublished, Submitted (11-nov-2011) Institute of Microbiology CAS

208. PATERSON, R. R. M., & LIMA, N. (2010): How will climate change affect mycotoxins in food? Food Research International, 43(7) 1902–1914. p.

209. PATERSON, R.R.M., LIMA, N. (2011): Further mycotoxin effects from climate change, Food Research International, 44, 2555–2566. p.

210. PEARSON K. (1896): Mathematical Contributions to the Theory of Evolution. III. Regression, Heredity and Panmixia, Philosophical Transactions of the Royal Society A., 187, 253-318. p.

211. PEINADO, M.T., MARISCAL, A., CARNERO-VARO, M. FERNANDEZ-CREHUET, J. (2002): Correlation of two bioluminescence and one fluorogenic bioassay for the detection of toxic chemicals. Ecotoxicology and Environmental Safety 53, 170–177. p.

212. PÉREZ-PANTOJA D, DE LA IGLESIA R, PIEPER DH, GONZÁLEZ B. (2008): Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP 134. FEMS Microbiology Review. 32, 736-794. p.

213. PESTKA, J. J. , TAI, J. H. , WITT, M. F. , DIXON, D. E. , FORSELL, J. H. (1987): Supression of immune response int he B6C3F1 mouse after dietary exposure to the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenon. Food and Chemical Toxicology. 25, 297-304. p.

214. PETRUSMA M., HESSELS G., DIJKHUIZEN L., VAN DER GEIZE R., (2011) Multiplicity of 3-Ketosteroid-9a -Hydroxylase Enzymes in Rhodococcus rhodochrous DSM43269 for Specific Degradation of Different Classes of Steroids, Journal of Bacteriology., 193(15), 3931. p.

215. PIOTROWSKA M, ZAKOWSKA Z. (2005): The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. Polish Journal of Microbiology 54(4), 279-86. p.

216. PLACINTA, C. M. , MELLO, J. P. F. , MACDONALD, A. M. C. (1999): A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. Animal Feed Science Technology 78, 21-37. p.

217. PLASENCIA, J. AND MIROCHA, C.J. (1991): Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium spp*. Applied and Environmental Microbiology 57, 146-150. p.

218. POEHLEIN A, KUSIAN B, FRIEDRICH B, DANIEL R, BOWIEN B. (2011): Complete genome sequence of the type strain *Cupriavidus necator* N-1. Journal of Bacteriology. 193, 5017. p.

219. POHLMANN, A., FRICKE, W. F., REINECKE, F., KUSIAN, B., LIESEGANG, H., CRAMM, R., EITINGER, T., EWERING, C., PÖTTER, M. (2006): Hydrogen-based biotechnology: genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. National Biotechnology 24, 1257–1262. p.

220. QI Y, ZHAO L, OLUSHEYI OZ, TAN X (2007) Isolation and preliminary characterization of a 3-chlorobenzoate degrading bacteria. Journal of Environment Science (China) 19 (3), 332–337. p.

221. QUATRINI P, SCAGLIONE G, DE PASQUALE C, RIELA S, PUGLIA AM (2008) Isolation of gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. Journal of Applied Microbiology 104, 251–259. p.

222. QUILLARDET, P., HOFNUNG, M., (1985): The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures, Mutation Research, 147, 65-78. p.

223. QUILLARDET, P., HUISMAN, O., D'ARI, R. & HUFNUNG M. (1982): SOS Chromotest, a direct assay of induction of SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. National Academy of Sciences 79, 5971-5975. p.

224. RAFAI P. (2003): Állathigiénia, Agroinform Kiadó, Budapest, 343. p.

225. RAPER, K.B. AND FENNELL, D.I. (1965) The genus Aspergillus. Williams and Wilkins Company, Baltimore.

226. REFAI, M.K., AZIZ, N.H., EI-FAR, F. & HASSAN, A.A. (1996): Detection of ochratoxin produced by Aspergillus ochraceus in feedstuffs and its control by Y radiation. Applied Radiation and Isotopes, 47 (7) 617-621. p.

227. REHFUSS M, URBAN J (2005): *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. Systematic and Applied Microbiology 28, 695–701. p.

228. REPETTO, G., JOS, A., HAZEN, M.J., MOLERO, M.L., DEL PESO, A., SALGUERO, M., DEL CASTILLO, P., RODRIGUEZ-VICENTE, M.C. AND REPETTO, M. (2001): A test battery for ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. Toxicology in Vitro 15, 503–509. p.

229. RIBO, J.M. & KAISER, K.L.E. (1983). Effects of selected chemicals to photoluminescent bacteria and their correlation with acute and sublethal effects on other organisms. Chemosphere 12, 1421-1442. p.

230. RICHARD, J. L. – BRAY, G. A. – RYAN, D. H. (1991): Mycotoxins as immunomodulators in animal systems. Mycotoxins, cancer and health. Pennington Centre Nutrition Series, Vol. 1, 196-220. ROSENSTEIN, Y. – LAFARGE-FRAYSSINET, C. (1983): Inhibitory effect of Fusarium T-2 toxin on lymphoid DNA and protein synthesis. Applied Pharmacology 70, 283-288. p.

231. ROTTER BA, PRELUSKY DB, PESTKA JJ, (1996): Toxicology of desoxynivalenol (Vomitoxin). Journal of Toxicology and Environmental Health 48, 1-34. p.

232. ROUTLEDGE, E.J. & SUMPTER J.P. (1995): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast sreen, Environmental Toxicology and Chemistry 15 (3) 241–248. p.

233. ROWBOTHAM TJ, CROSS T (1977): Rhodococcus coprophilus sp. nov.: an aerobic nocardioform actinomycete belonging to the 'rhodochrous' complex. Journal of General Microbiology 100, 123–138. p.

234. RUZSAS C., BIRO-GOSZTONYI M., WÖLLER L., MESS B. (1979): Effect of the fungal toxin (zearalenone) on the reproductive system and fertility of male and female rats. Acta biologica, Academia Scientia Hungarica, 30 (4) 335-345. p.

235. SAHIN N, IŞIK K, TAMER AU, GOODFELLOW M. (2000) Taxonomic position of "Pseudomonas oxalaticus" strain Ox1T (DSM 1105T) (Khambata and Bhat, 1953) and its description in the genus ralstonia as ralstonia oxalatica comb. nov. Systematic Applied Microbiology 23, 206-209. p.

236. SÁLYI G. – GLÁVITS R. (1995): A barbari kacsa kísérletesen előidézett T-2 toxikózisa. Magyar Állatorvosok Lapja 50, 202-208. p.

237. SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J.A.M.P., KUIJPERS, A.F.A., FRANK, J.M. AND FRISVAD, J.C. (2004): New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. Studies in Mycology, 50, 45-61. p.

238. SANSEVERINO, J., ELDRIDGE, M.L., LAYTON, A.C., EASTER, J.P., YARBROUGH, J., SCHULTZ, T.W. & SAYLER, G.S. (2009). Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. Toxicologycal Sciences 107, 122-134. p.

239. SARTER, S., METAYER, I., ZAKHIA (2008): Effects of mycotoxins, aflatoxin-B1 and deoxynivalenol, ont he bioluminescence of *Vibrio Fischeri*. World Mycotoxin Journal 1 (2) 189-193. p.

240. SATO Y., NISHIHARA H., YOSHIDA M., WATANABE M., RONDAL J.D., CONCEPCION R.N. AND OHTA H. (2006) *Cupriavidus pinatubonensis* sp. nov. and *Cupriavidus laharis* sp. nov., novel hydrogen-oxidizing, facultatively chemolithotrophic bacteria isolated from volcanic mudflow deposits from Mt. Pinatubo in the Philippines. International Journal Systematic Evolutionary Microbiology, 56, 973-978. p.

241. SAUL DJ, AISLABIE JM, BROWN CE, HARRIS L, FOGHT JM (2005): Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. FEMS Microbiol Ecol 53, 141–155. p.

242. SCHATZMAYR, G., HEIDLER D., FUCHS, E., MOHNL, M., TÄUBEL. M., LOIBNER, A.P., BRAUN, R. & BINDER E.M., (2003): Investigation of different yeast strains for the detoxification of Ochratoxin A. Mycotoxin Research 19 (2) 124 -128. p.

243. SCHWARTZ, P., THORPE, K. L., BUCHELI, T. D., WETTSTEIN, F. E., BURKHARDT-HOLM, P. (2010). Short-term exposure to the environmentally relevant estrogenic mycotoxin zearalenone impairs reproduction in fish. Sci Total Environ. 409, 326-33. p.

244. SCOTT, P. M. (1989): The natural occurence of trichotecenes. Beasley, V.R. (ed): *Trichotecene mycotoxicosis:* Pathophysiologic effects. Volume I., CRC Press Inc. Boca Raton, 1-26. p.

245. SHIER W.T. (1998): Estrogenic mycotoxins. Revue de Médecine Vétérinaire, 149, 599–604. p.

246. SHIH, C.N., MARTH, E.H. (1975): Aflatoxin can be degraded by the mycelium of Aspergillus parasiticus, Zeitschriff fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 158, 361–362. p.

247. SHIMA J, TAKASE S, TAKAHASHI Y, IWAI Y, FUJIMOTO H, YAMAZAKI M, OCHI K (1997): Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. Applied and Environmental Microbiology 63, 3825–3830. p.

248. SMILEY R.D., DRAUGHON F.A., 2000, Preliminary evidence that degradation of aflatoxinB1 by Flavobacteruim aurantiacum is enzymatic, Journal of Food Protection, 63, 3, 415-418. p.

249. SMITH, J.E. & MOSS, M.O. (1985): Mycotoxins. Formation, analysis and significance. John Wiley & Sons, Chichester, UK. 148. p.

250. SMITH, T.K. (1980): Influence of dietary fiber, protein and zeolite on zearalenon toxicosis in rats and swine. Journal of Animal Science 50, 278–285. p.

251. SOLYANIKOVA IP, GOLOVLEV EL, LISNYAK OV, GOLOVLEVA LA. (1999). Isolation and characterization of catechol 1,2-dioxygenases from Rhodococcus rhodnii strain 135 and Rhodococcus rhodochrous strain 89: comparison with analogous enzymes of the ordinary and modified ortho-cleavage pathways. Biochemistry Moscow 64 (7) 824-31. p.

252. STAMPER DM, RADOSEVICH M, HALLBERG KB, TRAINA SJ, TUOVINEN OH. (2002): *Ralstonia basilensis* M91-3, a denitrifying soil bacterium capable of using s-triazines as nitrogen sources. Canadian Journal of Microbiology 48, 1089-1098. p.

253. STANDER, M.A., BORNSCHEURER, U.T., HENKE, E. AND STEYN, P.S. (2000): Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48, 5736-5739.

254. STEINLE P., STUCKI G., STETTLER W., HANSELMANN K.W., (1998): Aerobic Mineralization of 2,6-Dichlorophenol by *Ralstonia* sp. Strain RK1, Applied and Environmental Microbiology, 2566–2571. p.

255. STEINLE, P., STUCKI, G., STETTLER, R. & HANSELMANN, K. W. **(**1999**):** *Ralstonia basilensis sp.* nov. In Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List no. 71. International Journal of Systematic Bacteriology 49, 1325–1326. *p.*

256. STEYN, P. S. (1995): Mycotoxins, general view, chemistry and structure. Toxicology Letters 82/83, 843-851. p.

257. STOECKER MA, HERWIG RP, STALEY JT (1994) *Rhodococcus zopfii* sp. nov., a toxicant-degrading bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology 44, 106–110.

258. STOEV, S.D., (1998): The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan Endemic Nephropathy and its risk evaluation. Veterinary and Human Toxicology 40, 352–360. p.

259. STOKER, T. E., PARKS, L. G., GRAY, L. E., AND COOPER, R. L. (2000). Endocrinedisrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. Critical Review in Toxicology. 30, 197–202. p.

260. SUN, Y., CHAO, Y., QIAN, S., SHENG, W., BAO, W. X. (2003): Study on the degradation pathway of biphenyl by *Rhodococcus pyridinovorans* R04. Acta Microbiologica Sinica 43**,** 653-8. p.

261. SZEITZNÉ-SZABÓ M. ÉS KOVÁCS M. (2007): Mikotoxin határértékek szabályozása: egészségvédelem kontra szabályozás. Magyar Állatorvosok Lapja, 129, 48-57. p.

262. TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S., SHIBATA, T., HAMAMOTO, H., YAMAGUCHI, I., KIMURA, M. (2004): Metabolism of Zearalenone by Genetically Modified Organisms Expressing the Detoxification Gene from Clonostachys rosea. Applied and Environmental Microbiology, 70 (6) 3239-3245. p.

263. TAKEDA H, SHIMODAIRA J, YUKAWA K, HARA N, KASAI D, MIYAUCHI K, MASAI E, FUKUDA M.(2010): Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, Rhodococcus jostii RHA1. Journal of Bacteriology. Sep;192(18):4741-51. doi: 10.1128/JB.00429-10. Epub 2010 Jul 9.

264. TAKEUCHI M, HATANO K, SEDLACEK I, PACOVA Z (2002): *Rhodococcus jostii* sp. nov., isolated from a medieval grave. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 409–413. p.

265. TÁNCSICS, A., SZOBOSZLAY, S., KRISZT, B., KUKOLYA, J., BAKA, E., MÁRIALIGETI, K., RÉVÉSZ, S. (2008): Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. Journal of Applied Microbiology 105**,** 1026-33. p.

266. TÄUBEL, M., (2005): Isolierung und Charakterisierung von Mikroorganismen zur biologischen Inaktivierung von Fumonisinen. Doctoral Thesis. University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria.

267. TENIOLA, O.D., ADDO, P.A., BROST, I.M., FARBER, P., JANY, K.-D., ALBERTS, J.F., VAN ZYL, W.H., STEYN P.S.,HOLZAPFEL, W.H. (2005): Degradation of aflatoxin-B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans sp. nov*. International. Journal of Food Microbiology 105 (2) 111–117. p.

268. THIERRY, S., MACARIE, H., IIZUKA, T., GEIßDÖRFER, W., ASSIH, E. A., SPANEVELLO, M., VERHE, F., THOMAS, P., FUDOU, R., MONROY, O., LABAT, M., OUATTARA, A. S. (2004): *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(6) 2245-2255. p.

269. TINTELNOT K, TEGTMEYER F, KLOTZ M, (2011): *Trichosporon mycotoxinovorans*-a sword of Damocles for patients with cystic fibrosis. Mycoses, 54, 5, 373. p.

270. TIRADO, M. C., COHEN, M. J., ABERMAN, N., MEERMAN, J., & THOMPSON, B. (2010): Addressing the challenges of climate change and biofuel production for food and nutrition security. Food Research International, 43(7) 1729–1744. p.

271. TISCHLER,D., EULBERG,D., LAKNER,S., KASCHABEK,S.R., VAN BERKEL,W.J., SCHLOMANN,M. (2009): Identification of a novel self-sufficient styrene monooxygenase from Rhodococcus opacus 1CP, Journal of Bacteriology 191 (15) 4996-5009. p.

272. TREADWAY SL, YANAGIMACHI KS, LANKENAU E, LESSARD PA, STEPHANOPOULOS G, SINSKEY AJ (1999) Isolation and characterization of indene bioconversion genes from Rhodococcus strain I24. Applied Microbiology and Biotechnology 51, 786–793. p.

273. TREFAULT N., DE LA IGLESIA R, MOLINA AM, MANZANO M, LEDGER T, PÉREZ-PANTOJA D, SÁNCHEZ MA, STUARDO M, GONZÁLEZ B. (2004) Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from Ralstonia eutropha JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. Environmental Microbiology 6 (7) 655-68. p.

274. TRENHOLM, H. L. HAMILTON, R. M. G., FRIEND, D. W., THOMPSON, B. K., HARTIN, K. E. (1984): Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat: Effects of swine, poultry and dairy cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association 185, 527-531. p.

275. TSUBOUCHI, H., YAMAMOTO, K., HISADA, K., SAKABE, Y. AND UDAGAWA, S. (1987): Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. Mycopathologia, 97, 111-115. p.

276. TSUKAMURA M (1974): A further numerical taxonomic study of the rhodochrous group. Japanese Journal of Microbiology 18, 37–44. p.

277. UENO, Y. (1968): Inhibition of protein synthesis in animal cells by nivalenol and related metabolites. Toxic principles of rice infested with Fusarium nivale. Proc. First U.S. – Japan Conf. Toxic Microorganisms, 76-79. p.

278. UENO Y, NAKAYAMA K, ISHII K, TASHIRO F, MINODA Y, OMORI T, KOMAGATA (1983): Metabolism of T-2 toxin in Curtobacterium sp. strain 114-2., Applied and Environmental Microbiology.; 46 (1) 120–127. p.

279. VANDAMME P, GORIS J, COENYE T, HOSTE B, *JANSSENS D*, KERSTERS K, DE VOS P, FALSEN E. (1999). Assignment of Centers for Disease Control group IVc-2 to the genus Ralstonia as Ralstonia paucula sp. nov. International Journal Systematic Bacteriology 49, 663-669. p.

280. VAN DER GEIZE, R., DIJKHUIZEN L.. **(**2004): Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. Current Opinion in Microbiology. 7**,** 255–261. p.

281. VAN DER GEIZE, R., HESSELS G. I., VAN GERWEN R, VAN DER MEIJDEN P., DIJKHUIZEN L. (2002).: Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-ketosteroid 9_-hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. Molecular Microbiology

282. VARGA, I., MATYASOKSZKY, K., SOHÁR, J. (2000): Mycotoxin contamination of food items based on investigations in Hungary. Egészségtudomány, 44, 224-241. p.

283. VARGA, J., RIGÓ, K., TÉREN, J. MESTERHÁZY, Á. (2001): Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. Cereal Research Communications, 29, 85-92. p.

284. VARGA, J., KONCZ, Z., KOCSUBÉ, S., MÁTRAI, T., TÉREN, J., OSTRY, V., SKARKOVA, RUPRICH J, KUBATOVA A, KOZAKIEWICZ Z. (2007): Mycobiota of grapes collected in Hungarian and Czech vineyards in 2004. Acta Alimentaria, 36(3) 329–341. p.

285. VARGA, J., RIGÓ, K., TÓTH, B., MESTEHÁZY, Á., TÉREN, J. (2002): A mikotoxin kutatás újabb eredményei. Élelmezési Ipar. 56, 139-145. p.

286. VARGA J. & TÓTH B. (2005): Novel strategies to control mycotoxins in feeds. A review. Acta Veterinaria Hungarica, 53 (2), 189–203. p.

287. VEIKO,V.P., YANENKO,A.S., ALEKSEEVA,M.G., SINTIN,A.A., GULKO,L.B., RATMANOVA,K.I., OVCHAROVA,I.V., ASTAUROVA,O.B., POLJAKOVA,I.N., PAUKOV,V.N., VORONIN,S.P., DEBABOV,V.G. (1995): Cloning,nucleotide sequence of nitrile hydratase gene from Rhodococcus rhodochrous M8, Journal Biotekhnologiia (Mosc.) 5, 3-5. p.

288. VEKIRU, E., HAMETNER, C. MITTERBAUER, R., RECHTHALER, J., ADAM, G., SCHATZMAYR, G., KRSKA, R., SCHUMACHER, R. (2010): Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a novel non-estrogenic metabolite. Applied and Environmental Microbiology, 76 (7) 2353–2359. p.

289. WANG, E., NORRED, W.P., BACON, C.W., RILEY, R.T., MERILL, A.H. (1991): Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonizins: Implications for diseases associated with Fusarium verticillioides. Journal of Biological Chemistry 266, 14480-14490. p.

290. WANG, G., ZHANG, J., WANG, L., LIANG, B., CHEN, K., LI, S., JIANG, J. (2010): Co-Metabolism of DDT by the Newly Isolated Bacterium, *Pseudoxanthomonas* sp. Wax. Brazilian Journal of Microbiology, 41, 431-438. p.

291. WANG, J.S., GROOPMAN, J.D. (1999): DNA damage by myxotoxins. Mutation Research 424 (1-2) 167–181. p.

292. WANG Y.X., WANG H.B., ZHANG Y.Q., XU L.H., JIANG C.L. AND LI W.J.: *Rhodococcus kunmingensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from a rhizosphere soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58, 1467-1471. p.

293. WANG Z., XU J., LI Y., WANG K., WANG Y., HONG Q., LI W.J. AND LI S.P.: *Rhodococcus jialingiae* sp. nov., an actinobacterium isolated from sludge of a carbendazim wastewater treatment facility. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60, 378-381. p.

294. WESTLAKE K, MACKIE R I, DUTTON M F (1987): T-2 toxin metabolism by ruminal bacteria and its effect on their growth. Applied and Environmental Microbiology. 53(3), 587–592. p.

295. WHO (1998): Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the forthy-ninth meeting of the joint FAO/ WHO Expert committee on Food Additives (JECFA) WHO Food Additives Series no. 40. Geneva

296. WHO/FAO (2000): Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Aditive Series: 47, FAO Food and Nutrition Paper No. 74., WHO, Geneva 680. p.

297. WILLIAMS WA, LOBOS JH, CHEETHAM WE (1997): A phylogenetic analysis of aerobic polychlorinated biphenyl-degrading bacteriaInternational Journal of Systematic Bacteriology 47, 207–210. p.

298. WILLUMSEN P, JOHANSEN J, KARLSON U, HANSEN B (2005): Isolation and taxonomic affiliation of N-heterocyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology 67, 420–428. p.

299. WOLF, C. J., OSTBY, J. S., AND GRAY, L. E., JR. (1999). Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. Toxicology Science 51, 259–264. p.

300. WU, Q.K., JEZKOVA, A., YUAN, Z., PAVLIKOVA, L., DOHNAL, V., & KUCA, K., (2009): Biological degradation of aflatoxins. Drug metabolism review, 41, 1-7. p.

301. XU, H.H. & SCHURR, K.M. (1990) Genotoxicity of 22 pesticides in microtitration sos chromotest. Toxicity assessment, 5, 1–14. P.

302. XU J, HE J, WANG ZC, WANG K, LI WJ, TANG SK, LI SP (2007): *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 2754–2757. p.

303. YAN, J.Y. (2013): Comparison of the complete genome sequences of Rhodococcus erythropolis PR4 and Rhodococcus opacus B4, submitted (04-JAN-2013), Chinese Academy of Agricultural Sciences Feed Research Institute

304. YASSIN A (2005): *Rhodococcus triatomae* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 1575–1579. p.

305. YASSIN AF, SCHAAL KP (2005): Reclassification of *Nocardia corynebacterioides* Serrano et al. 1972 (Approved Lists 1980) as *Rhodococcus corynebacterioides* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 1345–1348. p.

306. YOON JH, CHO YG, KANG SS, KIM SB, LEE ST, PARK YH (2000 A): *Rhodococcus koreensis* sp. nov., a 2,4-dinitrophenol-degrading bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50, 1193–1201. p.

307. YOON, J. H., KANG, S. S., CHO, Y.G., LEE, S. T., KHO Y. H., ET AL. (2000 B): *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 2173-80. p.

308. YOSHIMOTO T, NAGAI F, (2004). Degradation of estrogens by Rhodococcus zopfii and Rhodococcus equi isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. Applied and Environmental Microbiology. 70 (9) 5283-9. p.

309. Young J. C., Zhou T., Yu H.,Zhu H., Gong J., (2007) Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes, Food and Chemical Toxicology 45, 136–143. p.

310. YU Y., QIU, L., WU, H., TANG, Y., YU, Y., LI, X., LIU, M. (2011): Degradation of zearalenone by the extracellular extracts of *Acinetobacter sp.* SM04 liquid cultires. Biodegradation, 22 (3) 613–622. p.

311. YUKSEL C, BULLERMAN LB. (2005): Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. Food and Chemical Toxicology; 43, 755–64. p.

312. ZELJEZIĆ D, DOMIJAN AM, PERAICA M. (2006) DNA damage by Ochratoxin-A in rat kidney assessed by the alkaline comet assay. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 39(12) 1563-8. p.

313. ZHAO G.Z., LI J., ZHU W.Y., TIAN S.Z., ZHAO L.X., YANG L.L., XU L.H. AND LI W.J.: *Rhodococcus artemisiae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the pharmaceutical plant *Artemisia annua* L. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2012, 62, 900-905. p.

314. ZHANG Y.Q., LI W.J., KROPPENSTEDT R.M., KIM C.J., CHEN G.Z., PARK D.J., XU L.H. AND JIANG C.L.: *Rhodococcus yunnanensis* sp. nov., a mesophilic actinobacterium isolated from forest soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005, 55, 1133-1137. p.

315. ZHANG J, ZHANG Y, XIAO C, LIU Z, GOODFELLOW M (2002): *Rhodococcus maanshanensis* sp. nov., a novel actinomycete from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 2121–2126. p.

316. ZILOUEI H, SOARES A, MURTO M, GUIEYSSE B, MATTIASSON B. (2006): Influence of temperature on process efficiency and microbial community response during the biological removal of chlorophenols in a packed-bed bioreactor. Applied Microbiolgy and Biotechnology. 72, 591-599. p.

317. ZINEDINE, A., JUAN, C., IDRISSI, L., MANES, J. (2007 A): Occurence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. Microchemical Journal, 87, 154-158. p.

318. ZINEDINE, A., JUAN, C., SORIANO, J.M., MOLTÓ, J:C., IDRISSI, J:, MANES, J.(2007 B): Limited survey for the occurance of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. International. Journal of Food Microbiology, 115, 124-127. p.

319. ZINEDINE, A., SORIANO, J. M., MOLTO, J. C., MANES, J. (2005): Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An estrogenic mycotoxin. Food and chemical toxicology. 45 (1) 1–18. p.

320. ZOPF W., (1891): Ueber ausscheidung von fettfarbsoffen (Lipochromen) seitens gewisser spaltpilzes. Ber Deut Bot Gesell 9, 22–28. p.

Egyéb hivatkozások:

7/1999. (VI. 16.) EüM rendeletének 4. számú melléklete (módosítás: 9/2003 EszCsM rendelet)

44/2003. (IV. 26.) FVM rendelet a Magyar Takarmánykódex kötelező előírásairól

20/2004. (II. 27.) FVM rendelet a Magyar Takarmánykódex kötelező előírásairól szóló 44/2003. (IV. 26.) FVM rendelet módosításáról

98/53/EC COMMISSION DIRECTIVE of 16 July 1998 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs

01/466/EC COMMISSION REGULATION 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs

2002/32/EK: Az Európai Parlament és Tanács 2002/32/EK irányelve (2002. május 7.) a takarmányban előforduló nemkívánatos anyagokról

2006/576/EK: A Bizottság ajánlása (2006. augusztus 17.) a deoxinivalenol, a zearalenon, az ochratoxin-A, a T-2, a HT-2 és a fumonizinek állati takarmányozásra szánt termékekben való előfordulásáról

1126/2007/EK: A Bizottság 1126/2007/EK rendelete (2007. szeptember 28.) az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról szóló 1881/2006/EK rendeletnek a kukoricában és kukoricakészítményekben előforduló Fusariumtoxinok tekintetében történő módosításáról

HTTP1: http://softflow.hu/Letoltesek/PDF_Toxi_ELISA.pdf - letöltés ideje 2013 június 2.

HTTP2: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html

HTTP3:https://asas.org/membership-services/press-room/press-release-interpretive-summary-archive/bacterial-supplement-could-help-young-pigs-fight-disease - letöltés ideje 2013 május18.

HTTP4: http://www.biosite.dk/leksikon - letöltés ideje 2013 június 20.

2. számú melléklet: A *Rhodococcus* nemzetség tagjainál eddig leírt biodegradációs képességek és feltárt enzimek, gének

Faj	Eddig leírt biodegradációs képesség	Teljes genom projekt	Eddig azonosított enzimek és azt kódoló gének
R. aetherivorans	alkán (QUATRINI ET AL., 2008) bután (FRASCARI ET AL., 2006) metil t-butiléter (GOODFELLOW ET AL., 2004) gázolaj (AUFFRET ET AL., 2009) BTEX (TÁNCSICS ET AL., 2008)	Igen	Alkb (QUATRINI ET AL., 2008) szuperoxid dizmutáz (sodA), alkil hidroperoxid reduktáz protein C (ahpC), kataláz/peroxidáz (katG) monooxigenáz (AUFFRET ET AL., 2009) alkán hidroxiláz (AUFFRET ET AL., 2009) Katekol 1,2-dioxigenáz (TÁNCSICS ET AL., 2008)
R. baikonurensis	gázolaj (LEE, 2006)	n. a.	
R. cercidiphylli	dibenzofurán (IIDA ET AL., 2002) azaarén (NPAH) (WILLUMSEN ET AL., 2005)	n. a.	Extradiol dioxigenáz (IIDA ET AL., 2002)
R. coprophilus	fenol, ftalát (JIN ET AL., 2010)	n. a.	ftalát dioxigenáz gén (CHAO ET AL., 2006)
R. equi	ciklohexil ecetsav (IWAKI ET AL., 2008)	Igen	putatív korizmát mutáz enzim, anthranilát szintáz enzimek aromás gyűrűhasító dioxigenáz (LETEK ET AL., 2008)
R. erythropolis	aflatoxin B1 (TENIOLA ET AL., 2005) 2,4-D (ASPRAY ET AL., 2005), benzol, n-alkánok, alkil-benzol (FAHY ET AL., 2006) bifenil (WILLIAMS ET AL., 1997) BTEX (HENDRICKX ET AL., 2006) ciklohexil ecetsav (IWAKI ET AL., 2008) 2,6,10,14-Tetrametilpentadekán (pristán) (KUNIHIRO ET AL., 2005), 3-klorobenzoát (QI ET AL.,2007) dibenzofurán (FUTAMATA ET AL., 2002), dibenzotiofén (DENIS-LAROSE ET AL., 1997), nitril (HEALD ET AL., 2001) hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) (BERNSTEIN ET AL., 2010) szteroidok (VAN DER GEIZE ET AL., 2002)	Igen	deszulfurizáló gének, flavin reduktáz gén 2,3-dihidroxi-bifenil 1,2-dioxigenáz (bphC5) gén (CAHILL Et al., 2005) tmoA/xylM/xylE1 (HENDRICKX ET AL., 2006) nitril hidratáz gén klaszter (PATEK ET AL., 2012) ThcG (thcG) és kloroperoxidáz (thcF) gének (DE SCHRIJVER ET AL., 1997) sox (DENIS-LAROSE ET AL., 1997) 3-ketoszteroid 9-hidroxiláz (VAN DER GEIZE ET AL., 2002)
R. fascians	dibenzofurán (IIDA ET AL., 2002), szénhidrogének (SAUL ET AL., 2005) sugárzás rezisztens (FREDRICKSON ET AL., 2004)	n. a.	dbfA1A2 (NOUMURA ET AL., 2004) dioxigenáz (IIDA ET AL., 2002),
R. globerulus	aromás szennyezők, 3-(3-hidroxi-fenil)propionát (3HPP) (BARNES ET AL., 1997)	n. a.	extradiol dioxigenáz (HppB) Katekol 1,2-dioxigenáz (TÁNCSICS ET AL., 2008)
R. imtechensis	nitrofenol (GHOSH ET AL., 2006)	Igen	nitrofenol degradáló gén klaszter (GHOSH ET AL., 2010)
R. jostii	lignin, poliklórozott bifenil (MCLEOD ET AL., 2006) szteroidok (MCLEOD ET AL., 2006)	Igen	vanillin dehidrogenáz (*vdh*) , vanillát *O*-demetiláz (*vanAB*), festék-szintelenítő peroxidáz enzimek bifenil 2,3-dioxigenáz (WANG ET AL., 2008) dehidrogenáz (TAKEDA ET AL., 2010) transzpozáz (TAKEDA ET AL., 2010) 2,4-diklorofenol 6-monooxigenáz (TAKEDA ET AL., 2010) KshAB, KstD, TesAaAb, TesB (MCLEOD ET AL., 2006)
R. koreensis	alkán (QUATRINI ET AL., 2008) 2,4 dinitrofenol (YOON J-H ET AL., 2000) xilol (WANG ET AL., 2008 , JANG ET AL. 2005)	n. a.	Alkb (QUATRINI ET AL., 2008) dioxigenáz (JANG ET AL., 2005)
R. marinonascens		n. a.	poliketid szintáz (KIM ET AL., 2007b)
R. opacus	fenildekán (HOLDER ET AL., 2011) TCE (DE MARCO ET AL., 2004) xilol (WANG ET AL., 2008)	Igen	Monooxigenáz (DE MARCO ET AL., 2004) o-xilén oxigenáz gén (MARUYAMA ET AL., 2005) trehalóz szintáz (YAN, 2013) kloro-fenol hidroxiláz (GROENING ET AL., 2008) katekol 1,2-dioxigenáz (GROENING ET AL., 2008) sztirén monooxigenáz (TISCHLER ET AL., 2009) alanin dehidrogenáz (DENGER ET AL., 2003) taurin-piruvát aminotranszferáz (DENGER ET AL., 2003) naftalén dioxigenáz (DI GENNARO ET AL., 2010) p-nitrofenol degradáló gén klaszter (KITAGAWA ET AL., 2004)
R. percolatus	2,4,6-triklórfenol (BRIGLIA ET AL., 1996)	n. a.	
R. phenolicus	fenol, klórbenzol, diklórbenzol (REHFUSS ÉS URBAN., 2005)	n. a.	
R. pyridinivorans	alkil-éter (KIM ET AL., 2007b) anilin (MATSUMURA ET AL., 2004) benzotiazolok (GAJA ÉS KNAPP, 1997) dibenzofuránok (ALY ET AL., 2008) xilol, toloul (WANG ET AL., 2008) 4-nitrotoloul (KUNDU ET AL., 2013) bifenil (SUN ET AL., 2003) acetonitril (KOHYAMA ET AL., 2006) szteroidok (PETRUSMA ET AL., 2011)	n. a.	Katekol 1,2- dioxigenáz (MATSUMURA ET AL. 2004) 3-ketoszteroid-9α-hidroxiláz gén (PETRUSMA ET AL., 2011) dfdA1A2A3A4 oxigenáz (ALY ET AL., 2008) bifenil katabolikus gének bphABCD (SUN ET AL., 2003) nitril hidratáz (KOHYAMA ET AL., 2006) dioxigenáz (WANG ET AL., 2008)
R. qingshengii	gázolaj, karbendazim, (WANG ET AL, 2010) triazin, 2,6,10,14-Tetrametil-pentadekán (KUNIHIRO ET AL., 2005), aciklikus aminok (KIM ET AL., 2006)	n. a.	
R. rhodnii	fenol (SOLYANIKOVA ET AL. 1999)	n. a.	Katekol 1,2-dioxigenáz enzimek 3- és 4-methil-pirokatekol enzimek (SOLYANIKOVA ET AL. 1999)
R. rhodochrous	bis 2-etilhexil adipát (BEHA), dioctil ftalát (DOP) és dioctil tereftalát (DOTP), hexadekán (NALLII ET AL., 2002) fenol (SOLYANIKOVA ET AL. 1999) 2-aminobenzotiazol (ABT) (CHORAO ET AL., 2009)	n. a.	Katekol 1,2-dioxigenáz enzimek 3- és 4-methilpirokatekol enzimek (SOLYANIKOVA ET AL. 1999) szteroid monooxigenáz (MORII ET AL., 1999) nitril hidratáz (VEIKO ET AL., 1995)
R. ruber	alkán (QUATRINI ET AL., 2008) alkil-éter (KIM ET AL., 2007b) ciklohexil ecetsav (IWAKI ET AL., 2008) szteroidok (FERNANDEZ ET AL., 2009)	Igen	Alkb (QUATRINI ET AL., 2008) Citokrom P450 alká monooxigenáz (KIM ET AL., 2007b) ciklohexán monooxigenáz (BORRATHYBAY ET AL., 2011) 3-ketoszteroid-delta-1-dehidrogenáz (FERNANDEZ ET AL., 2009)
R. wratislaviensis	hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) (BERNSTEIN ET AL., 2010) terbutilazin, s-triazin (GRENNI ET AL., 2009) gázolaj (AUFFRET ET AL., 2009)	n. a.	
R. yunnanensis	karbendazim (WANG ET AL, 2010)	n. a.	
R. zopfii	17-ösztradiol, ösztron, ösztriol, etinil-ösztradiol (YOSHIMOTO ET AL., 2004)	n. a.	

n.a.= nincs adat

3. számú melléklet: A vizsgált baktérium törzsek faj szerinti eloszlása és jelölésük

Vizsgált törzs fajneve	Vizsgált törzs jelölése	Identifikálás 16S rDNS alapján (bázispár)	Származási hely
Rhodococcus. aetherivorans	AK 44	100% (1492)	Agruniver Holding Kft
Rhodococcus coprophilus	N774	-	Dr. Michael Goodfelow
	AK 36	100% (1492)	Agruniver Holding Kft
Rhodococcus globerulus	N58	-	Dr. Michael Goodfelow
Rhodococcus gordoniae	AK 38	100% (1492)	Agruniver Holding Kft
Rhodococcus erythropolis	NI1	-	Dr. Nagy István
	AK35	100% (1492)	Agruniver Holding Kft
	AK 40	100% (1492)	Agruniver Holding Kft
	AK 42	100% (1492)	Agruniver Holding Kft
	GD-1	98% (1252)	Saját izolátum
	BRB 1BB	99% (1378)	Saját izolátum
	BRB 1AB	98% (1122)	Saját izolátum
	GD-2A	99% (1284)	Saját izolátum
	GD-2B	100% (1089)	Saját izolátum
	NCIMB 9784	-	Nemzetközi gyüjtemény
	DSM 43060	-	Nemzetközi gyüjtemény
	DSM 1069	-	Nemzetközi gyüjtemény
	DSM 743	-	Nemzetközi gyüjtemény
	L88	-	Nemzetközi gyüjtemény
	ŐR 9	99% (1212)	Saját izolátum
	ÖR 13	99% (1203)	Saját izolátum
	IFO 12538	-	Nemzetközi gyüjtemény
	OM 7-2	97% (1351)	Dr. Szabó István
	ZFM 23,1	98% (1206)	Dr. Szabó István
Rhodococcus pyridinivorans	AK 37	100% (1492)	Agruniver Holding Kft
	K402	99% (985)	Agruniver Holding Kft
	K404	99% (883)	Agruniver Holding Kft
	K408	99% (1023)	Agruniver Holding Kft
	NI2	-	Dr. Nagy István
Rhodococcus rhodochrous	ATTC 12674	-	Nemzetközi gyüjtemény
	4S8	99% (1032)	Dr. Szabó István
	N361	-	Dr. Michael Goodfelow
Rhodococcus ruber	AK41	100% (1492)	Agruniver Holding Kft
1 nemzetség, 8 faj, 33 törzs			
Arthrobacter protophormiae	J4	99% (615)	SZIE-MKK-KKBT
Chryseobacterium formosense	UA 5/8	98% (741)	SZIE-MKK-KKBT
C. hydrocarbonovorans	TN4	99% (825)	SZIE-MKK-KKBT
	BRB 6A	99% (678)	Saját izolátum
Cupriavidus basilensis	ŐR16	100% (1492)	Saját izolátum
Gordonia paraffinivorans	NZS 14	99% (689)	SZIE-MKK-KKBT
Microbacterium barkeri	EL1	98% (847)	SZIE-MKK-KKBT
M. esteraromaticum	NZS 9	98% (965)	SZIE-MKK-KKBT
Ochrobactrum tritici	DT2	98% (789)	SZIE-MKK-KKBT
Paracoccus sp.	CSZ4	95% (412)	SZIE-MKK-KKBT
	BZS10	95% (461)	SZIE-MKK-KKBT
Pseudomonas azelaica	TN5	99% (785)	SZIE-MKK-KKBT
Pseudomonas citronellolis	ZS1	99% (899)	SZIE-MKK-KKBT
Pseudomonas monteilii	ZV 6	99% (695)	SZIE-MKK-KKBT
Pseudomonas putida	DN1	98% (864)	SZIE-MKK-KKBT
Pseudomonas pseudoalcaligenes	FEH 28	98% (947)	SZIE-MKK-KKBT
Pseudomonas stutzeri	Kö5	98% (769)	SZIE-MKK-KKBT
Pseudoxanthomonas kalamensis	H4	98% (879)	SZIE-MKK-KKBT
Pseudoxanthomonas suwonensis	NZS6	98% (889)	SZIE-MKK-KKBT
Raoultella terrigena	TT6	98% (982)	SZIE-MKK-KKBT
Serratia liquefaciens	ŐR10	98% (779)	Saját izolátum
Sphingopyxis chiliensis	Kö10	99% (985)	SZIE-MKK-KKBT
12 nemzetség, 21 faj, 22 törzs			
Összesen 13 nemzetség, 29 faj, 55 törzs			

4. számú melléklet: A *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó törzsek mikotoxinbontó képessége, %-ban kifejezve

		Aflatoxin-B1			Zearalenon			T-2 toxin		Fumonisin-B1	Ochratoxin
Faj	**Törzs**	**ELISA**	**HPLC**	**SOS-Chromo teszt**	**ELISA**	**HPLC**	**BLYES teszt**	**ELISA**	**HPLC**	**HPLC**	**ELISA**
	NI1	98,63 ± 0,34	89,35 ± 2,13	NG	52,39 ± 2,64	60,55 ± 3,53	NE	94,85 ± 1,45	92,12 ± 2,57	<5	<5
	DSM 4306	98,57 ± 0,20	100 ± 0,0	NG	<5	-	-	95,06 ± 2,45	93,27 ± 2,79	<5	<5
	DSM 743	69,06 ± 0,82	70,34 ± 3,10	G	<5	-	-	95,46 ± 2,50	93,56 ± 3,23	<5	<5
	NCAIMB 9784	98,31 ± 0,81	98,32 ± 1,20	NG	19,21 ± 4,44	20,12 ± 2,77	-	94,87 ± 2,27	94,13 ± 2,57	<5	<5
	DSM 1069	91,03 ± 1,50	81,34 ± 1,74	G	<5	-	-	n.d.	n.d.	<5	<5
	IFO 12538	97,89 ± 1,05	97,83 ± 1,95	G	<5	-	-	93,91 ± 2,34	94,67 ± 1,56	<5	<5
	L88	97,13 ± 0,85	97,22 ± 1,50	G	<5	-	-	93,31 ± 2,74	94,58 ± 1,92	<5	<5
	AK 35	98,62 ± 0,56	99,26 ± 0,37	NG	<5	-	-	90,11 ± 3,47	91,66 ± 2,62	<5	<5
	AK 42	98,28 ± 0,88	98,2 ± 1,31	NG	<5	-	-	90,98 ± 2,34	92,61 ± 2,09	<5	<5
R. erythropolis (19)	AK 40	68,34 ± 1,92	70,21± 2,70	G	<5	-	-	90,17 ± 2,62	89,82 ± 2,62	<5	<5
	OM 7-2	84,30 ± 1,30	79,20± 1,96	G	<5	-	-	n.d.	n.d.	<5	<5
	ZFM 23,1	71,69 ± 3,70	72,87 ± 3,60	G	<5	-	-	n.d.	n.d.	<5	<5
	GD1	96,11 ± 2,47	96,5 ± 2,12	NG	<5	-	-	92,04 ± 1,96	93,16 ± 1,95	<5	<5
	GD 2A	97,39 ± 1,90	98,44 ± 1,50	NG	14,66 ± 2,75	17,83 ± 2,72	-	98,68 ± 0,47	97,58 ± 1,76	<5	25,00 ± 2,57
	GD 2B	98,67 ± 0,82	100 ± 0,0	NG	19,95 ± 5,43	24,23 ± 2,75	-	98,65 ± 1,51	96,37 ± 2,09	<5	<5
	BRB 1AB	98,81 ± 0,73	100 ± 0,0	NG	26,55 ± 4,86	19,94 ± 3,05	-	98,53 ± 1,08	98,79 ± 0,49	<5	34,01 ± 2,26
	BRB 1BB	98,81 ± 0,85	100 ± 0,0	NG	<5	-	-	91,44 ± 2,87	90,18 ± 2,54	<5	<5
	ŐR 9	97,78 ± 1,27	98,55 ± 1,31	NG	<5	-	-	93,92 ± 2,66	90,25 ± 2,53	<5	<5
	ŐR 13	96,56 ± 2,04	98,45 ± 0,97	NG	<5	-	-	93,58 ± 2,68	92,14 ± 2,65	<5	<5
R. pyridinivorans (4)	K402	98,81 ± 0,400	100 ± 0,0	NG	59,51 ± 4,75	69,4 ± 3,61	NE	<5	-	<5	22,74 ± 2,75
	K404	98,81 ± 0,883	98,56 ± 0,93	NG	62,62 ± 4,14	72,48 ± 2,14	NE	<5	-	<5	<5
	K408	98,21 ± 1,425	98,57 ± 1,04	NG	67,84 ± 2,46	77,54 ± 2,37	NE	<5	-	<5	13,93 ± 2,86
	AK 37	97,7 ± 2,032	98,29 ± 1,05	NG	49,82 ± 4,82	60,98 ± 2,39	NE	<5	-	<5	<5
R. ruber (3)	N361	<20	<20	G	59,41 ± 4,00	62,32 ± 2,29	E	61,33 ± 2,93	67,34 ± 4,18	<5	<5
	AK 41	36,7 ± 2,720	48,14 ± 2,22	G	<5	-	-	<5	-	<5	<5
	4S-8	28,89 ± 4,238	43,03 ± 2,37	G	<5	-	-	<5	-	<5	<5
R. globerulus (2)	N58	<20	<20	G	57,35 ± 4,14	60,21 ± 3,24	E	94,85 ± 1,6	95,23 ± 1,83	<5	<5
	AK 36	98,81 ± 0,790	98,4 ± 0,86	NG	<5	-	-	90,58 ± 3,16	89,10 ± 2,63	<5	<5
R. rhodochrous (2)	CW 25 (NI2)	98,81 ± 0,389	100 ± 0,0	NG	<5	-	-	94,88 ± 2,13	93,23 ± 2,97	<5	<5
	ATTC 12674	98,77 ± 0,875	98,47 ± 1,20	NG	30,44 ± 2,62	32,55 ± 2,14	E	95,42 ± 1,911	98,35 ± 0,73	<5	<5
R. coprophilus (1)	N774	61,38 ± 1,715	62,05 ± 4,08	G	32,53 ± 3,89	33,75 ± 4,19	-	95,25 ± 1,31	97,27 ± 2,62	<5	<5
R. aetherivorans (1)	AK 44	88,22 ± 2,613	90,23 ± 2,00	G	20,24 ± 1,75	26,81 ± 1,73	-	32,42 ± 2,11	38,72 ± 4,46	<5	<5
R. gordoniae (1)	AK 38	62,34 ± 3,551	63,33 ± 2,71	G	25,87 ± 4,33	29,73 ± 2,81	-	91,44 ± 2,15	90,51± 3,70	<5	<5

Jelmagyarázat:

NG: nem genotoxikus

G: genotoxikus

E: ösztrogénhatású

NE: nem ösztrogén hatású

n.d. = no data

5. számú melléklet: Nem a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok mikotoxinbontó képessége, %-ban kifejezve

Faj	Törzs jelölés	Aflatoxin-B1			Zearalenon			T-2 toxin		Fumonizin-B1	Ochratoxin-A		Deoxinivalenol
		ELISA	HPLC	SOS-Chromo teszt	ELISA	HPLC	BLYES teszt	ELISA	HPLC	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA
Arthrobacter protophormiae	J4	77,07 ± 1,44	-	G	<5	-	-	31,18 ± 3,08	-	<5	<5	-	<5
Chryseobacterium formosense	UA 5/8	76,79 ± 1,52	-	G	28,33 ± 0,78	-	-	50,50 ± 0,72	-	<5	<5	-	<5
Chryseobacterium hydrocarbonovorans	TN4	56,88 ± 1,59	-	G	30,24 ± 3,32	-	-	<5	-	<5	<5	-	<5
Cupriavidus basilensis	BRB 6A,	59,43 ± 2,33	-	G	10,32 ± 1,13	-	-	21,00 ± 1,12	-	<5	90,33 ± 1,68	98,33 ±1,07	<5
Cupriavidus basilensis	ŐR 16	62,23 ±1,62	-	G	10,65 ± 2,24	-	-	21,60 ± 1,65	-	<5	98,11 ± 0,24	99,00 ± 0,29	<5
Gordonia paraffinivorans	NZS 14	92,51 ± 1,44	-	G	90,21 ± 3,23	-	E	<5	-	<5	<5	-	<5
Microbacterium barkeri	EL1	74,19 ± 0,96	-	G	44,87 ± 4,36	-	-	90,90 ± 1,18		<5	<5	-	<5
Microbacterium esteraromaticum	NZS 9	64,80 ± 4,01	-	G	7,26 ± 0,99	-	-	91,60 ± 1,18		<5	<5	-	<5
Ochrobactrum tritici	DT2	87,50 ± 2,11	-	G	44,58 ± 1,66	-	-	29,47 ± 2,14	-	<5	<5	-	<5
Paracoccus sp.	CSZ4	75,00 ± 1,66	-	G	31,55 ± 1,72	-	-	12,50 ± 2,33	-	<5	<5	-	<5
Paracoccus sp.	BZS10	82,50 ± 2,14	-	G	31,86 ± 1,32	-	-	<5	-	<5	<5	-	<5
Pseudomonas azelaica	TN5	86,65 ± 0,26	-	G	29,57 ± 1,57	-	-	<5	-	<5	<5	-	<5
Pseudomonas citronellolis	ZS1	91,24 ± 0,61	-	G	20,88 ± 2,67	-	-	28,50 ± 3,12	-	<5	<5	-	<5
Pseudomonas monteilii	ZV 6	80,14 ± 0,78	-	G	28,43 ± 3,26	-	-	<5	-	<5	<5	-	<5
Pseudomonas putida	DN1	90,80 ± 0,18	-	NG	18,66 ± 1,77	-	-	<5	-	<5	<5	-	<5
Pseudomonas pseudoalcaligenes	FEH 28	97,61 ± 0,04	-	G	77,70 ± 1,45	-	NE	30,00 ± 1,23	-	<5	<5	-	<5
Pseudomonas stutzeri	Kö5	91,44 ± 0,19	-	G	40,48 ± 1,32	-	-	<5	-	<5	<5	-	<5
Pseudoxanthomonas kalamensis	H4	70,89 ± 4,09	-	G	70,57 ± 2,34	-	NE	14,00 ± 1,3	-	<5	<5	-	<5
Pseudoxanthomonas suwonensis	NZS6	76,75 ± 1,51	-	G	65,59 ± 3,11	-	E	95,00 ± 3,23	-	<5	<5	-	<5
Raoultella terrigena	TT6	52,00 ± 3,25	-	G	20,53 ± 2,67	-	-	<5	-	<5	<5	-	<5
Serratia liquefaciens (1)	ŐR10	86,00 ± 1,92	-	G	14,33 ± 2,11	-	-	24,60 ± 3,61	-	<5	<5	-	<5
Sphingopyxis chiliensis	Kö10	93,50 ± 1,24	-	G	42,54 ± 1,34	-	-	31,50 ± 2,11	-	<5	99,21 ± 0,06	99,11 ± 0,35	<5

Jelmagyarázat:

NG: nem genotoxikus

G: genotoxikus

E: ösztrogénhatású

NE: nem ösztrogénhatású

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az alábbi személyeknek szeretném megköszöni segítségüket és türelmüket:
Köszönöm témavezetőmnek Dr. Kriszt Balázsnak a végtelen türelmét és kitartását a doktori munkám mellett.
Köszönöm Dr. Kukolya Józsefnek az útmutatást és segítségnyújtást a kutatások kivitelezésénél.
A tanszéki munkatársaim közül hálával tartozom Dr. Krifaton Csillának a biotesztek kivitelezése és példamutatása terén. Továbbá köszönöm Dr. Táncsics Andrásnak a genom projektek előkészítésében nyújtott segítséget.

A doktori munkám kapcsán köszönöm az együttműködő intézmények munkatársainak segítségét:

- A brojlercsirke etetési kísérletet a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozási Tanszéke munkatársaival közösen végeztük. Ezúton is köszönöm Dr. Mézes Miklósnak, Balláné Dr. Erdélyi Mártának, Ancsin Zsoltnak a közös munkát.
- A hal etetési kísérletet a Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszéke és a Szabolcsi Halászati Kft. munkatársaival végeztük. Külön köszönettel tartozom Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak.
- A patkány- és egérkezelési modell kísérleteket a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Molekuláris Endokrin Neurobiológia Kutatócsoportjának munkatársaival közösen végeztük. Ezúton is köszönöm Kriszt Rókusnak, valamint Dr. Ferenczi Szilamérnek a közös munkát.
- A Soft Flow Kft. munkatársainak, Dr. Szőke Zsuzsának, Tóth Marikának, Tóth Szilvinek.
- A WIREC Kft. munkatársainak.

A doktori kutatásaim megvalósulásához az alábbi projektek nyújtottak támogatást:

- Élelmiszer biztonság fokozása gabona alapanyagok mikotoxin szennyezettségének csökkentésével (NKTH TECH_08-A3/2-2008-0385 MYCOSTOP)
- Új módszerek a hormonháztartást károsító szennyezők kockázat elemző/kezelő rendszerének fejlesztésére, Baross Gábor Program (HALEDC09)
- Klímaváltozás hatása az emberi egészségre és a bioszféra elemeire projekt (KTIA-AIK-12-1-2013-0017)