SZENT ISTVÁN EGYETEM

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

BIOMONITORING RENDSZEREK FEJLESZTÉSE AZ AFLATOXIN-B1 ÉS A ZEARALENON VIZSGÁLATÁRA

Krifaton Csilla

GÖDÖLLŐ

2012

A doktori iskola

megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

tudományága: Környezettudomány

vezetője: Dr. Heltai György
tanszékvezető, egyetemi tanár
Szent István Egyetem,
Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar,
Környezettudományi Intézet
Kémia és Biokémia Tanszék

Témavezető: Dr. Kriszt Balázs, Ph.D.
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

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5

1. BEVEZETÉS 6

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 8

2.1 Mikotoxinok csoportosítása 8

2.2 Mikotoxinokat termelő fonalas gombák 10

2.3 Aflatoxinok 11
2.3.1 Az aflatoxin-B1 káros hatásai 14
2.3.2 Az aflatoxin-B1 metabolizmusa 14
2.3.3 Az aflatoxinra vonatkozó szabályozás 15

2.4 Zearalenon 18
2.4.1 A zearalenon káros hatása 18
2.4.2 A zearalenon metabolizmusa 19
2.4.3 A zearalenonra vonatkozó szabályozás 19

2.5 Mikotoxinok kimutatására alkalmazott módszerek 20
2.5.1 Kémiai analitika 20
2.5.2 Immunanalitika 21
2.5.3 Biológiai hatásmérésen alapuló tesztek 22
2.5.3.1 Enzimaktivitás mérésen alapuló tesztek 23
2.5.3.2 Biolumineszcencia mérésen alapuló tesztek 26

2.6 Mikotoxinok detoxifikációja 31
2.6.1 Biodegradáció 32
2.6.1.1 Aflatoxin-B1 és zearalenon biodegradációja 32

3. ANYAG ÉS MÓDSZER 35

3.1 A mikotoxinok biológiai hatáselemzésre alkalmazott tesztek 35
3.1.1 *SOS*-Chromo genotoxicitás teszt 35
3.1.2 *Aliivibrio fischeri* citotoxicitás teszt 37
3.1.3 BLYES/BLYR hormonhatás elemző tesztreszdszer 38

3.2 Hazai kukorica mintákból izolált *Aspargillus flavus* törzsek aflatoxin-B1 termelésének kimutatása *SOS*-Chromo-teszttel 40
3.2.1 A minták begyűjtése, tenyésztés, izolálás 40
3.2.2 Aflatoxin-termelés vizsgálata 40

3.3 A biodegradációs kísérletekben felhasznált mikroorganizmusok és tenyésztési körülmények 40

3.4 Az aflatoxin-B1 biológiai lebontásának vizsgálata 41

3.5 A zearalenon biológiai lebontásának vizsgálata 42

3.6 Kémiai analitika 43

3.7 Immunanalitika 44

3.8 Statisztikai módszerek 44

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 46

4.1 Az aflatoxin-B1 és a zearalenon biológiai-hatáselemzése 46
4.1.1 *SOS*-Chromo genotoxicitás teszt 46
4.1.2 *Aliivibrio fischeri* citotoxicitás teszt 48
4.1.3 BLYES/BLYR hormonhatás elemző tesztrendszer 51

4.2 Hazai kukorica mintákból izolált *Aspargillus flavus* törzsek aflatoxin-B1 termelésének kimutatása *SOS*-Chromo-teszttel 55

4.3 Aflatoxin-B1 és zearalenon biológiai lebontásának vizsgálata 57
4.3.1 Az aflatoxin-B1 biológiai lebontásának vizsgálatára irányuló előkíséreltek 57

4.3.2 Kombinált toxikológiai profil kialakítása az aflatoxin-B1 biológiai lebontásának vizsgálatára 59
4.3.3 Zearalenon biológiai lebontásának nyomon követése élesztő alapú bioriporter rendszerrel 63
4.3.4 A zearalenon bontási kísérlet végpontján tapasztalt hormonhatás összegző értékelése és összevetése a kémiai- és immunanalitikai vizsgálatokkal 73

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK 77

6. ÖSSZEFOGLALÁS 82

7. ENGLISH SUMMARY 84

8. MELLÉKLETEK 86

1. számú melléklet: Irodalomjegyzék 86

2. melléklet: Biotranszformációs lehetőségek a szakirodalom alapján 98

3. melléklet: Az aflatoxin B1-re számított EC értékek részletes ismertetése a ToxRet program alapján 100

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 108

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4NQO	4-nitro-quinoline-oxid
AFB1	aflatoxin-B1
AFB2	aflatoxin-B2
AFG1	aflatoxin-G1
AFG2	aflatoxin-G2
AFP1	aflatoxin-P1
AFM1	aflatoxin-M1
AFM2	aflatoxin-M2
AFQ1	aflatoxin-Q1
CYP	citokróm P
DHFF	dihidro-furano-furán
DON	deoxinivalenol
EC20	20%-os hatást kiváltó koncentrációs érték
EC50	50%-os hatást kiváltó koncentrációs érték
ELISA	Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPA	Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (Environmental Protection Agency)
FB1	fumonisin-B1
GSH	glutation
FMN	flavin-mononukleotid
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IARC	Nemzeti Rákkutató Ügynökség
IC20	20%-os gátlást kifejező koncentrációs érték
OTA	ochratoxin-A
T-2	T-2 toxin
THFF	tetrahidro-furano-furán
ZEA	zearalenon

1. BEVEZETÉS

A mikotoxinok, a penészgombák másodlagos anyagcseretermékei, széles körben elterjedt mikroszennyezők, kiemelt figyelmet érdemelnek rendkívül súlyos akut és krónikus humán és állati egészségkárosító hatásuk miatt, és ezáltal jelenlétükkel komoly gazdasági károkat is okoznak. Veszélyük a sejtekre gyakorolt mutagén és citotoxikus, valamint a szervezetekre gyakorolt karcinogén, teratogén, endokrin rendszert zavaró és immunszupresszív, hatásukban rejlik. A tudomány által leginkább vizsgált mikotoxin az *Aspergillus* spp. penészgombák által termelt aflatoxin-B1, amely humán karcinogén hatása mellett mutagén és citotoxikus hatással is rendelkezik. Világviszonylatban a másik igen nagy gondot okozó mikotoxin a zearalenon, mely hormonháztartást zavaró hatása miatt reprodukciós és szaporodásbiológiai betegségeket okoz. Ezen két toxin említett hatásai miatt fontos, hogy azokat az élelmiszerekből, valamint az állati takarmányokból lehetőség szerint minél hatékonyabb módszerekkel eltávolítsuk.

A mikotoxinok eliminálására a fizikokémiai eljárások mellett egyre szélesebb körben alkalmazzák a mikotoxinok detoxifikálására irányuló biológiai módszereket. Az ilyen kutatások egyik legígéretesebb ágát a biológiai lebontáson alapuló eljárások képezik Sorra jelennek meg olyan tudományos cikkek, amelyek a mikotoxinok lebontására képes mikroorganizmusok izolálásáról és identifikálásáról szólnak és már kereskedelmi forgalomban is kapható olyan enzimalapú takarmány-adalékanyag, amely képes egyes mikotoxinok (zearalenon, ochratoxin) bontására (CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01). Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy egyes *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó baktérium törzsek kiváló aflatoxin-bontó képességgel rendelkeznek (TENIOLA ET AL., 2005, ALBERTS ET AL., 2006), de a zearalenon és ochratoxin eltávolításához hasonló biodetoxifikációs rendszer kialakítása mindezidáig várat magára. Ennek lehetséges okai a megfelelő screening rendszerek hiánya és a toxinszint mérési eljárások jelentős költsége.

A toxinok vizsgálatára alkalmazott kémiai- és immunanalitikai módszerek mellett egyre nagyobb szerepet kapnak a biológiai hatásmérésen alapuló mérési rendszerek. Az ilyen biotesztek egyik előnye éppen az, hogy olyan anyagok és folyamatok hatásaira is képesek fényt deríteni (bontási köztitermékek, egymással reakcióba lépő anyagok kölcsönhatásainak termékei, illetve antagonista és szinergista hatások a természetes rendszerekben), amelyek kémiai analitikai módszerekkel nem vagy csak igen költséges módon mutathatóak ki, illetve követhetőek.

Munkám során célom volt:

- Biomonitoring rendszerek fejlesztése az aflatoxin B1 és zearalenon vizsgálatára.
- Takarmányalapanyagok (pl. kukorica minták) toxintartalmának vizsgálatára alkalmas megbízható, gyors biológiai hatásmérésen alapuló tesztek kialakítása.
- A kialakított biomonitoring rendszerek adaptálása biodegradációs eljárásokhoz, amelyekkel az aflatoxin-B1 és a zearalenon bontása a biológiai hatásuk változásának mérésével jellemezhető.
- A jó bontási potenciállal rendelkező törzsek közül azok szelekciója, amelyek toxikus metabolitok nélkül képesek az aflatoxin-B1, valamint a zearalenon degradációjára; illetve ezzel összefüggésben a biodegradáció folyamatának nyomon követése, és az esetlegesen fellépő kockázatok detektálása.

A kitűzött célok megvalósulása esetén olyan eredményekre számíthatunk, amelyek hozzájárulnak egy megbízható, gyors, költséghatékony biomonitoring rendszer kifejlesztéséhez, amely akár gyorsértékelési rendszerként szolgálhat élelmiszer-, takarmány-, és környezetbiztonsági területen; illetve amelyekkel megbízhatóan választhatóak ki a káros metabolitok nélküli aktív aflatoxin és zearalenon degradációra képes törzsek.

A doktori értekezésben bemutatott eredmények és tézisek saját laboratóriumi vizsgálatokon és méréseken alapulnak, az eredmények összevetéséhez pedig az összegyűjtött és értékelt, hivatkozott szakirodalom szolgált alapul.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A mikotoxinok különböző penészgombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, amelyek a környezeti hatásokkal szemben igen rezisztensek. Ellenállnak a magas hőmérsékletnek, akár 100-200°C-nak, illetve a gyomornedv sósav tarmalmának, ezért mérgező tulajdonságuk a szervezetben is megmarad. A szervezeten belül különféle szervekben akkumulálódhatnak (vese, máj), valamint a sejtekre mérgező hatással vannak. A különböző gombatoxinoknak számos káros tulajdonsága van, amelyeket a gazdasági veszteségek, és humán-egészségügyi vonatkozások (mutagén, teratogén, immunszupresszív, endokrin rendszert zavaró, citotoxikus) miatt figyelembe kell venni (MÉZES, 1997; AMBRUS & SZEITZNÉ, 2008). A kutatások eredményeként több mint 1000 mikotoxint ismerünk, amelyek közül kiemelt humán- és állategészségügyi jelentősége 15-20 toxinnak van, közülük az egyik legveszélyesebb hatású az *Aspergillus*-fajok által termelt aflatoxin-B1, amely az egyik legerősebb természetes eredetű mutagén (IARC, 1993, IARC, 2002; RAFAI, 2003; KOVÁCS, 2001). A mérsékelt éghajlatú országokban, így Magyarországon is elsősorban a *Fusarium*-fajok által megtermelt toxinok okoznak jelentős állat- és humán-egészségügyi kockázatot (HTTP1), közülük kiemelkedik a zearalenon, amely származékaival együtt szaporodásbiológiai és ivarzási problémát okoz, mivel kémiai szerkezetükben hasonlóak a természetes ösztrogénvegyületekhez, és sokszor erősebb ösztrogénhatással bírnak azokkal szemben (GROMADZKA ET AL., 2008).

2.1 Mikotoxinok csoportosítása

A mikotoxinokat többféle módon csoportosíthatjuk. A csoportosítást nehezíti, hogy egy nemzetségbe tartozó gombák is termelhetnek eltérő kémiai szerkezetű toxinokat, ugyanakkor egymástól taxonómiailag távol álló fajok is termelhetnek azonos toxint. A mikotoxinok csoportosítása történhet azok bioszintézise, kémiai szerkezete, vagy az okozott farmakológiai hatás alapján:

- A mikotoxinok változatos kémiai összetétele miatt a bioszintézisük is sokféle lehet. A legelfogadottabb csoportosítás a mikotoxinok bioszintézisének prekurzorai alapján történő felosztás (acetil-CoA és malonil-CoA kondenzációjából poliketidek és rubratoxinok, mavelonát rendszerből a szeszkviterpének, aminosavakból származtatható N-heterociklikus vegyületek és ciklikus polipeptidek) (SMITH & MOSS, 1985).

- A toxinok kémiai szerkezetéből adódó rokonság alapján való rendszerezés: pl. furano-kumarin származékok (pl. aflatoxinok); trichotecénvázasok (pl. *Fusarium* penészek által termelt toxinok).
- A magasabb rendű élőlényekre gyakorolt farmakológiai hatás alapján, rangsorolva az élettani veszélyességet (KOVÁCS, 2001; RAFAI 2003)
    - **Rákkeltő (karcinogén)** hatása az aflatoxinoknak, az ochratoxin-A, a fumonizin, a sztreigmatocisztin és a patulin mikotoxinnak van. Májrák kialakulását, illetve sejtszaporodási zavarokat okoznak. Növelik a női egyedekben és a leány utódaikban az emlőrák megjelenésének esélyét.
    - **Fejlődési rendellenességet okozó (teratogén)** hatása az aflatoxin-B1, ochratoxin-A, és a rubratoxin-B mikotoxinoknak van. Toxikus hatásuk növeli a halvaszületések számát és a magzatok fejlődésében zavarokat okoznak. Születési rendellenességeket és csökkent születési súlyt eredményeznek. T-2 toxin jelenlétében az ochratoxin hatása felerősödik.
    - **Ellenálló képesség csökkentő (immunszupresszív)** hatással elsősorban a trichotecének rendelkeznek, melyek rövidebb-hosszabb behatást követően károsítják az immunrendszert; egyrészt az elsődleges és másodlagos immunszervek sejtes elemeire hatnak károsan, másrészt csökkentik a falósejtek (makrofágok) aktivitását.
    - **Emésztési zavarok, ételmérgezések** alakulhatnak ki, ha a takarmány T-2, deoxinivalenol, patulin és ochratoxin-A toxinnal szennyezett. Elsődlegesen a takarmány visszautasítása, illetve nagy koncentráció esetén hányinger jelentkezik. A patulin elsősorban az emésztőszerveket károsítja.
    - **Idegrendszeri ártalmak**ért felelősek a trichotecének (T-2, deoxinivalenol), amelyek az agy vérellátásában és a központi idegrendszer működésében okoznak zavart. Az ochratoxin károsodást okoz az idegszövetek fejlődésében és az idegsejtek közötti kapcsolatban.
    - **Hormonrendszert zavaró** hatása, azon belül **ösztrogén mimetikus** hatása a zearalenon és az aurofuzarin mikotoxinoknak van. Női nemi szervek (petefészek, méh) abnormális működését, és vemhesülési zavarokat okozhatnak.
    - **Dermatotoxikus** hatása kifejezetten a T-2 toxinnak van. A bőrrel vagy a nyálkahártyával érintkezve gyulladásos elhalás alakul ki.

2.2 Mikotoxinokat termelő fonalas gombák

A toxintermelés több tényezőtől függ: egyrészt magától a gombafajok toxintermelő képességétől, másrészt pedig az egyes fajok eltérő ökológiai környezetben különböző toxinokat termelhetnek, vagy a toxintermelést fel is függeszthetik. Azonban az egy fajba tartozó gombák is termelhetnek eltérő kémiai szerkezetű toxinokat, illetve eltérő taxonómiai besorolású fajok is termelhetnek azonos toxint (2.1 sz. táblázat). A gombák mikotoxin-termelése függ a gazdanövénytől, illetve a gazdanövény termésének kémiai összetételétől. A gomba szaporodásának optimális feltételei általában nem azonosak a toxintermelés optimális feltételeivel. Az optimális oxigén ellátottság, a pH és a relatív nedvességtartalom megváltozása a legfőbb tényezői a mikotoxin termelésnek. A romló környezeti feltételek a penészgombák számára élettani stresszt jelentenek, mivel gátoltak a növekedésben és az anyagfelvételben. Ennek eredményeként beindul a másodlagos metabolizmus folyamata. Kémiailag bonyolult szerkezetű metabolitok (pl.: antibiotikumok, alkaloidok, toxinok) termelődnek, melyek nem szükségesek a gomba életfolyamataihoz (RAFAI, 2003; MÉZES, 2009), ezért régebben úgy gondolták a szekunder metabolitok funkció nélküli melléktermékek. Mára világossá vált szerepük a toxintermelő gombák versenyképességének fokozásában, legyen szó a gazdanövénybe jutás elősegítéséről, vagy a mikrobák közötti kompetícióról (KELLER ET AL., 2005; LUDEWIG ET AL., 2005).

A penészgombák a fentebb részletezett egészségkárosító hatások (2.1. fejezet) mellett a növényi részeket fertőzhetik, ezzel csökkentve a beltartalmi értéküket. Megjelenésük és a kártételük jellegzetességei alapján, illetve az eltérő életfeltételek alapján szántóföldi és raktári gombákra osztjuk (CHRISTENSEN & KAUFMANN, 1969).

- **Szántóföldi penészfajok:** Elsősorban szántóföldi növénykultúrákban fordulnak elő. Fejlődésükhöz nagy nedvességtartalom (20-30%) szükséges. 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). A legfontosabb szántóföldi penészgombafajok a *Fusarium,* az *Alternaria* és a *Stachybotrys*-fajok.
- **Raktári penészfajok:** Elsősorban a tárolt terményt fertőzik. A szántóföldön történő raktári penészgomba fertőzés veszélye minimális, de talajlakó életformájuknak köszönhetően a spóráik a légmozgással, mind a lábonálló növényeket, mind a raktározott terményt fertőzhetik. 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).

2.1. sz. táblázat: A leggyakoribb mikotoxinokat termelő penészgombák és az általuk termelt mikotoxinok (MÉZES, 2009)

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

2.3 Aflatoxinok

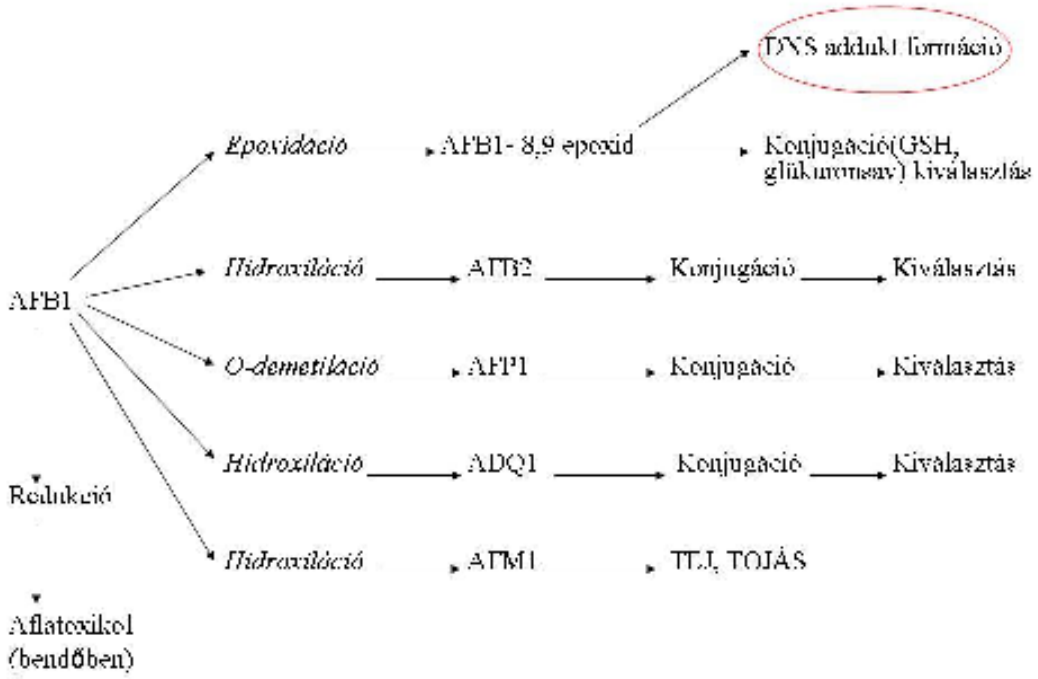
A világon az egyik legtöbb gondot okozó mikotoxin az aflatoxin-B1 (AFB1). Az aflatoxin szennyezésnek tulajdonítható éves gazdasági veszteség közel 1 milliárd dolláros nagyságrendű az élelmiszer - és takarmányiparban (WU, 2004). A magyarországi éghajlati viszonyok között az aflatoxinokkal ritkán lehet számolni, hiszen csak nagy páratartalmú és tartósan magas hőmérséklet mellett termelődnek. Az aflatoxin szennyezéssel érintett országok például: Kína, USA, Brazília, az afrikai kontinens országai (Kenya, Mozambik). Az aflatoxinokat termelő gombák – *Aspergillus flavus* (2.1. sz. kép), *A. parasiticus, A. nominus, A. pseudotanasii* – legnagyobb mennyiségben az olajos magvakon (földimogyoró, szója, gyapotmag, napraforgó)

2.1. sz. kép: *Aspergillus flavus* konídium mikroszkópikus felvétele (HTTP2)

és a gabonanövényeken (kukorica, rizs) találhatók, de elszaporodhatnak a kávén, paprikán és egyéb trópusi, szubtrópusi termékeken is. Ebből adódóan hazánkban az aflatoxin előfordulásával főként az import termékekben találkozhatunk. A hazai gabonafélékben korábban az *Aspergillus flavus* toxintermelésével nem találkoztak. Valószínűleg a klímaváltozás, vagyis a mind melegebb és nagyobb nedvességtartalmú környezet eredményeként a toxint, ugyan csak nyomokban, de már a hazánkban termesztett és tárolt gabonafélékben is ki lehetett mutatni (KOVÁCS, 1990; KOVÁCS, 2010; DOBOLYI ET AL., 2011).

Az aflatoxinok kimutatására irányuló kutatások során vékonyréteg kromatográfiás vizsgálattal négy jól elkülönülő típust kaptak, amelyeknek ultraviola (UV) fényben mutatott fluoreszcencia színük alapján a B1, B2, G1 és G2 jelzéseket adták (B=kék szín, G=zöld szín). A tehén és juhtej vizsgálata során pedig egy kékeslila színnel fluoreszkáló AFB1 metabolitot fedeztek fel, amelyet eredete (milk) alapján M1-nek neveztek el. A tejjel kiválasztódó aflatoxin-M1 lineáris összefüggést mutat a naponta felvett AFB1 mennyiségével. A juhok vizeletéből pedig egy az M1-hez nagyon hasonló felépítésű vegyületet találtak, amit aflatoxin M2-nek neveztek el (D'MELLO & MACDONALD, 1997).

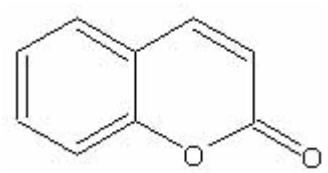
A metabolikus úton létrejövő és a tejben megjelenő aflatoxin-M1, és a vizeletben megjelenő aflatoxin-M2 toxinon kívül más végtermékek is kialakulnak. Az emlősök anyagcsere folyamatai során lezajló biotranszformációk eredményeként, az adott aflatoxin csoportnak megfelelően, aflatoxin-P1 és aflatoxin-Q1 vegyületek jönnek létre (MCLEAN & DUTTON, 1995). Az AFB1 különböző típusainak kialakulását az 2.1. sz. ábra szemlélteti.



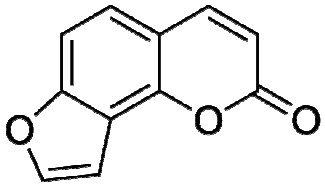
2.1. sz. ábra: Az AFB1 átalakulásának folyamatai az állandó testhőmérsékletűek szervezetben (MÉZES, 1997)

Szerkezetüket tekintve az aflatoxinok kumaringyűrűt (2.2 sz ábra) tartalmaznak, a csoport tagjai furano-kumarin (2.3. sz. ábra) származékok:

- B1, G1 és M1: dihidro-furano-furán (DHFF)
- B2, G2, M2: tetrahidro-furano-furán (THFF)

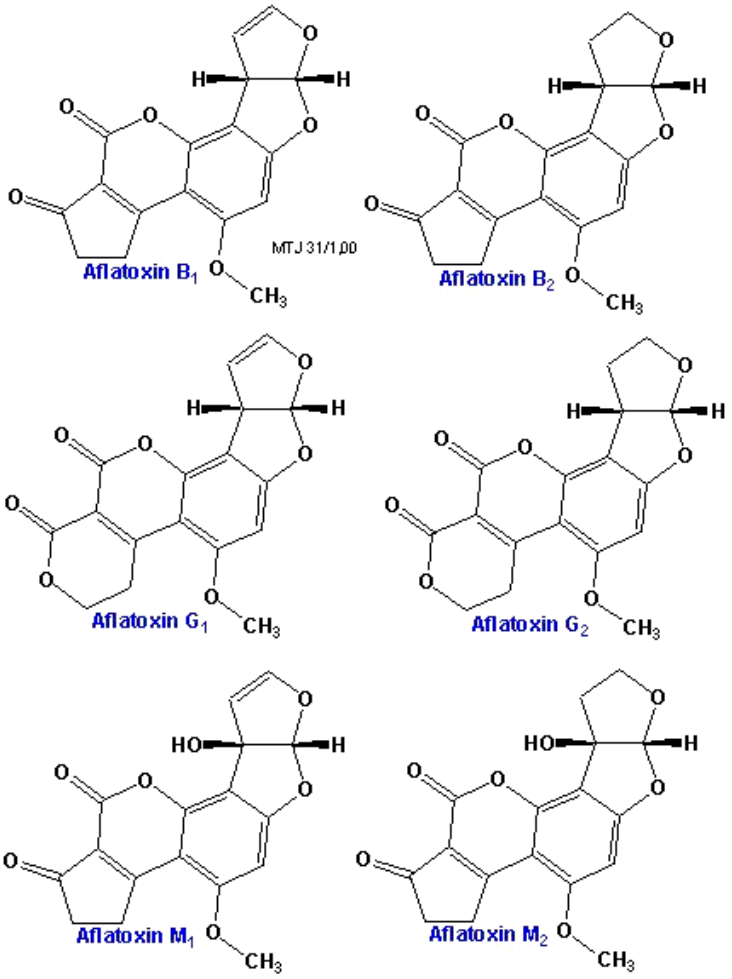


2.2. sz. ábra: A kumarin gyűrű szerkezeti képlete (HTTP3)



2.3. sz. ábra: A furano-kumarin szerkezeti képlete (HTTP4)

Az AFB1 és B2 bifuránnal és pentatongyűrűvel, illetve az aflatoxin-G1 és G2 bifuránnal és egy hattagú laktongyűrűvel kondenzált. Az aflatoxin-M1, M2 az AFB1 és B2 hidroxilációjából keletkezik. Az előbbiekben felsorolt aflatoxin formák kémiai szerkezeti felépítését a 2.4. sz. ábra mutatja.



2.4. sz. ábra: Az aflatoxin típusai és szerkezeti felépítése (HTTP5)

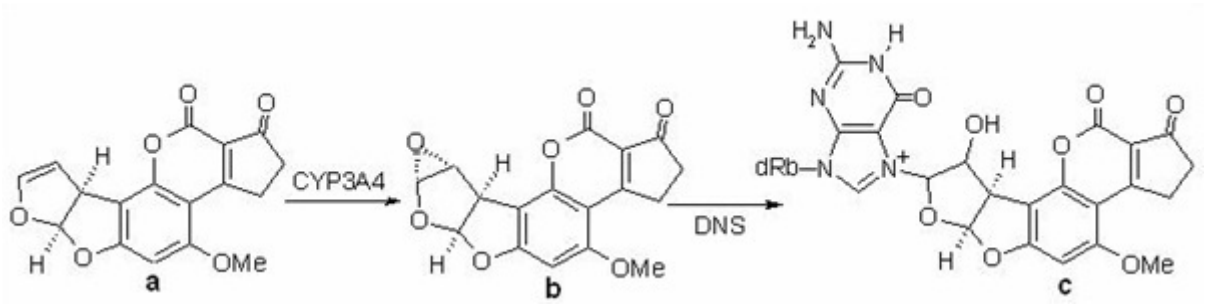
2.3.1 Az aflatoxin-B1 káros hatásai

A szakma által leginkább vizsgált mikotoxin az AFB1, köszönhetően mutagén, karcinogén, teratogén, immunmoduláns és citotoxikus tulajdonságának. A rákkeltő hatást kifejező karcinogenitási meredekségi faktor (cancer slope factor) az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (Environmental Protection Agency – EPA) által meghatározott a lakosságot érintő veszélyre vonatkoztatott becsült érték, az aflatoxin-B1 esetében CSF: 2900 mg/kg/nap (FJELD ET AL., 2007). Minél nagyobb ez a szám, vagyis minél meredekebb a görbe, annál kisebb dózis, ill. alacsonyabb koncentráció kell adott daganatkockázati szint eléréséhez. Ugyanezen CSF érték pl. a benzol esetében szájon át történő felvételnél: 0,055; inhaláció esetén: 0,029; illetve a króm (VI) rákkeltő hatására jellemző CSF érték inhaláció esetén 41. A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC, International Agency for Research on Cancer) 1982-ben I. kategóriába sorolta, tehát bizonyítottan humán karcinogénnek tekinti az AFB1-et. Mutagén hatásán kívül ismeretes erős citotoxikus hatása is; elsősorban hepatotoxikus vegyület. Ez abban nyilvánul meg, hogy emlősökben, madarakban és halakban májgyulladást és májdaganat kialakulását idézi elő (ROBENS & RICHARD, 1992; MILLER & WILSON, 1994). Az AFB1 továbbá mitózisgátló hatására vezethető vissza továbbá, immunmoduláns, valamint teratogén tulajdonsága is (SZEITZNÉ, 2010).

2.3.2 Az aflatoxin-B1 metabolizmusa

Az aflatoxin-molekulának feltehetően két reaktív helye van, a dihidrofurán rész telítetlen vége és a lakton gyűrű kumarin része. Ahhoz, hogy a felvett AFB1 genotoxikus hatást tudjon gyakorolni egy szervezetre, át kell alakulnia reaktív epoxiddá. Ezt az átalakítást a mono-oxigenáz enzim rendszer citokróm P450 végzi. Ezek az enzimek a szervezetbe került idegen anyagok (aflatoxin) I. fázisú metabolikus folyamataiban játszanak szerepet. A májban történik az AFB1 aktiválása, ahol a mono-oxigenázok által AFB1-8,9-epoxiddá oxidálódik, melynek két izomere van, az exo és az endo forma. Az exo izomer kialakulását a CYP3A4 citokróm oxidáz enzim végzi, amely oxirán-származékot képez, és egy oxigénatom kapcsolódik a 8. és 9. számú szénatomra. A létrejött AFB1-8,9-exo-epoxid molekula nagy affinitással kötődik a nukleinsavak guanin bázisához, így AFB1-N7-guanint formálva. Az örökítő anyaghoz való kapcsolódást a 2.5. sz. ábra szemlélteti. Ez a kötődés guanin-timin báziscserét, mutációt, DNS és RNS károsodást okozhat. A szervezetben zajló metabolizációs folyamatok második fázisának, amely a konjugációs kapcsolatok létrejöttében vesz részt, nagy szerepe van az AFB1-8,9-exo-epoxid DNS-hez való kötődésének megakadályozásában. A konjugációs kapcsolatot az epoxiddal a glutation-S-transzferáz képes kialakítani. A

kapcsolat eredményeként AFB1-GSH-konjugát jön létre, amely már nem képes a szervezettel reakcióba lépni, és amit a szervezet kiválasztó folyamatai révén a vesén keresztül a vizelettel kiürít (WANG & GROOPMAN, 1999; BEDARD & MASSEY, 2006).



2.5. sz. ábra: Az AFB1 enzimatikus oxidációja és az adduktum képződése a DNS-sel (GYÖRGY ET AL., 2008)

2.3.3 Az aflatoxinra vonatkozó szabályozás

Az Európai Unió a Bizottság 1881/2006/EK rendelete (2006. december 19.) illetve annak módosítása (Bizottság 165/2010/EU rendelete) alapján szabályozza az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok megengedhető mennyiségét, köztük az aflatoxinok felső határértékeit is (2.2 sz. táblázat). Az Európai Unióba érkező nem állati eredetű takarmányok és élelmiszerek behozatalára vonatkozó hatósági ellenőrzések kötelező végrehajtását a 669/2009/EK rendelet szabályozza. A hazai élelmiszerekre vonatkozó szabályozást a 17/1999. (VI.16.) EüM rendelet 4. számú melléklete előremutató módon szabályozta a mikotoxin határértékeket már a csatlakozás előtt is (2.3 sz. táblázat).

2.2. sz. táblázat: Az élelmiszerekben előforduló aflatoxinok felső határértékeinek meghatározására vonatkozó szabályozás az Európai Unióban (165/2010/EU)

	Élelmiszer	Felső határérték (µg/kg)		
	Aflatoxinok	B1	B1+B2+G1+G2	M1
2.2.1	Az emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatásnak vagy egyéb fizikai kezelésnek alávetett földimogyoró (mogyoró) és egyéb olajos magvak, kivéve a következőket: finomított növényi olaj készítéséhez zúzásra szánt földimogyoró (mogyoró) és egyéb olajos magvak	8,0	15,0	-
2.2.2	Az emberi fogyasztás, vagy élelmiszergyártásnál élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatandó, vagy más fizikai kezelésnek alávetendő mandula, pisztácia és sárgabarackmag	12,0	15,0	-
2.2.3	Emberi fogyasztás, vagy élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatásnak vagy egyéb fizikai kezelésnek alávetendő mogyoró és brazildió	8,0	15,0	-
2.2. 4	Az emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatásnak vagy egyéb fizikai kezelésnek alávetendő más, a 2.1.2. és a 2.1.3. pontban nem felsorolt, fán termő héjas gyümölcsűek	5,0	10,0	-
2.2.5	Közvetlen emberi fogyasztásra vagy összetett élelmiszerek összetevőjeként történő felhasználásra szánt földimogyoró (mogyoró) és egyéb olajos magvak kivéve a következőket: - finomításra szánt nyers növényi olajok - finomított növényi olajok	2,0	4,0	-
2.2.6	Közvetlen emberi fogyasztásra vagy összetett élelmiszerek	8,0	10,0	-

	összetevõjeként történõ felhasználásra szánt mandula, pisztácia és sárgabarackmag			
2.2.7	Közvetlen emberi fogyasztásra vagy összetett élelmiszerek összetevőjeként történő felhasználásra szánt mogyoró és brazildió	5,0	10,0	-
2.2.8	Közvetlen emberi fogyasztásra vagy összetett élelmiszerek összetevőjeként történő felhasználásra szánt más, a 2.2.6. és a 2.2.7. pontban fel nem sorolt, fán termő héjas gyümölcsűek, és ezek feldolgozott termékei	2,0	4,0	-
2.2.9	Az emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatásnak vagy egyéb fizikai kezelésnek alávetendő szárított gyümölcs	5,0	10,0	-
2.2.10	Közvetlen emberi fogyasztásra vagy összetett élelmiszerek összetevőjeként történő felhasználásra szánt szárított gyümölcs és annak feldolgozott termékei	2,0	4,0	-
2.2.11	Valamennyi gabonaféle és a gabonafélékből származó valamennyi termék, beleértve a feldolgozott gabonatermékeket is, a 2.2.12., 2.2.15. és 2.2.17. pontban felsorolt élelmiszerek kivételével	2,0	4,0	-
2.2.12	Az emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatásnak vagy egyéb fizikai kezelésnek alávetendő kukorica és rizs	5,0	10,0	-
2.2.13	Nyers tej (6), hőkezelt tej és tejalapú termékek előállításához használt tej	-	-	0,05
2.2.14	Az alábbi fűszerfajták: - *Capsicum* spp. (ezekből készült szárított gyümölcsök, egészben vagy őrölve, beleértve a chilipaprikát, a chilipaprikaport, a cayenne borsot és a paprikát is) - *Piper* spp. (ezek gyümölcsei, beleértve a fehér- és a feketeborsot is) - *Myristica fragrans* (szerecsendió) - *Zingiber officinale* (gyömbér) - *Curcuma longa* (kurkuma) Az említettek közül egy vagy több fűszert tartalmazó fűszerkeverékek	5,0	10,0	-
2.2.15	Csecsemők és kisgyermekek számára készült gabonaalapú élelmiszerek és bébiételek	0,1	-	-
2.2.16	Anyatej-helyettesítő és anyatej-kiegészítő tápszerek, beleértve a tejalapú anyatej-helyettesítő tápszert és a tejalapú anyatej-kiegészítő tápszert	-	-	0,025
2.2.17	Speciális gyógyászati célokra szánt diétás élelmiszerek kifejezetten csecsemők számára	0,1	-	0,025

2.3. sz. táblázat: Az élelmiszerekben előforduló aflatoxinok felső határértékeinek meghatározására vonatkozó szabályozás Magyarországon (17/1999. (VI.16.) EÜM)

	Termék	Felső határérték (µg/kg)		
	Aflatoxinok	B1	B1+B2+G1+G2	M1
2.3.1	Dió, mogyoró, mandula, gesztenye, szárított gyümölcsök és ezek feldolgozott termékei (közvetlenül emberi fogyasztásra vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználásra)	2	4	0
2.3.2	Földimogyoró (ha emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználás előtt válogatással vagy más fizikai kezeléssel tisztítják)	8	15	-
2.3.3	Dió, mogyoró, mandula, gesztenye, szárított gyümölcs és zöldség (ha emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználás előtt válogatással vagy más fizikai kezeléssel tisztítják)	5	10	-
2.3.4	Édesipari termékek	1	1	-
2.3.5	Gabonafélék (beleértve a hajdinát, *Fagopyrum* spp.) és gabonaőrlemények (közvetlen emberi fogyasztásra vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználásra)	2	4	0
2.3.6	Gabonafélék (beleértve a hajdinát, *Fagopyrum* spp.) a kukorica	2	4	-

	kivételével (közvetlen emberi fogyasztásra vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználásra)			
2.3.7	Fűszerek • paprika (*Capsicum* spp) egész vagy őrölt, beleértve a csilit, csiliport • bors (*Piper* spp.) fehér és fekete • szerecsendió *(Myristica fragrans)* • gyömbér *(Zingiber officinale)* • kurkuma *(Curcuma longa)*	5	10	-
2.3.8	Tej és tejtermékek (a felhasznált tej arányának megfelelően)	-	-	0,05

A takarmányok AFB1 tartalmát EU-n belül a 2002/32/EK rendelet szabályozza (2.4. sz. táblázat), amely a takarmányokban előforduló nemkívánatos anyagokról szól. Magyarországon ezt honosítja a 44/2003.(IV.26.) FVM rendelet és annak módosítása a 20/2004.(II. 27.) FVM rendelet (2.5. sz. táblázat).

2.4. sz. táblázat: A takarmányokban előforduló aflatoxin-B1-re vonatkozó szabályozás az Európai Unióban (2002/32/EK)

Takarmányozásra szánt termék	Határérték (mg/kg)*
Takarmány-alapanyagok, kivéve: • földimogyoró, kopra, pálmamag, gyapotmag, babaszumag, kukorica és az ezek feldolgozásából származó termékek	0,05 0,02
Teljes értékű marha-, juh és kecsketakarmányok, kivéve: • tejelő teheneknek szánt takarmányok • borjú- és bárányt akarmányok	0,05 0,005 0,01
Teljes értékű sertés- és baromfitakarmányok (kivéve a növendék állatoknak szánt takarmányt)	0,02
Más teljes értékű takarmányok	0,01
Kiegészítő marha-, juh- és kecsketakarmányok (kivéve a tejelő állatoknak, borjaknak és bárányoknak szánt kiegészítő takarmányt)	0,05
Kiegészítő sertés- és baromfitakarmányok (kivéve a növendék állatoknak szánt kiegészítő takarmányt)	0,03
Más kiegészítő takarmányok	0,005

Jelmagyarázat
*12 %-os nedvességtartalmú takarmányra vonatkozóan

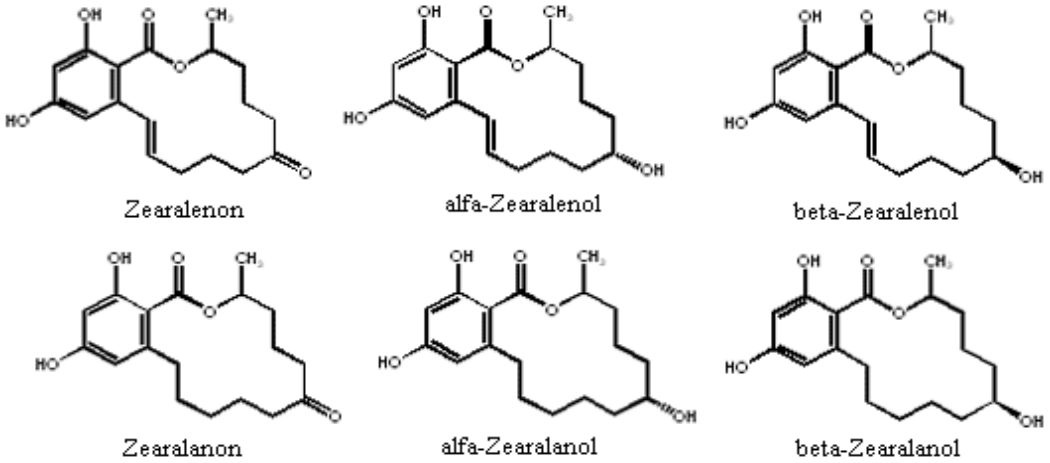
2.5. sz. táblázat: A takarmányokban előforduló aflatoxin-B1-re vonatkozó szabályozás (44/2003 FVM rendelet és módosítása 20/2004. (II. 27.) FVM rendelet)

Takarmányozásra szánt termékek	Határérték (mg/kg)*
Összes takarmány-alapanyag	0,02
Teljes értékű szarvasmarha-, juh- és kecsketakarmány, kivéve:	0,02
• tejhasznosítású állatok teljes értékű takarmánya • teljes értékű borjú- és bárány-takarmány	0,005 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

Jelmagyarázat
*12 %-os nedvességtartalmú takarmányra vonatkozóan

2.4 Zearalenon

A zearalenon (ZEA), vagy más néven F-2 toxin a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fonalas gomba fajok által termelt rezorcilsav-lakton. Származékai többek között a természetben előforduló alfa-zearalenol, beta-zearalenol, zearalanon, 3'-hidroxizearalenon, 8'-hidroxizearalenon, 5-formilzearalenon (2.6. sz. ábra) (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-KLICH, 2003).



2.6. sz. ábra: A zearalenon és származékainak szerkezeti felépítése (HTTP6)

2.4.1 A zearalenon káros hatása

A ZEA biológiai hatásait tekintve igen változatos képet mutat. Származékaival együtt főként szaporodásbiológiai és ivarzási problémát okoznak, mivel kémiai szerkezetükben hasonlóak a természetes ösztrogén vegyületekhez, és sokszor ezeknél erősebb ösztrogénhatással bírnak (GROMADZKA ET AL., 2008). Elsősorban az endometrium, vagyis a méhnyálkahártya, a petefészek, a tejmirigyek, a hipotalamusz, a hipofízis elülső lebenyének sejtjein található ösztrogén receptorokhoz kapcsolódnak, és ezeken keresztül tudják kifejteni a hatásaikat. A ZEA által okozott kórképet már 1927-ben megfigyeltek az USA-ban sertéseken, Magyarországon pedig a hatvanas évek óta van jelen. Ösztrogénszerű hatását befolyásolja a receptorok típusa és eloszlása is. Ez okozza az eltérő érzékenységet a fajok között. Sokszor a fuzárium toxinok szinergizmus révén felerősítik egymás hatását, még súlyosabb szaporodásbiológiai zavarokat okozva (CSEH & KOVÁCS, 2010).

A 70-es években egy magyar kutatócsoport bizonyította a ZEA hormon- és reprodukciós rendszert zavaró hatását. A kísérletben szereplő állatok hosszú ideig szennyezett takarmánnyal történő etetése következtében zavarok léptek fel a tüszőérésben, a spermatogenezis során, valamint a termékenységben is (RUZSAS ET AL., 1979). Erre irányuló további kutatások eredményei is igazolják a ZEA azon hatását, mely szerint csökkenti a

tesztoszteron és spermium mennyiségét, és fokozza az elnőiesedést (ETIENNE & DOURMAD, 1994), több esetben pedig leírták fiatal lányok korai ivarérését. A toxin elsősorban a kukorica és a búza alapanyagú termékekből kerülhet a szervezetbe (KOVÁCS, 2010).

A ZEA további káros biológiai hatása a haematotoxicitás, vagyis vérmérgező tulajdonsága (MAAROUFI ET AL., 1996). Genotoxikus és mutagén hatását illetően 2004-ben Lioi és munkatársai vizsgálataik során kromoszómatöréseket tapasztaltak (LIOI ET AL., 2004). Mindezeken felül egyes vizsgálatok alapján leírták májkárosító hatását is, melynek oka, hogy a toxin megváltoztat különböző biológiai markereket; valamint immunotoxicitása is ismert (ZINEDINE, 2005).

2.4.2 A zearalenon metabolizmusa

A ZEA – mint ahogyan a többi trichotecénvázas mikotoxin – átalakulása során toxikusabb másodlagos metabolitok keletkeznek. A toxin szervezetbe kerülését követően könnyen megkötődik a bélrendszerben, majd a sejteken belül tovább alakul metabolitjaira, melyek aztán a glükuronsavval kapcsolódnak. Ez a glükóz oxidációjával keletkező szerves sav fontos szerepet játszik az idegen anyagok kiválasztásában, így a ZEA esetében is. Ugyanis a glükuronid megkötődik a bélnyálkahártya-sejtjeiben, majd a májba onnan pedig a véráramba kerül. Ez a hepatikus keringés okozza a toxin elhúzódó visszatartását, így gátolja eliminációját és fokozza a káros hatások időtartamát (GROMADZKA, 2008). A ZEA metabolitjai az alfa-zearalenol, amely a ZEA-nál négyszerte aktívabb (MÁTRAI ET AL., 2003), és a beta-zearalenol (szerkezete megegyezik az alfa-zearalenoléval, de az atomok kapcsolódási sorrendjében térnek el, tehát a béta az alfa sztereoizomer párja), amely a ZEA-val megegyező toxicitású (FITZPATRICK ET AL., 1989, SHIER ET AL 2001). Vizsgálatok kimutatták, hogy az állatfajok közül leginkább a sertés érzékeny a ZEA-ra, mert szemben a többi állatfajjal, ennek szerveztében a metabolizáció következtében alfa-zearalenol keletkezik, ahogyan az emberében is.

2.4.3 A zearalenonra vonatkozó szabályozás

A ZEA-ra vonatkozóan az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeit az 1881/2006/EK rendelet és ennek módosítása az 1126/2007/EK rendelet tartalmazza (2.6. sz. táblázat). Az hazai élelmiszerekre vonatkozó szabályozás (17/1999. (VI.16.) EüM rendelet) az élelmiszerek zearalenon tartalmát 100 µg/kg koncentrációban maximálta. Hazánkban a forgalomban lévő gabona őrleményekben a ZEA mennyisége 75–200 µg/kg, müzlikben pedig 50 µg/kg lehet (Kovács, 2010).

2.6. sz. táblázat: Az élelmiszerekben előforduló zearalenon felső határértékeinek meghatározására vonatkozó szabályozás az Európai Unióban(1126/2007/EK)

	Élelmiszer	Felső határérték (µg/kg)
2.6.1.	Feldolgozatlan gabonafélék	100
2.6.2.	Feldolgozatlan kukorica, a nedves őrlésre szánt feldolgozatlan kukorica kivételével	350
2.6.3.	Közvetlen emberi fogyasztásra szánt gabonafélék, gabonaliszt, korpa és csíra mint közvetlen emberi fogyasztásra szánt késztermék, a 2.6.6., 2.6.7., 2.6.8., 2.6.9. és 2.6.10. pontban felsorolt élelmiszerek kivételével	75
2.6.4.	Finomított kukoricaolaj	400
2.6.5.	Kenyér (beleértve a kis pékárukat), tésztafélék, keksz, gabonaszeletek és reggeli gabonapelyhek, kivéve a kukoricaszeleteket és kukoricaalapú reggeli pelyheket	50
2.6.6.	Közvetlenül emberi fogyasztásra szánt kukorica, kukoricaalapú szeletek és kukoricaalapú reggeli pelyhek	100
2.6.7.	Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek és bébiételek (a feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek kivételével)	20
2.6.8.	Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek	20
2.6.9.	A kukorica 1103 13 vagy 1103 20 40 KN-kód alá tartozó, 500 mikronnál nagyobb méretű őrlési frakciói és kukoricából származó egyéb, nem közvetlen emberi fogyasztásra szánt, az 1904 10 10 KN-kód alá tartozó, 500 mikronnál nagyobb méretű őrlési termékek	200
2.6.10.	A kukorica 1102 20 KN-kód alá tartozó, legfeljebb 500 mikron méretű őrlési frakciói és kukoricából származó egyéb, nem közvetlen emberi fogyasztásra szánt, az 1904 10 10 KN-kód alá tartozó, legfeljebb 500 mikron méretű őrlési termékek	300

Az Európai Unió által elfogadott, takarmányokban mérhető legmagasabb ZEA koncentrációt a 2006/576/EK szabályoza (2.7. sz. táblázat). Az európai uniós határértékeket a magyar takarmánykódex kötelező alkalmazásáról szóló 44/2003 FVM rendelet 2. melléklete szerint, Magyarország teljes egészében átvette az unió előírásait.

2.7. sz. táblázat: A zearalenon állati takarmányozásra szánt termékekben való előfordulására vonatkozó szabályozás az Európai Unióban (2006/576/EK)

	Takarmány	Felső határérték (mg/kg)
2.7.1.	Gabonafélék és gabonakészítmények, kivéve a kukorica melléktermékeket	100
2.7.2.	kukorica melléktermékek	3
2.7.3.	kiegészítő és teljes értékű takarmányok malacoknak és kocasüldőknek	0,1
2.7.4.	tenyészkocáknak és hízósertéseknek	0,25
2.7.5.	borjaknak, tejelő teheneknek, juhoknak (beleértve a bárányokat) és kecskéknek (beleértve a gidákat)	0,5

2.5 Mikotoxinok kimutatására alkalmazott módszerek

2.5.1 Kémiai analitika

A toxinok elválasztására számos kromatográfiás módszer (vékonyréteg kromatográfia, gázkromatográfia-tömeg spektrometria, magasnyomású-folyadékkromatográfia) alkalmazható, amelyek közül pontosságának és megbízhatóságának köszönhetően a magasnyomású-folyadékkromatográfia (HPLC) a legszélesebb körben alkalmazott kémiai analitikai módszer a toxinok kvalitatív és kvantitatív kimutatására. Ebben az esetben a

mintával kapcsolatba lépő mozgófázis folyadék. A mérés során a fölösleges gázokat eltávolítják. A HPLC vizsgálatoknál kétféle detektort alkalmaznak. Az egyik típus a mozgófázis azon tulajdonságait vizsgálja, mely a mintával való érintkezés következtében megváltozik. Ilyen lehet a sűrűség vagy a törésmutató. A másik típus a minta egyedi tulajdonságát, úgy, mint UV abszorbanciáját vagy fluoreszcenciáját méri (KRISTÓF, 2000). A HPLC fluoreszcenciás detektálási módja sikeresen alkalmazható a ZEA és származékai esetében, köszönhetően azok természetes fluoreszkálásának (GROMADZKA ET AL., 2008). Több toxin vizsgálatára alkalmas módszer is létezik, ilyen az összetett HPLC-MSMS, mely egy kromatográfiás elválasztást alkalmaz kiegészítve a további szelekciót lehetővé tevő kettő tömeg spektrométerrel (BÚZA & MARTHNÉ, 2010).

A mikotoxinok élelmiszerekből és takarmányokból való kimutatására vonatkozó hazai és nemzetözi szabványok HPLC vagy vékonyréteg kromatográfiás módszereken alapszanak.

2.5.2 Immunanalitika

Széles körben alkalmazott módszer az enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), mely megbízhatóan alkalmazható mikotoxin vizsgálatok esetében is. A módszer alapja az antitestek azon tulajdonsága, mely szerint kiválóan meg tudják különböztetni a mikotoxinok háromdimenziós szerkezetét(GROMADZKA ET AL., 2008).

A mérés elve folyadék fázisú antigén-antitestkötésen alapul. 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 felszíneihez 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. (HTTP7).

2.5.3 Biológiai hatásmérésen alapuló tesztek

Az emberi felhasználásból a környezetbe került vegyi anyagok, illetve a természetes anyagok feldúsulása különös veszélyt jelent az élőlényekre, így az egész ökoszisztémára nézve is. Ezen anyagok élő szervezetekre gyakorolt hatásait vizsgáló és azok válaszreakcióival foglalkozó tudományág a toxikológia. A toxikológia tehát mérgekkel, mérgezést okozó hulladékokkal, anyagok toxicitásának kimutatásával, hatásmechanizmusukkal foglalkozik (HTTP8). Az ökotoxikológia célja pedig, hogy szennyező anyagok biológiai módszerekkel vizsgált hatásait az ökoszisztémára vetítsük, tehát a környezetbe kerülő anyagok a környezet élőlényeire gyakorolt hatását tanulmányozuk egyed feletti biológiai szerveződési szinten (CALOW, 1993). Mind a toxikológiai, mind az ökotoxikológiai tesztszervezeteket, tesztrendszereket alkalmaz bioindikációs módszerrel, hogy következtetéseket vonjon le adott anyag káros hatását illetően. (HTTP8).

A káros hatás a terhelés, illetve a koncentráció függvénye, hiszen számos ásványi elem – mely szükséges az élő szervezet számára – mérgezővé vagy károssá válik annak túlsúlya esetén. Ez a hatás függ a környezetben előforduló más anyagoktól, a lehetséges kölcsönhatásoktól (Kádár, 1998). Azt az aktuális anyagmennyiséget, amely különböző expozíciós útvonalakon bekerül egy organizmusba, dózisnak nevezzük. Vizsgálhatjuk a dózis-válasz összefüggést, amely vegyi anyagok esetében kis dózisban sokszor stimuláló hatású. Más esetekben küszöbérték tapasztalható, tehát a növekvő koncentráció ellenére egy küszöbértékig nincs következmény.

<u>A biológiai tesztrendszereket alkalmazó módszerek előnyei és hátrányai</u>

A biológiai tesztrendszerek számos előnnyel bírnak: gyorsak, pontosak, jól reprodukálhatók és a kémiai analitikához viszonyítva általában olcsóbbak is. Mindezek mellett a kísérletek nem vetnek fel etikai problémát, különösen az alacsonyrendű tesztszervezetek (pl. mikrobák) használatakor. A vizsgálati módszerekre jellemző, hogy minél bonyolultabb a rendszer annál nagyobb a környezeti realizmusa, de ezzel együtt egyre inkább nő a hely-, idő- és költségigénye. A biológiai tesztrendszerek hátránya, hogy sokszor a laborban kapott eredmények nem vonatkoztathatók ténylegesen a környezetben lejátszódó folyamatokra, így alkalmazásuk csak az analitikai módszerekkel együttesen vezetnek célhoz (CALOW, 1993).

A biológiai tesztrendszerek kiválóan alkalmasak környezeti minták vizsgálatára, ugyanis általuk olyan hatásokra is fény derülhet, melyek a fizikai-kémiai módszerek számára rejtve maradnak, mivel a vizsgált paraméterek között nem szerepelnek. Az biológiai hatásvizsgálatok és kémiai analitikai vizsgálatok együttesen alkalmasak annak a

megállapítására, hogy mekkora kockázattal, milyen változás bekövetkeztével és milyen hatással jár az élő szervezetekre különböző szennyezők felszabadulása. Az biológiai és kémiai analitikai eredmények a következő módon térhetnek el egymástól (DURA & GRUIZ, 2001):

- Az analitikai eredmények nagy szennyezőanyag koncentrációt mutatnak, míg az biológiai hatás kicsi. Ennek oka lehet, hogy a vegyi anyagok olyan kötött állapotban vannak, hogy kioldásuk biológiai folyamatokkal nem lehetséges, nem hozzáférhető. Az ilyen eset vezet a kémiai időzített bomba lehetőségéhez. Abban az esetben, ha egy külső környezeti hatás megváltoztatja valamelyik paramétert, akkor a szennyezőanyag hozzáférhetővé válik az élőlények számára, így komoly környezeti veszélyforrássá válhat.
- Előfordulhat az a jelenség is, hogy a kémiai analitikai eredmények nem támasztják alá a tapasztalt biológiai hatást. Ennek oka lehet, hogy olyan új ismeretlen anyag okozza a toxikus hatást, amely jelenlétét nem sejtjük, így analitikai módszerekkel nem is vizsgáljuk. Ezen kívül a fentebb említett, természetben tapasztalható antagonista/szinergista hatások is okozhatnak olyan toxikus körülményeket, amelyek analitikai módszerekkel nem elemezhetőek.

A biológiai hatásmérő teszteknél alkalmazott mérési végpontok

Különböző mérési végpontok különböztethetők meg a krónikus és akut vizsgálatok kapcsán. Ezen vizsgálatok során a különböző szennyező anyagok koncentrációiban adjuk meg a kiválasztott tesztorganizmusokon mért hatást (fénykibocsátás-változás, mozgásképtelenség, halál). A különböző koncentrációk mellett végpontként szolgálhat a különböző enzimek aktivitásának csökkenése is (GRUIZ ET AL., 2001).

2.5.3.1 Enzimaktivitás mérésen alapuló tesztek

A diagnosztikus célú enzimaktivitás mérések során nem magára az enzimre, hanem az általa jelzett sejt-, illetve szövetkárosodásra vagyunk kíváncsiak. Az orvosi célú vizsgálatokhoz hasonlóan az ökotoxikológiában/toxikológiában is az enzimek bioindikátor szerepet tölthetnek be a káros hatás vizsgálata során.

***SOS*-Chromo teszt – genotoxicitás mérése**

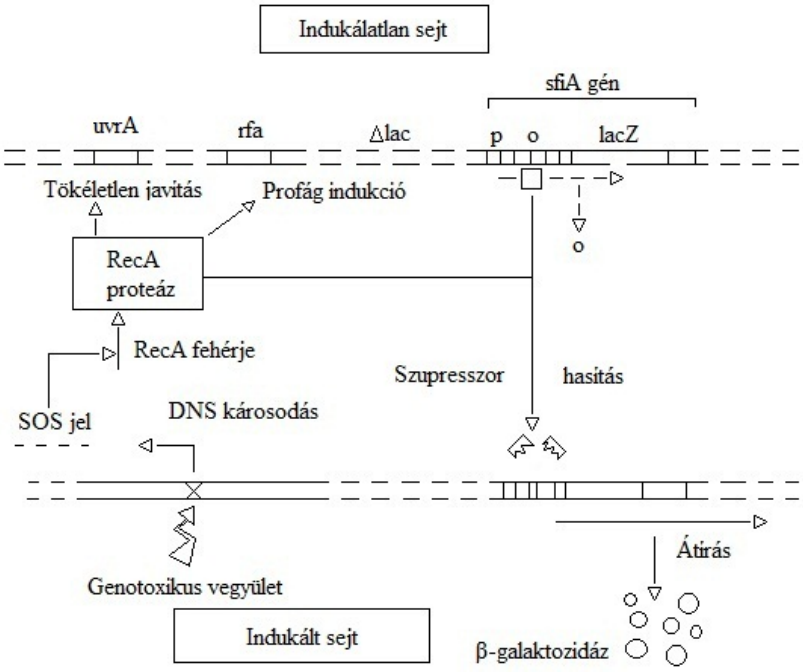
A mutagén anyagok kimutatására használt *SOS*-Chromo teszt a β-galaktozidáz és az alkalikus foszfatáz enzim aktivitás mérésén alapuló egyszerű kolorimetriás mérés. A teszt az *Escherichia coli* K12-ből származó PQ37 mutáns törzsét használja tesztszervezetként. A teszt azon az elven alapul, hogy a legtöbb genotoxikus vegyület indukálja az *SOS* hibajavító tendszert 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. Normál állapotban egy gátlófehérje (represszor) megakadályozza az *sfi*A gén és ezzel együtt a *lac*Z gén kifejeződését. Abban az esetben, ha a sejt valamilyen mutagén anyaggal kerül kapcsolatba, a sejt elindít egy *SOS* jelet, amely hatására egy rekombináns fehérje (RexA) hasítja a represszort (LexA) és megtörténik az *sfi*A gén átíródása, amellyel együtt a *lac*Z gén is átíródik, tehát megindul a *β*-galaktozidáz termelődés (2.7. sz. ábra.). A PQ37-es mutáns törzsben tehát, a fentebb említett *lac*-operon áthelyeződés miatt, a galaktozidáz termelődés csak az *sfi*A expressziója után indulhat be.

A tesztszervezet további két mutáns gént hordoz. A vad típusú *uvr*A excíziós-repair elem lehetővé tenné a DNS károsodás gyors megszüntetését, így az *SOS*-válasz elmaradását. Ennek mutációjával a PQ37 törzs sokkal érzékenyebbé vált a DNS hibák *SOS*-rendszeren keresztül történő kimutatására. Az *uvr*A mutációnak azonban van egy negatív következménye is, ami a tesztmikroba fokozott fény és UV érzékenységében nyilvánul meg. Emiatt a PQ37 törzset különösen óvatosan kell kezelni, fénytől elzárva kell a kísérletet folytatni. A másik mutáns gén az *rfa*, amely a baktériumsejt lipopoliszacharid részére hat és növeli a sejtmembrán áteresztő képességét (QUILLARDET ET AL., 1982; LEGAULT ET AL., 1994).

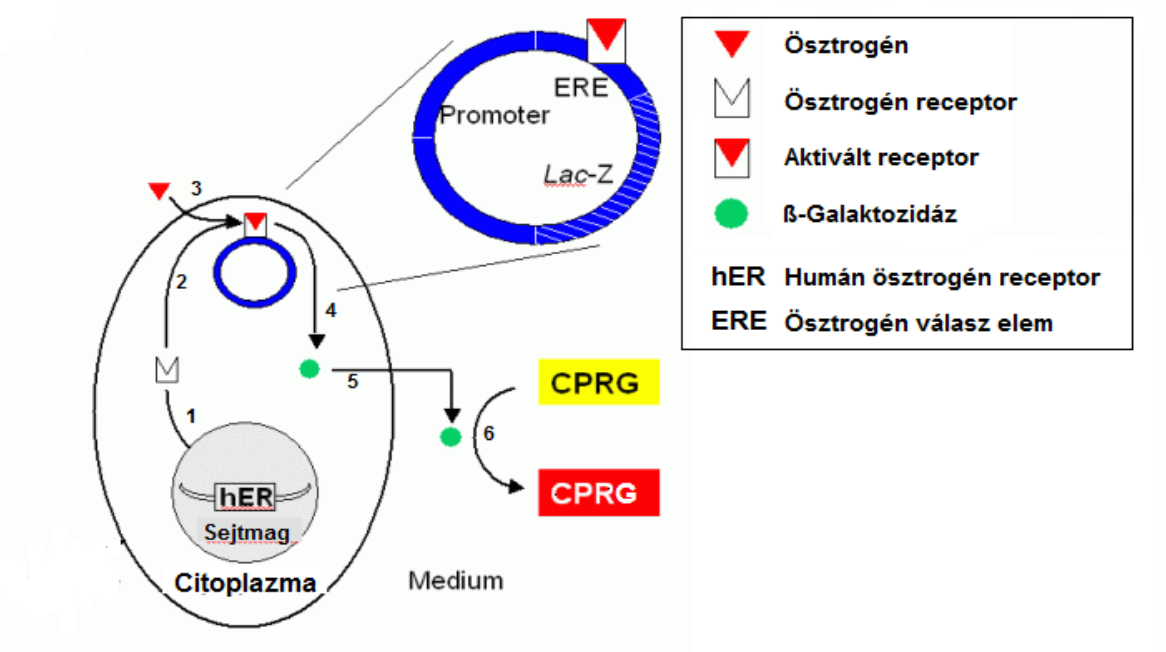


2.7. sz. ábra: Az *SOS*-Chromo teszt működésének sematikus rajza (QUILLARDET ET AL., 1985 alapján)

A teszt alkalmas a genotoxikus, és DNS károsító anyagok környezeti mintákban, talajban, levegőben, vegyületekben, élelmiszer összetevőkben, kozmetikumokban, vagy biológiai folyadékokban való kimutatására (LEGAULT ET AL., 1994). Szakirodalmi adatok alapján a teszttel kimutatható az AFB1 mutagén hatása (QUILLARDET ET AL., 1985; QUILLARDET & HOFNUNG, 1985 AUFFRAY ET AL., 1984), illetve nagyban korrelál (60–100%) a széles körben alkalmazott Ames teszttel (AUFFRAY ET AL., 1984; MAMBER ET AL., 1986; BRAMS ET AL., 1987; EDER ET AL., 1989; VON DER HUDE ET AL., 1988; XU & SCHURR, 1990).

YES teszt – hormonhatás mérése

Széles körben alkalmazott módszer a YES (Yeast Estrogen Screen) teszt, mely kiválóan alkalmas különböző anyagok ösztrogénhatásának kimutatására. A *Saccharomyces cerevisiae* élesztő DNS-ébe egy humán ösztrogén receptort integráltak, illetve a sejt plazmidon kódolt ösztrogén válasz elemeket tartalmaz, mely szabályozza a *lac*Z gén átíródásának folyamatát. A receptor és az ösztrogén válasz elem kapcsolódását követően a *lac*Z gén expressziója elindulhat. Annak érdekében, hogy a receptorok aktivitása mérhetővé váljon, szükség van egy szubsztrát, a vörös színű klorofenol- *β*-D-galaktopiranozid (CPRG) hozzáadásra, melyet a képződő *β*-galaktozidáz fog hidrolizálni. Ez a sárgából vörösbe váltó kolorimetriás reakció mérhető fotometriásan, 540 nm-en (2.8. sz. ábra). A reakció 3-5 napos inkubáció alatt zajlik le, illetve a folyamatot bonyolítja az említett szubsztrát hozzáadása is (ROUTLEDGE & SUMPTER, 1995).



2.8. sz. ábra: A YES-teszt működési sematikus rajza (ROUTLEDGE & SUMPTER, 1995)

A módszer Routledge és Sumpter (1995) leírása alapján a YES teszt megbízható válaszreakciót ad 17-ß ösztradiolra 0,3072–0,0000015 µg/ml között, és az intenzív *β*-galaktozidáz termelődés 0,000003 µg/ml koncentrációtól tapasztalható. Schwartz és munkatársai (2010) a 17-ß ösztradiol mellett, amelynek 50%-os hatásos koncentráció értékét (EC_{50}) 0,002 µg/ml-ben határozták meg, a zearalenont is vizsgálták, amely EC_{50} értékét 0,5 µg/ml koncentrációban adták meg.

2.5.3.2 Biolumineszcencia mérésen alapuló tesztek

A biolumineszcencia élő szervezetek általi fénykibocsátás, melyet enzimek katalizálnak. Fénykibocsátásra képes élő szerveztek többek között a baktériumok, gombák, halak, algák, rovarok, stb. (MEIGHEN, 1993).

A folyamatot a luciferáz enzim katalizálja, a felhasznált szubsztrát pedig a luciferin. A biolumineszcenciához szükséges továbbá egy hosszú szénláncú alifás aldehid és flavin-mononukleotid (FMN), valamint az oxigén, illetve a folyamatban az elsődleges elektron donor a NADH. A fénykibocsátást a lumineszcencia rendszer vezérli, melynek meghatározó *lux* génjeit izolálták például *Vibrio sp.* és *Photobacterium sp.*, valamint a szárazföldi *Xenorhabdu*-fajokból. A biolumineszcens baktériumok a *lux*CDABE operont tartalmazzák, mely egy heterodimer luciferáz enzimet (*lux*AB), valamint annak szubsztrátját, egy hosszú szénláncú zsíraldehidet előállító enzimkomplexet (*lux*CDE) kódol. A luciferáz a zsíraldehidet és a redukált flavin-mononukleotidot ($FMNH_2$) oxidálja, mely reakció során az energia

kékeszöld, 490 nm körüli hullámhosszú fény formájában szabadul fel, az alábbi egyenlet alapján.

$$FMNH_2 + O_2 \rightarrow FMN + RCOOH + H_2O + \text{fény}$$

A luciferáz és a szubsztrátok keveredése gyorsan zajlik le. Ezt követően az enzim keresztülmegy egy körfolyamaton, mely alatt a fénykibocsátás eléri a maximumát. Ha a $FMNH_2$ ellátása a sejtben folyamatos, akkor a fény állandó szinten marad. A bakteriális lux kazetta (*lux*CDABE) által indított fénykibocsátáshoz nincs szükség külső szubsztrátra, így viszonylag gyors reakcióról beszélhetünk.

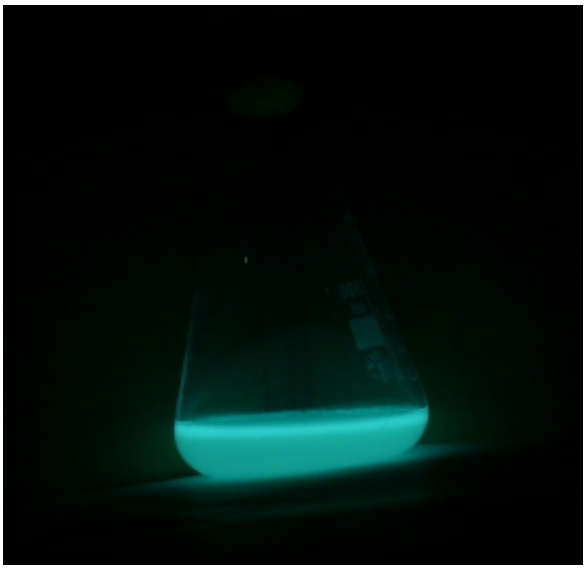
A biolumineszcencia szoros kapcsolatban áll a sejt életképességével, metabolikus állapotával. Ennek köszönhetően egy szennyezőanyaggal kapcsoltba kerülve, a sejten beüli változásokra utalva következik be a fénykibocsátás; így tehát az említett szervezetekből izolált *lux* gének alkalmazásával vizsgált biolumineszcencia egy gyors, megbízható és érzékeny indikátora lehet különféle szennyezőanyagoknak (MEIGHEN, 1993).

***Aliivibrio fischeri* – citotoxicitás mérése**

Az *Aliivibrio fischeri* taxonómiai besorolása (URBANCZYK, 2007)

- Divízió: Gracilicutes (Gram-negatív baktériumok)
- Osztály: Scotobacteria
- Család: Vibrionaceae
- Nemzetség: Aliivibrio

Az *Aliivibrio fischeri* (korábbi nevén *Vibrio fischeri*) egy fakultatív anaerob, pálcika alakú baktérium, amely poláris ostorok segítségével mozog. A mérsékelt és a szubtrópusi tengerekben található meg, leggyakrabban Hawaii sekély vizeiben élő *Eupryma scolopes* mélytengeri polip szimbiontájaként. Tengeri baktérium lévén halofil, szaporodása és fénykibocsátása egyaránt befolyásolt a sókoncentrációtól, ami 2% mellett ideális.



2.2. sz. kép: Az *A. fischeri* világító tesztszervezet (forrás: a szerző saját felvétele, 2011)

A baktériumnak a fentebb említett folyamatoknak köszönhető fénykibocsátó tulajdonságát (2.2. sz. kép) használjuk fel a környezetvédelmi gyakorlatban vízminták toxicitásának megállapítására; toxikus közegben ugyanis enzimgátlás következik be. Ez a gátlási mechanizmus arányos a szennyezettség mértékével, és fotométerrel mérhető. A teszt kivitelezését az ISO/EN/DIN 11348 nemzetközi szabvány is leírja. Az *A. fischeri* biolumineszcencia gátláson alapuló vizsgálatoknak az akut teszten kívül krónikus változatát is kifejlesztették, így lehetőség nyílik olyan toxikus szennyezők vizsgálatára is, amelyek hatóideje hosszabb (KOVÁTS ET AL., 2005). A teszt számos szerves szennyező toxikus hatásának kimutatására alkalmas. A nehézfémekre mutatott érzékenységével kapcsolatban a szakirodalmi adatok eltérőek. Egyesek szerint a teszt kevésbé érzékeny fémekre (VAAJASAARI ET AL., 1998), más szerzők viszont kimutatatták a nehézfémekre mutatott érzékenységét is (WONG ET AL., 1997), valamint korrelációt találtak a fényintenzitás gátlás és a toxikus fémek (As, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) koncentrációi között (KOVÁTS ET AL., 2005). A Szent István Egyetem, Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszékén 2005-ben végzett vizsgálatok is azt támasztják alá, hogy az *A. fischeri* baktérium viszonylag érzékeny tesztszervezet a rézzel és nikkellel kapcsolatban, bár más, a talajéletben meghatározó szerepet betöltő organizmusokhoz képest kisebb érzékenységet mutattak (NAGY, 2005).

A legújabb vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a tesztszervezet alkalmas lehet a mikotoxinok vizsgálatára is. Az akut biolumineszcencia-vizsgálatot, amely a toxinokra kevéssé érzékeny (2.8 sz. táblázat) egy lengyel kutatócsoport adaptálta mikotoxinokra, kutatásaik során az AFB1-et 10 µg/ml és DON-t 20 µg/ml koncentrációban vizsgálták. Eredményeik alapján a tesztszervezet lumineszcenciája az első hat órában drasztikusan csökkent, mind a mikotoxinokat, mind a hígító oldatot tartalmazó kontrollban. Az AFB1 hatására a lumineszcencia nem emelkedett, sőt a kontrollhoz viszonyított teljes gátlás volt tapasztalható a 10. és a 15. órában. A 10. órára a DON hatására a tesztszervezet lumineszcenciája meghaladta a kontroll értékét. A DON-nal végzett vizsgálatokban a kontrollhoz viszonyított 200%-os lumineszcencia intenzitás is tapasztalható volt (SARTER ET AL., 2008). Hasonló hormézis hatást már korábban is tapasztaltak bakteriális biolumeneszcencia mérésnél, abban az esetben, ha a mikroorganizmust stressz hatás éri, amely DNS károsodást okoz. Weiser és munkatársai (1981) kimutatták, hogy a DNS-sel reakcióba lépő bizonyos vegyületek a *Photobacterium leiognathi* nem-lumineszkáló mutáns törzsét stabil lumineszkáló sejtté változtatták. Czyz és munkatársai (2002) pedig az *A. ficheri* biolumineszcencia intenzitását mutatták ki négy órával azután, hogy mutagén anyaggal reagáltatták, magasabb koncentrációban viszont ezek az anyagok gátolták az *A. fischeri* tesztszervezet életműködését.

2.8. sz táblázat: Az ISO 11348 szabvány szerint végzett vizsgálatok eredményei egyes mikotoxinokra a TerraTox adatbázis (2007) alapján

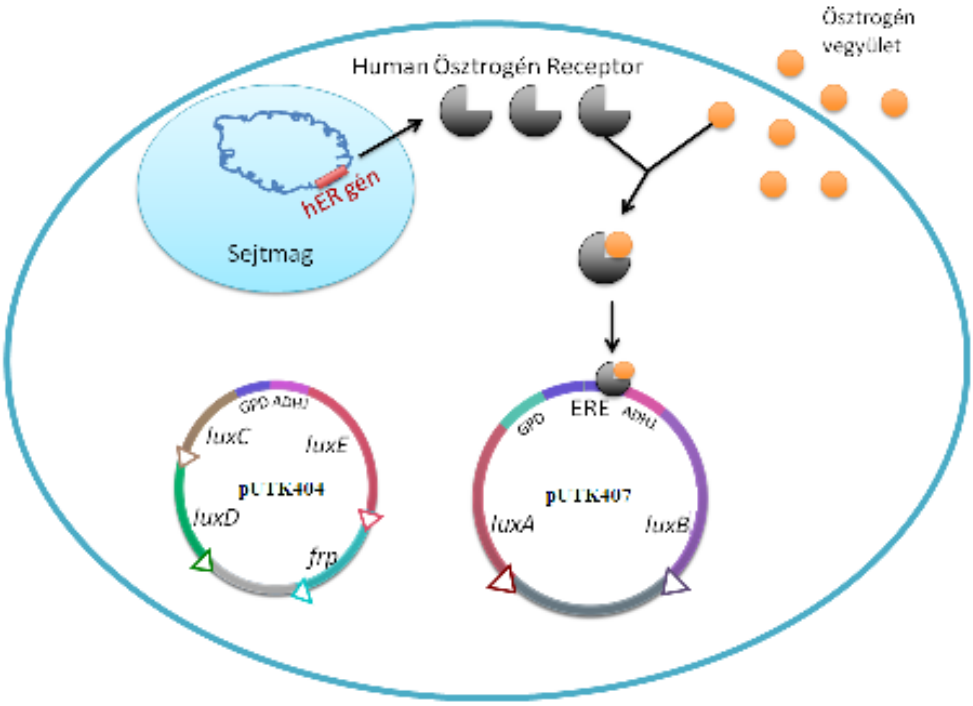
Toxin	Koncentráció (µg/ml)		
	5 perces kontaktidő	15 perces kontaktidő	30 perces kontaktidő
AFB1	22,0	23,3	n.a.
AFB2	55,0	59,9	62,7
AFG1	41,5	39,0	35,6
AFG2	68,7	74,0	69,5
OTA	18,5	16,2	16,3
T-2	150,0	143,0	173,0

Jelmagyarázat
n.a.: nincs adat

Élesztő alapú bioriporter rendszer – hormonhatáshatás mérése

A módszer a *Saccharomyces cerevisiae* nevű élesztőtörzs genetikailag módosított változatát használja tesztszervezetként a hormonhatású anyagok kimutatására (hasonlóan a YES teszthez), ami eredeti állapotban nem képes biolumineszcenciára, de a *lux* génkazetta sejtbe integrálásával létrehozták a biolumineszcencia alapú BLYES (Bioluminescent Yeast Esrtogen Screen) tesztet (Tennessee University, Knoxville, Tennessee, USA). A BLYES teszt esetében a humán ösztrogén receptor génjét (*hER*-α) integrálták a genomba. Emellett a folyamatban két plazmid játszik szerepet, a pUTK407 és a pUTK404, amelyek tartalmazzák a *Photorhabdus luminescens* nevű mikrobából izolált *lux* géneket és a *Vibrio harveyi* baktériumból kinyert *frp* gént, ami a FMN redukcióért felelős. A pUTK404 plazmid egyszerre expresszálja a *lux*A és *lux*B géneket; ezzel együtt a másik plazmid (pUTK404) tartalmazza az aldehid szintézisért felelős *lux*C, -D, -E és a FMN redukcióért felelős *frp* géneket (GUPTA ET AL., 2003).

Mindkét plazmidon divergens (szétágazó) promóterek (GDP és ADH1) találhatóak, így az átírás egyszerre kétirányú folyamatban játszódik le. A pUTK407 promóterei közé beillesztettek tandem (egymás után ismétlődő) ösztrogén válasz elemeket, amelyek elindítják a plazmid átíródását, és egyszerre expresszálják a *lux*A és *lux*B géneket. Ezzel együtt a másik plazmidra (pUTK404) egy közbenső riboszóma belépési hely (IRES) lett integrálva, amely az eukarióta szervezeteken az összetett gének átíródásához szükséges. Így lehetséges a plazmidon a *lux*C, -D, valamint a *lux*E és az *frp* gének együttes átírása (2.9. sz. ábra).



2.9. sz. ábra: A BLYES-teszt sematikus ábrája (SANSEVERINO ET AL., 2005 alapján)

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).

A BLYES teszt esetében a 17-β ösztradiol kimutatható $1{,}36*10^{-9}$–$6{,}81*10^{-12}$ µg/ml között, illetve az 50%-os lumineszcencia intenzitást okozó koncentráció (EC_{50}) $1{,}72\pm0{,}65*10^{-10}$ µg/ml. A ZEA esetében az EC_{50} érték 0,60 µg/ml. Összehasonlításként, a korábban széleskörben alkalmazott DDT nevű növényvédőszer EC_{20} érték 118,46 µg/ml, míg bomlástermékének EC_{50} értéke 14,19 µg/ml. A napjainkban sokat vitatott és a mindennapi életünk részét képező ftalátok közül a benzil-butil ftalát EC_{50} értéke 14,6 µg/ml. Szintén a műanyagokból kioldódó számos egészségügyi problémát okozó biszfenol-A EC_{20} értékét 142 µg/ml koncentrációban állapították meg, míg a nonilfenol EC_{50} értéke 0,0361 µg/ml (SANSEVERINO ET AL.,2009).

A BLYR teszt esetében 20%-os lumineszcencia gátlási értéket (IC_{20}) határoztak meg. Ilyen lumineszcencia gátlás a 17-β ösztradiol, a DDT és DDE, benzil-butil ftalát, biszfenol-A esetében nem jelentkezett, viszont a ZEA esetében 0,56 µg/ml, nonilfenol esetében 211 µg/ml (SANSEVERINO ET AL.,2009).

2.6 Mikotoxinok detoxifikációja

A mikotoxinokat detoxifikáló illetve degradáló ágensek számos gyakorlati felhasználása a gazdasági állatoknál indirekt módon a humán egészségvédelem egyik eszköze is lehet, ugyanis az ily módon mentesített állati termékek az emberi szervezetbe jutva már nem okoznak semmilyen káros hatást (BOUDERGUE, 2009).

Léteznek olyan takarmányadalékok, melyek a takarmányok mikotoxin-mentesítésére szolgálnak. Ezek olyan anyagok, amelyek csökkentik a mikotoxin szennyezést a takarmányokban azáltal, hogy gátolják azok felszívódását, segítik kiválasztódásukat vagy megváltoztatják azok működését. Ezeket nevezzük mikotoxin detoxifikáló anyagoknak. Működési elvük eltérő. A lehetséges detoxifikáló módszerek a következők (BOUDERGUE, 2009):

- **Adszorbensek**: Olyan nagy molekulasúlyú anyagokról van szó, melyek megkötődnek a mikotoxinok felületén, így csökkentik azok biológiai hozzáférhetőségét. Ez a folyamat anélkül játszódik le, hogy az állat bélrendszerét károsítaná, és az ürülékkel távoznak. Lehetnek szilikon alapú szervetlen vagy szén-alapú szerves polimerek, tejsav baktérium vagy akár élesztő sejtfal.
- **Fizikai módszerek**: A gabonaszemek mikotoxin-tartalma jelentősen csökkenthető mechanikai szeparáció, sűrűség szerinti különválasztás, szín szerinti osztályozás révén. Egyszerű átmosási eljárások (vízzel vagy Na-karbonát oldattal) csökkentik a deoxinivalenol, zearalenon és fumonizin koncentrációját gabonában. Ezen kívül alkalmaznak még hőkezelést (fumonizin B1) 150-200ºC-on és mikrohullámú kezelést (trichotecének). Továbbá gamma-sugárzással sikeresen kontrollálták a takarmány ochratoxin-szintjét (REFAI ET AL., 1996).
- **Kémiai módszerek**: Számos vegyületet (pl. kálcium-hidroxid-monometilamin, nátrium-biszulfit, ózon, klórgáz, hidrogénperoxid, aszkorbinsav, hidroklórsav, kén-dioxid, formaldehid, ammónia és ammónium-hidroxid) hatásosnak találtak több mikotoxinnal szemben (deoxinivalenol, zearalenon, T-2 toxin, aflatoxin és a fumonizin). Az aflatoxinnal szennyezett takarmány detoxifikálására a legelfogadottabb módszer az ammonizálás, amit az USA-ban, Franciaországban, Nagy-Britanniában és Afrikában sikeresen alkalmaznak is. Az Európai Közösségben nem engedélyezik a kémiai kezelést olyan árucikkek setében, melyeket emberi fogyasztásra szánnak. A vegyszerek a következő csoportokba sorolhatók: savak, bázisok (ammónia, nátrium-hidroxid), oxidáló reagensek (hidrogénperoxid, ózon), redukáló ágensek (biszulfid, cukrok), klórozó ágensek (klór), sók és kevert reagensek

(formaldehid). A kémiai módszereket gyakran kombinálják a fizikai módszerekkel, hogy tovább emeljék a dekontamináció hatékonyságát (VARGA–TÓTH, 2005).

- **Biológiai módszerek**: ezek során a mikotoxinok lebomlanak vagy átalakulnak egy nem vagy kevésbé toxikus metabolittá. Az aktív ágensek lehetnek baktériumok, gombák vagy különböző enzimek is (Az ismert biotranszformációs eljárások áttekintését a 2. melléklet tartalmazza).

2.6.1 Biodegradáció

A biodegradáció kifejezés tágabb értelemben magába foglalja a mikroorganizmusok által végzett biológiai-biokémiai folyamatok sorozatán keresztül megvalósuló lebontási (katabolitikus), illetve átalakítási (transzformációs) folyamatok összességét (SZOBOSZLAY, 2003).

A biodegradációs folyamatokat két csoportra oszthatjuk. Megkülönböztetünk teljes illetve részleges lebontást. Az első esetben a kiindulási szerves vegyületek szén-dioxidra és vízre oxidálódnak biomassza keletkezése mellett, ekkor mineralizációról beszélünk. A részleges biodegradáció esetében előfordulhat, hogy (i) hiányzik a degradációhoz nélkülözhetetlen valamely enzim, ezért a folyamat megreked egy közti terméknél, a képződött energiát a mikroorganizmusok hasznosítják; (ii) a kiindulási vegyület részlegesen módosul, de a mikrobák nem hasznosítják a felszabaduló energiát (kometabolizmus); (iii) harmadik esetben a kiindulási vegyületek átalakulnak, és komplexebb, stabilabb vegyületek keletkeznek (SZOBOSZLAY ET AL., 2002).

2.6.1.1 Aflatoxin-B1 és zearalenon biodegradációja

Ahogy azt bemutattuk, a mikotoxinok általában aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek. Azon mikrobák, amelyek aromásgyűrű-bontó képességgel rendelkeznek, nagy valószínűséggel hatékonyan képesek bontani a mikotoxinokat. A szakirodalom alapján ismert AFB1 és ZEA bontó mikroorganizmusokat a 2.9. sz. táblázat tartalmazza.

2.9. sz. táblázat: Az aflatoxin és zearalenon bontására képes mikroorganizmusok összefoglalása

Toxin	Mikroorganizmus	Forrás
AFB1	*Nocardia corynebacteroides (Flacobacterium aurantiacum)*	CIEGLER, 1966 HAO & BRACKET, 1988
	Mycobacterium fluoranthenivorans	HORMISCH, 2004
	Corynebacterium rubrum	MANN, 1977 SHIH, 1975
	Rhodococcus erythropolis	TENIOLA ET AL., 2005
	Aspergillus parasiticus	WU ET AL., 2009
ZEA	*Rhizopus sp.*	KAMIMURA, 1986
	Gliocladium roseum (syn. *Clonostachys rosea*)	EL-SHARKAWY & ABUL-HAJJ 1988A
	Absidia coerulea *Absidia spinosa* *Aspergillus niger* *Fusarium oxisporum, F. avenaceum* *Mucor bainieri* *Penicillum stipitatum* *Streptomyces griseus, S. rutgersensus, S. rimosus*	EL-SHARKAWY & ABUL-HAJJ, 1988B
	Rhizopus arrhizus	EL-SHARKAWY & ABUL-HAJJ, 1991
	Fusarium sp.	PLASENCIA & MIROCHA, 1991 BERTHILLER ET AL., 2009
	Clonostachys rosea	TAKAHASHI-ANDO ET AL., 2002
	*Clonostachys rosea zdh*101 génje transzformálva • *E. coli* baktériumba • *Saccharomyces cerevisiae* élesztőbe • rizsbe	TAKAHASHI-ANDO ET AL., 2004
	Trichosporon mycotoxinivorans	MOLNAR ET AL., 2004 VEKIRU ET AL., 2010
	Kevert baktériumtenyészet	MEGHARAJ ET AL., 1997 MORTENSEN ET AL., 2006 YUKSEL ET AL., 2005
	Rhizopus stolonifer, R. oryzae, R. microsporus	VARGA ET AL., 2005
	Pseudomonas putida ZEA-1	ALTALHI, 2007 ALTALHI &EL-DEEB, 2009
	Acinetobacter sp. SM04	YU ET AL., 2011

A fuzárium penészek által termelt mikotoxinok szerkezeti képlete tartalmaz egy úgynevezett 12,13-epoxid csoportot, amely a toxikusságért felelős, illetve az AFB1 oxidációs útvonalon történő átalakulása során 8-9-epoxid csoportot tartalmazó vegyület képződik, amely képes a DNS-hez kötődni. Az epoxid redukciója jól ismert folyamat, amelyet a kérődző állatok bendőjében élő mikrobiális epoxidáz enzimek bontanak. Napjainkban már több hasonló képességgel bíró baktériumot ismerünk; pl. az *Eubacterium*-fajok is képesek hasonló epoxidáz enzimek szintézisére, melyet baromfiban a T-2 toxin esetében be is bizonyították (MÉZES ET AL., 2010).

Az AFB1 mikotoxint illetően napjainkig az aktinomicéták körében volt bizonyított a degradációs képesség. Szakirodalmi források beszámoltak a *Nocardia corynebacteroides* (CIEGLER, 1966), a *Mycobacterium fluoranthenivorans* (HORMISCH, 2004) és a *Corynebacterium rubrum* (MANN, 1977; SHIH, 1975), aflatoxin-bontó képességéről. Teniola (2005) részletesen foglalkozott annak tanulmányozásával, hogy az AFB1 degradáció egyben a mutagén hatás megszűnésével jár-e. Kísérleteiben a *Rhodococcus erythropolis* sejtkivonatával

kezelt 1 μg/ml AFB1-et. Kromatográfiás vizsgálatokkal nem volt kimutatható az AFB1 bomlási termékeinek kialakulása, amely arra enged következtetni, hogy az AFB1 kémiai tulajdonságaitól teljesen eltérő termékek keletkeztek, valamint Ames teszttel történt vizsgálat után bebizonyosodott, hogy a biodegradáció a mutagenitási potenciál megszűnésével is járt.

A ZEA biodegradációjára képes gombákról számos szakirodalom ír. Kamimura (1986) a *Rhizophus sp.* ZEA-bontó tulajdonságát írta le, majd El Sharkawy és Abul-Hajj (1988) írták le a ZEA eredményes bontását, melynek során a *Gliocladium roseum* nevű gombafaj bontotta a toxin gyűrűs rendszerét. Kisebb mértékű bontást tapasztalt a szerzőpáros a *Streptomyces griseus, S. rutgersensus, Rhizopus arrhizus* törzs esetében, amely mikroorganizmusok 18, 25, 40%-át képesek voltak a toxinnak α-zearalenonná alakítani (EL-SHARKAWY & ABUL-HAJJ, 1988B). Takahashi-Ando és munkatársai (2004) a ZEA mennyiségének csökkentése érdekében *Clonostachys rosea* gombából izolálták a ZEA detoxifikációjáért felelős laktonohidroláz enzim génjét, a *zhd*101-et, amelyet *E. coli* és *S. cerevisiae* mikroorganimusokba transzformáltak, így előállítva ZEA bontásra képes genetikailag módosított szervezeteket; ezen kívül a *zhd*101 gént GM rizsbe ültetve is értékelték a ZEA-detoxifikció hatékonyságát. Az *E. coli* által végzett degradáció hatékonynak bizonyult, míg a *S. cerevisiae* kisebb aktivitást mutatott. A GM rizzsel beállított kísérletek során is jelentős toxinmennyiség csökkenést mutattak ki (TAKAHASHI-ANDO ET AL., 2004). További mikroorganizmusról is bizonyított ZEA-bontó képessége. A *Trichosporon mycotoxinivorans* élesztőgombafaj leírása után bizonyították annak ZEA- és ochratoxin-bontó képességét is, valamint, hogy a biodegradációs végtermék már nem rendelkezett ösztrogén hatással (MOLNAR ET AL., 2004; VEKIRU ET AL., 2010). A prokarióták ZEA bontó képességéről már kevesebb szakirodalmi adat létezik. 2007-ben egy *Pseudomas putida* ZEA-1 jelzésű törzséről írták le, hogy képes a zearalenont egyedüli szénforrásként hasznosítani, illetve *Artemia salina* tesztszervezettel vizsgálták a maradék toxikus hatást. További vizsgálatokban azonosították a ZEA bontásért felelős plazmidon kódolt géneket.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 A mikotoxinok biológiai hatáselemzésre alkalmazott tesztek

A kísérletekhez az AFB1 és ZEA toxint a Fermentec Ltd-től (Izrael) szereztük be és acetonban oldottuk. Törzsoldatot készítettünk 1000 µg/ml-es koncentrációban, amelyet a különböző vizsgálati irányokhoz megfelelő koncentrációban adagoltam a kísérleti rendszerekhez.

3.1.1 *SOS*-Chromo genotoxicitás teszt

Az *SOS*-Chromo tesztet Quillardet és munkatársai 1982-ben fejlesztették ki egy egyszerű kolorimetriás vizsgálatként a genotoxikus anyagok detektálására. A teszt eredetileg kémcsőben kivitelezhető módszer, amelynek gyártói kiszerelésben kapható verzióját 1984-ben az Orgenics (Yavne, Israel) fejlesztette ki és jelenleg az EBPI (Envintonmental Bio-detection Product Inc., Kanada) forgalmazza.

Ahogy azt az irodalmi áttekintésben bemutttam 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 traszkripciója 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 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 enzim 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).

Adott vegyület dózis-hatás (IF) függvényében a lineáris rész meredekségéből állapítjuk meg az indukciós potenciált (SOSIP). Az eredmények standardizálásához egy korrekciós faktort alkalmazunk, mely során a tesztben 4-nitro-quinoline-oxid (továbbiakban 4NQO) -ra meghatározott SOSIP értéket hasonlítjuk a szakirodalomban publikált SOSIP=71 értékhez (QUILLARDET ET AL., 1982)

Az *SOS*-Chromo tesztben lehetőség van a genotoxinok metabolikus aktiválással történő vizsgálatára is, S-9 mix alkalmazásával, amely mutagén kezeléssel (Aroclor 1254) provokált patkánymáj-enzimkivonatot tartalmaz (Sprague Dawley® Rat). A metabolikus aktiválás beiktatása a kísérletbe, az emlősök szervezetében végbemenő metabolikus folyamatok modelljeként szolgál.

A teszt kivitelezése a gyártó útmutatásai szerint történt. A kontrollok és minták 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 ellenőrizzük az abszorbanciát 405 és 620 nm-en.

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; EBPI, 2008). Mindezek mellett alkalmazunk egy hígító oldatot tartalmazó negatív kontrollt és egy mikrobamentes vakot is.

Az előkíséreltek során a toxinokat 1:2-es hígítási sorban vizsgáltunk, azaz AFB1-et 10–0,078 µg/ml, a ZEA-t 10–1,25 µg/ml koncentrációban. A kísérlet során a toxinokat metabolikus aktiválás nélkül és metabolikus aktiválással is vizsgáltuk.

Az AFB1 biológiai lebontásának vizsgálata céljából az *SOS*-Chromo tesztet adaptáltam toxinbontási kísérletekhez. Ennek során az *SOS*-Chromo teszt kivitelezése a fentiekben leírt módon történt, azzal a különbséggel, hogy a biodegradációs kísérletben szereplő mikrobamentes vak minták, az *SOS*-Chromo teszt esetében, mint pozitív genotoxikus kontroll szerepeltek. A biodegradációs kísérlet rendszereinek mintáit, a kontroll mintáit és a vakot 10 µl térfogatban adtam a mikrotiter-lemez megfelelő üregeibe és vizsgáltam *SOS*-Chromo teszttel, illetve hasonlítottam össze a párhuzamos műszeres és immunanalitikai tesztekkel.

3.1.2 *Aliivibrio fischeri* citotoxicitás teszt

A kísérlethez szükséges *Aliivibrio fischeri* (DSM-7151, NRLLB-11177) baktériumot a Mikroorganizmusok és Sejtkultúrák Német Nemzeti Gyűjteményéből (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) rendeltük. A liofilizált (fagyasztva szárított) baktériumot rehidratálás után Bacto Marine tápoldatban szaporítottuk és 4°C-on tartottuk fenn Bacto Marine ferde agaron.

Az ISO 11348 szabványsorozatnak megfelelő *A. fischeri* vizsgálat alkalmazható szennyvízre, vizes extraktumokra és csurgalékvizekre, édesvizekre (felszíni és talajvízre) vagy sós és enyhén sós vízre. A módszer elve az *A. fischeri* fénykibocsátás-gátlásának egyedi elegyvizsgálatban való meghatározása, amelyet a tesztminta és a tesztorganizmus szuszpenziónak küvettában való egyesítésével végzik. A teszt 5-15-30 perces választható érintkezési időt követően mért lumineszcencia-változás, egy korrekciós faktor figyelembe vételével, amely a kontroll minták expozíciós időn belüli intenzitásváltozásának a mértéke, és amivel a higítási sorok eredményeit is korrigálni kell. A minta által okozott gátlást azzal a hígítással fejezzük ki, amely a vak értékéhez képest 20% és 50% fénycsökkenést eredményez. Ezeket az értékeket interpoláljuk a hígítási sorozatokon belül. Ezzel ellentétben az AFB1 vizsgálata során Sarter és munkatársai (2008) által kidolgozott módszer alapján, hosszabb (25 órás) kontaktidőt alkalmaztak. A kísérlet végrehajtása során az *A. fischeri* tesztszervezetet Bacto Marine (BM) agarra (Difco 2216) szélesztett 24 órás tenyészetét oltották 50 ml BM oldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikba. A baktérim szuszpenziót „rázó vízfürdőben" inkubálták (25°C, 30 rpm), és a sejtsűrűséget 550 nm-en OD=0,1-re állították be. Az aflatoxint megfelelő koncentrációban adagolták a tesztszervezethez (1 mg/ml toxin-törzsoldatból 200 µl), illetve a kontroll mintákhoz hasonló térfogatú oldószert (acetont) adagoltak. A minták fénykibocsátását a kezdő időpillanatban illetve 3,5-10-15-25 órás kontakidő után ellenőrizték. A kapott fénykibocsájtási értékekből kiszámították Froehner és mtsai (2002) alapján a toxinok által kifejtett gátlást:

$$\text{Gátlás (\%)}=\left[\left(\frac{Ktx-Mtx}{Ktx}\right)*100\right]$$

,ahol *Ktx*: párhuzamos kontrollok fénykibocsátásának átlagértéke x kontakidő után
Mtx: párhuzamos minták fénykibocsátásának átlagértéke x kontaktidőnél.

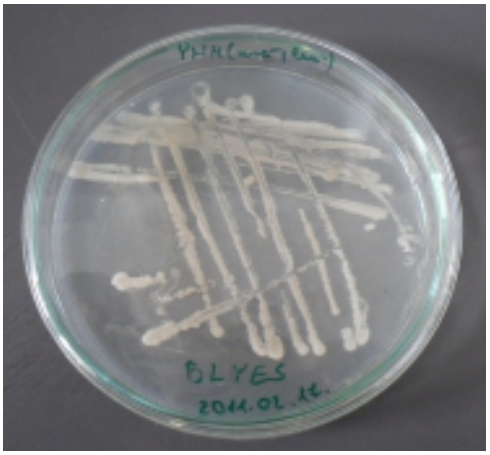
Ezt, a Sarter és munkatársai (2008) által kifejlesztett vizsgálatot továbbfejlesztettem mikrotiter-lemezen végezhető módszerré. Az alapkísérletek során a tesztszervezet érzékenységét kívántam megállapítani az AFB1, ZEA toxinokra. A vizsgálatokat 100 µl *A. fischeri* tesztkultúrával BM tápoldatban végeztem, amely sejtsűrűségét beállítottuk OD=0,1-

re. A mikotoxin-mentes kontroll minták tartalmazták a tesztszervezet folyékony kultúráját és a higító oldatnak használt acetont. A vizsgálatban résztvevő kontrollokat, az AFB1 (20-10-5-2-1 µg/ml) és ZEA, (20-15-10 µg/ml) minták mindegyikét három párhuzamos rendszerben vizsgáltuk 3,5-10-15-25 órás kontakidő után.

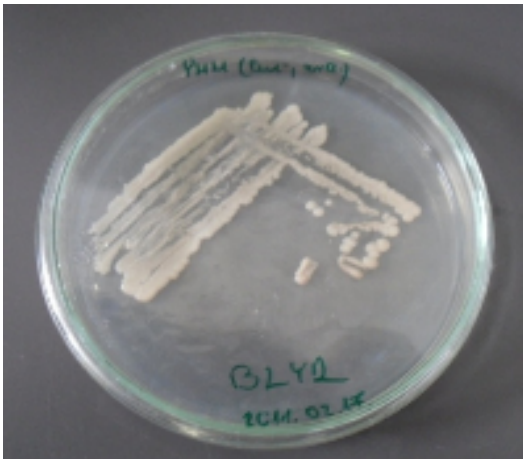
3.1.3 BLYES/BLYR hormonhatás elemző tesztreszdszer

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 rendelkezésemre.

Az élesztők szaporításához uracil és leucin szelektív tápoldatot ($YMM_{ura-,\ leu-}$) alkalmaztam, amelyet 5 további oldattal egészítettem ki: vitamin oldat (mely 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.



3.1. sz. kép: A BLYES törzs szelektív táptalajra szélesztve (forrás: a szerző felvétele, 2011)



3.2. sz. kép: A BLYR törzs szelektív táptalajra szélesztve (forrás: a szerző felvétele, 2011)

A BLYES (3.1 sz. kép) és BLYR (3.2. sz. kép) tesztszervezeteket 250 ml-es Erlenmeyer lombikban szaporítottam 30 ml tápoldatban, majd termosztátban inkubáltam (30°C, 200 rpm) 24 órán keresztül és sejtsűrűségét 600 nm-en (OD_{600}) 1-re állítottam be (SANSEVERINO ET AL., 2009). A vizsgálatokat fehér mikrotiter-lemezeken végeztem. Pozitív kontrollként 17-ß-ösztradiolt alkalmaztam, amely esetében a vizsgálati koncentráció Sanseverino és munkatársai (2009) leírását követve 2,7E-1 µg/ml (1E-06 mol/dm^3) volt és 6,8E-7 µg/ml (2,5E-12 mol/dm^3) végső koncentrációig jutottunk el. A ZEA esetében a vizsgált koncentráció 31,84 µg/ml- ről (1E-04 mol/dm^3) indult és 3,18E-05-re (2,5E-010 mol/dm^3) hígítottuk. Hígító oldatként metanolt használtam. Két negatív kontroll használata is

szükséges a vizsgálat során: a hígításhoz használt metanolt és a tesztszervezetet tartalmazó kontroll, valamint magát a tesztszervezetet tartalmazó kontroll.

A minták és kontrollok kiadagolása (20 µl/well) után a beállított 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.

Az eredmények értékelése során első lépésként kiszámítottam a negatív kontrollok százalékos arányát, hogy meggyőződjek értékeink hitelességéről. Ez az arány határozta meg azt, hogy a mérés során kapott eredmények hitelesek illetve elfogadhatóak-e. Amennyiben ez az érték meghaladja a 150%-ot, akkor a hígító oldat nagy valószínűség szerint tartalmaz valamilyen szervezetre ható anyagot, így a mérést meg kell ismételni.

A BLYES tesztszervezet értékelése során meghatároztam a pozitív kontroll EC_{50} értékét. A hormonhatás és citotoxicitás meghatározása során első lépésként felrajzoltam a mért értékekből kapott grafikonokat, melyek szabályos szigmoid alakot mutattak. Az S-görbe egyenes szakaszára lineárist illesztettem, melynek egyenlete alapján kaptam meg a minta fénykibocsátásának 50%-os emelkedését eredményező toxicitási értéket.

A BLYR esetében a tapasztalt hatást gátlási százalékban, IC_{20} értékkel fejeztük ki. Az IC (Inhibitory Concentration) azt a tesztminta-koncentrációt jelenti, amely a 20%-os inhibíciót vált ki.

A ZEA biológiai lebontásának vizsgálata céljából a BLYES/BLYR tesztet adaptáltam toxinbontási kísérletekhez. A vizsgálandó mintákból 1:2-es hígítási sort készítettem, majd 20 µl-t adagoltam a mikrotiter-lemez megfelelő részeibe. A vizsgálatok során pozitív kontrollként a bontási kísérletből (lásd 3.5 fejezet) származó pozitív kontroll (vak) oldatot 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 kontakidőnél

Mtx: párhuzamos minták fénykibocsátásának átlagértéke adott kontakidőnél

3.2 Hazai kukorica mintákból izolált *Aspargillus flavus* törzsek aflatoxin-B1 termelésének kimutatása *SOS*-Chromo-teszttel

3.2.1 A minták begyűjtése, tenyésztés, izolálás

Munkánk során Magyarország különböző régióiból származó a kukoricaminták penészgomba-fertőzöttségének felmérése céljából különböző termelőktől, illetve beszállítóktól származó, egymástól időben és térben elkülönítetten tárolt szállítási tételeket (Csuka Gabona Kft., Vác) vizsgáltunk. A tételek mintázása, a minták további kezelése a mikrobiológiai célú mintafeldolgozás szabályai szerint történtek. A szemekből közvetlenül kinőtt telepekből tiszta tenyészeteket készítettünk (Zt27, Zt66, Zt64, Zt55, Zt80) és az így nyert törzseket a Szent István Egyetem, Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék gyűjteményébe deponáltuk.

3.2.2 Aflatoxin-termelés vizsgálata

Előzetesen nyirkosra nedvesített, autoklávban sterilezett 100–100 g szemes kukoricát oltottunk be az egyes törzsek 1E+06 mennyiségű konídiumával és inkubáltuk 26°C-on 10 napig. Negatív kontrollként inokulummentes kukorica minta szolgált. A minták aflatoxin tartalmát száraz súlyra adtuk meg. A mintánként 25-25 g kukoricamintát alaposan átdaráltuk, majd összekevertük, hogy liszt finomságú homogén vizsgálati anyagot kapjunk. A 25 g darált mintához 5 g NaCl-ot, adtunk, majd 125 ml metilalkohol-desztillált víz 70:30 arányú elegyével 2 percig homogenizálóban extraháltuk. A toxin extrakcióját a bemérő lombikba átfejtett minták további kétórás, 30°C-os rázóinkubátorban történő rázatásával fejeztük be.

Az *A. flavus-szal* beszőtt kukoricaszem-tömeg aflatoxin tartalmának kimutatásra biológiai hatáselemzést végeztem *SOS*-Chromo teszttel, amely eredményeket ELISA, HPLC-FLD és HPLC-MS és módszerekkel vetettem össze.

3.3 A biodegradációs kísérletekben felhasznált mikroorganizmusok és tenyésztési körülmények

Vizsgálataim során az Agruniver Holding Kft. és a Szent István Egyetem Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék törzsgyűjteményében található baktérium törzseket használtam fel, amelyek előzetesen igazolt mikotoxin-bontó képességgel rendelkeznek, illetve nemzetközi törzsgyűjteményekből származó referencia törzseket vontam kísérletbe (3.1. sz. táblázat)

3.1. sz. táblázat: A bontási kísérletekbe vont mikroorganizmusok besorolása és származása

Faj	Törzs	Forrás
Rhodococcus ruber	N361	M Goodfellow
Rhodococcus globerulus	N58	M Goodfellow
Rhodococcus globerulus	AK36	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus rhodochrous	NI2	I. Nagy
Rhodococcus rhodochrous	ATCC 12674	E.R. Squibb & Sons, Inc.
Rhodococcus erythropolis	AK35	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus erythropolis	AK42	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus erythropolis	GD2A	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus erythropolis	GD2B	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus erythropolis	BRB1AB	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus erythropolis	NI1	I. Nagy
Rhodococcus pyrdinivorans	AK 37	Agruniver Holding Kft
Rhodococcus pyridinivorans	K402	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus pyridinivorans	K403C	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus pyridinivorans	K404	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus pyridinivorans	K405	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus pyridinivorans	K408	Agruniver Holding Kft.
Rhodococcus aetherivorans	AK44	Agruniver Holding Kft.
Streptomyces heliomycini	K2	Agruniver Holding Kft.
Streptomyces cavourensis	K14	Agruniver Holding Kft.
Chryseobacterium formosense	UA 58	Agruniver Holding Kft.
Chryseobacterium hydrocarbonovorans	TN4	Agruniver Holding Kft.
Gordonia paraffinivorans	NZS6	Agruniver Holding Kft.
Pseudomonas pseudoalcaligenes	FEH28	Agruniver Holding Kft.
Pseudomonas citronellolis	ZS1	Agruniver Holding Kft.
Pseudomonas azelaica	TN5	Agruniver Holding Kft.
Pseudomonas monteilii	ZV6	Agruniver Holding Kft.
Pseudomonas putida	DN1	Agruniver Holding Kft.
Pseudomonas stutzeri	KÖ5	Agruniver Holding Kft.
Microbacterium esteraromaticum	NZS9	Agruniver Holding Kft.
Microbacterium barkeri	EL1	Agruniver Holding Kft.
Pseudoxanthomonas suwonensis	NZS6	Agruniver Holding Kft.
Pseudoxanthomonas kalamensis	H4	Agruniver Holding Kft.
Arthrobacter protophormiae	J4	Agruniver Holding Kft.

A bontási kísérletre választott, -80°C-on tárolt törzseket LB agarra szélesztve inkubáltam (28ºC) 72 órán keresztül. A telepek tisztaságának ellenőrzése után 50 ml LB tápoldatot oltottam be egyetlen tiszta telepből származó inokulummal és rázattam (28ºC, 170 rpm) 72 órán keresztül. Az inokulumok sejtsűrűségét OD_{600}=0,6-ra állítottam be.

3.4 Az aflatoxin-B1 biológiai lebontásának vizsgálata

A biodegradációs kísérletek 50 ml Erlenmeyer lombikban (300 ml) folytak, 3 párhuzamos rendszer beállításával. A bontási kísérletek közege 2 µg/ml AFB1-et tartalmazó LB tápoldat (45 ml) volt, amelyet 5 ml inokulummal oltottam be. A bontás során alkalmaztam egy AFB1 bontásra nem alkalmas *E. coli* törzset, illetve egy mikrobamentes kontrollt (vak), amely szintén 2 µg/ml AFB1-vel kontaminált 50 ml LB tápoldatot tartalmazott.

A kísérleti rendszereket 3 napon keresztül inkubáltam (28ºC, 170 rpm), majd a párhuzamos bontási rendszereket mintáztam. A mintákat lecentrifugáltam (15000 rpm, 4ºC,

20 min.), a felülúszót dekantáltam és a pellettől külön tároltam -20ºC-on a további vizsgálatokig.

A felülúszó és a pellet mikotoxin tartalmát akkreditált kémiai analitikai laboratórium vizsgálta (Wessling Hungary Kft.) nagy teljesítményű folyadék kromatográfia módszerrel (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), illetve a Soft Flow Hungary Kft. ELISA módszerrel. A degradációs kísérlet felülúszó mintáit *SOS*-Chromo teszttel vizsgáltam a maradék genotoxicitás meghatározása céljából.

3.5 A zearalenon biológiai lebontásának vizsgálata

A biodegradációs kísérletek 50 ml Erlenmeyer lombikban (300 ml) folytak, 3 párhuzamos rendszer beállításával (3.3. sz. kép). Az 1 µg/ml ZEA-val kontaminált LB tápoldatot (45 ml) 5 ml inokulummal oltottam be. A kísérlet során alkalmaztam mikrobamentes kontrollt (vak), amely szintén 1 µg/ml ZEA-val kontaminált 50 ml LB tápoldatot tartalmazott.

3.3. sz. kép: Biodegradációs kísérlet rázatott tenyészetei (forrás: a szerző felvétele, 2011.)

A kísérleti rendszereket 7 napon keresztül inkubáltam (28ºC, 170 rpm), majd a párhuzamos bontási rendszereket 24 óránként mintáztam. A mintákat lecentrifugáltam (15000 rpm, 4ºC, 20 min.), a felülúszót dekantáltam és a pellettől külön tároltam -20ºC-on a további vizsgálatokig.

A felülúszót és pelletet akkreditált kémiai analitikai laboratórium vizsgálta (Wessling Hungary Kft.) nagy teljesítményű folyadék kromatográfia módszerrel (HPLC), illetve a Soft Flow Hungary Kft. ELISA módszerrel. A felülúszó mintáit pedig biológiai hatáselemzés alá

vontam, amely során két biolumineszcens élesztő alapú bioriporter tesztszervezetet, a BLYES (hormonhatást vizsgáló) és a BLYR (citotoxikus hatást vizsgáló) tesztorganizmust alkalmaztam.

A tesztszervezetek előkészítése a 3.1.3 fejezetben leírtaknak megfelelően történt. A vizsgálandó mintákból 1:2 hígítási sort készítettem, majd 20 µl-t adagoltam a mikrotiter-lemez megfelelő részeibe. A vizsgálatok során pozitív kontrollként a bontási kísérletből származó pozitív kontroll (vak) oldatot alkalmaztam, illetve a tesztet a 3.1.3. fejezetben ismertetett módon kiviteleztem.

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

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

,ahol *Ktx*: párhuzamos kontroll minták fénykibocsátásának átlagértéke adott kontakidőnél

Mtx: párhuzamos minták fénykibocsátásának átlagértéke adott kontakidőnél

3.6 Kémiai analitika

A kémiai analitikai méréseket a Wessling Hungary Kft. akkreditált laboratóriuma végezte. A vizsgálatok során az AFB1 toxinszennyezettséget standard etanol módszerrel állapították meg. Immunaffinitás oszlopos (VICAM-AflaTest) tisztítást és trifluor-ecetsavval történő származékképzést követően folyadékkromatográfiás elválasztás következett (AOAC 990.30). 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 toxinszennyezettséget standard etanol módszerrel állapították meg. Immunaffinitás oszlopos (VICAM-ZearalaTest) 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 274 nm (extinkció) és 440 nm (emisszió) hullámhosszon.

3.7 Immunanalitika

A toxinkoncentrációk meghatározása ELISA Kittel, Toxiwatch rendszerben történt (Soft Flow Hungary Kft.). A vizsgálatok a gyártó útmutatásai szerint folytak.

A toxin extrakciója 75%-os metanol oldattal történt. Mivel a metanol – elsősorban fehérjedenaturációs hatása miatt – befolyásolja az antigén-antitest kötődést, így a minták precíz mérése érdekében fontos, hogy mind a standard sor, mind a mérendő minták azonos mennyiségű metanolt tartalmazzanak, amely a ZEA esetében 7,4%, az AFB1 esetében 9,4%. A mérés során az ELISA-lemezt 250 µl WASH oldattal mosták. A megfelelő mintahígítást követően bemérték a standard sor elemeit és mintákat, majd bemérték a konjugátumot (CONJ), végül minden zsebbe 100-100 µl antitest oldatot pipettáztak. A mikrotiter-lemezt szobahőmérsékleten sötétben inkubálták (i). Az ELISA-lemezt 250 µl WASH oldattal mosták 5-ször, majd bemértek 150 µl TMB-szubsztrát (SUB) oldatot. A mikrotiter-lemezt szobahőmérsékleten sötétben inkubálták (ii), majd bemértek 50 µl STOP oldatot a reakció leállításához, majd 450 nm-en megmérték az OD értékeket. Végül a kalibrációs görbe alapján kiszámítják a minták toxinkoncentrációit.

3.2. sz. táblázat: Az ELISA Toxiwatch rendszer mérés paraméterei AFB1 és ZEA esetén

	AFB1	ZEA
Minta	75 µl/well	50 µl/well
Konjugátum	25 µl/well	50 µl/well
Inkubáció (i)	1 óra	15 perc
Inkubáció (ii)	15 perc	10 perc

3.8 Statisztikai módszerek

A biodegradációs kísérletek eredményei közötti kapcsolatrendszer vizsgálatát statisztikai módszerekkel végeztem. A statisztikai vizsgálatok mindegyikét a STATISTICA 7 (StatSoft Hungary Kft.), PAST (HAMMER ET AL., 2001), Microsoft EXCEL (Microsoft Inc.) és Toxicity Response Analysis and Testing (ToxRat Solutions GmbH.) szoftverek felhasználásával végeztem.

Statisztikai összefüggések

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 korrelálhatók. A korreláció maximális értéke +1, minimuma -1 lehet. A statisztikai értékelésnél **Pearson–féle korrelációs együtthatót** állapítottam meg, amely az összetartozó értékpárok lineáris kapcsolatát jellemzõ, dimenzió nélküli szám. 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) és a biológiai hatáselemzése (*SOS*-Chromo teszt, *A. fischeri* teszt, BLYES/BLYR teszt) eredményeivel végeztünk korrelációszámítást a Pearson-féle korreláció felhasználásával.

A **pontdiagram** segítségével két vagy három változó közötti grafikus összefüggés grafikus ábrázolását végezhetjük el és információt kaphatunk az összefüggés jellegéről és a kiugró értékekről is (YULE & KENDALL, 1950).

A ökotoxikológiában használatos statisztikai becslés

A toxikus végpontok becslésére a probit módszer terjedt el legszélesebb körben, amely az adatokat valószínűségi egységgé (probability unit) transzformálja.

Hatásos koncentráció érték (Effect Concentration): a minta azon koncentrációja, amely a mérési vagy vizsgálati végpont 10, 20, 50, 90 %-os csökkenését okozza. Ez az érték minél kisebb, adott minta annál toxikusabbnak minősül.

Káros hatást még nem mutató vegyi anyag koncentráció (No Observed Effect Concentration; NOEC): az a legnagyobb koncentráció, amelynek még nincs megfigyelhető hatása.

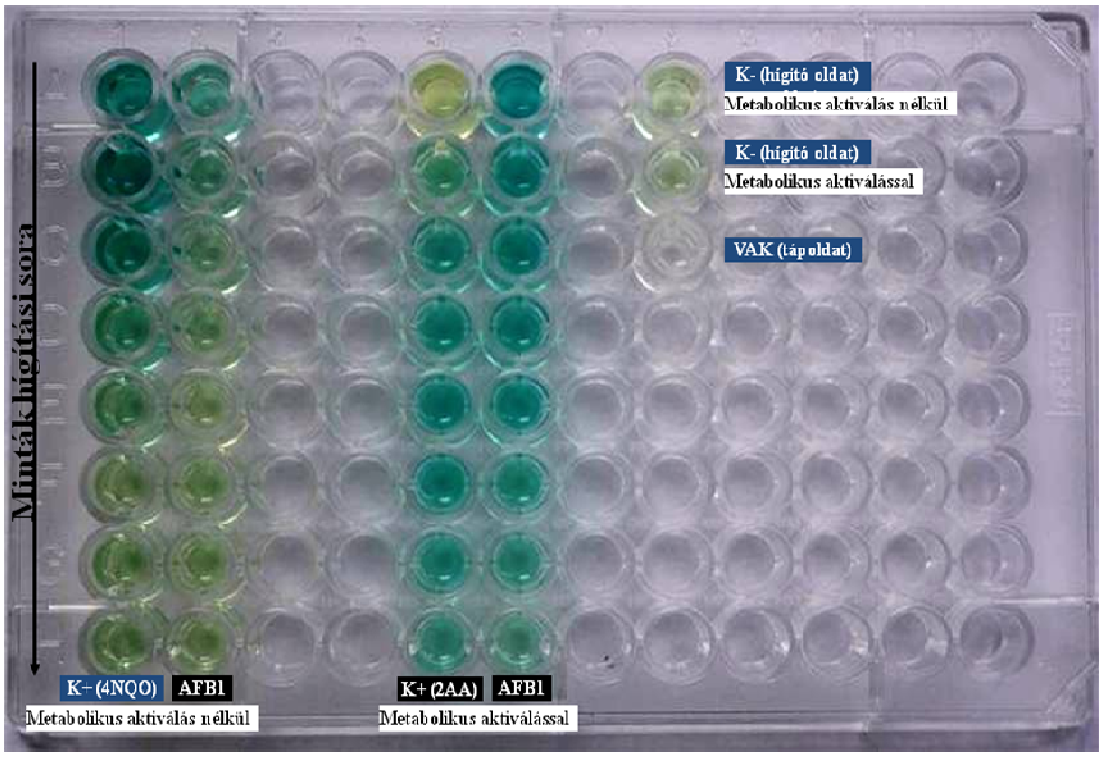
Káros hatást már mutató vegyi anyag koncentráció (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): az a legkisebb koncentráció, amelynek már van megfigyelhető hatása.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Az aflatoxin-B1 és a zearalenon biológiai-hatáselemzése

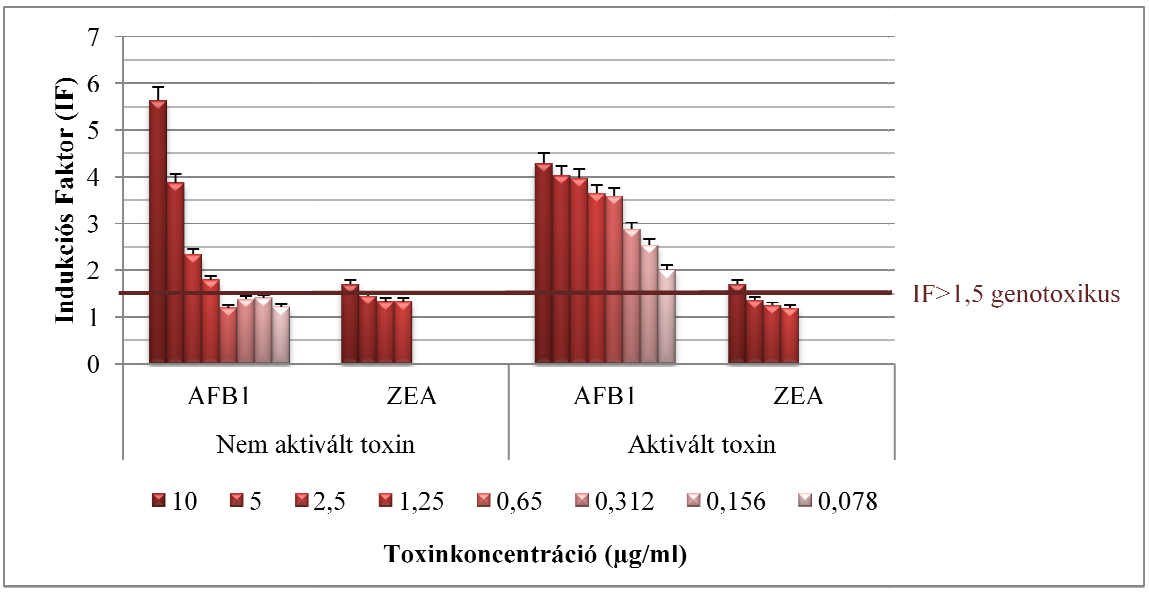
4.1.1 *SOS*-Chromo genotoxicitás teszt

Az AFB1 toxint 10–0,078 µg/ml (lásd 4.1. sz. kép), míg a ZEA toxint 10–1,25 µg/ml koncentrációs tartományban vizsgáltam. Az eredményeket a 4.1. sz. ábrán foglaltam össze.



4.1. sz. kép: Az aflatoxin-B1 (AFB1) és a hozzá tartozó kontrollok vizsgálata *SOS*-Chromo teszttel (forrás: a szerző felvétele, 2009.)

A 4.1. sz. ábráról leolvasható, hogy az *SOS*-Chromo teszt kevésbé hatékony módszernek bizonyult a ZEA biológiai hatásának elemzésére. Ebben az esetben a natív és az aktivált mikotoxinok közötti különbség nem volt számottevő (10 µg/ml-es koncentrációnál IF=1,7; 5 µg/ml-es koncentrációnál IF=1,5±0,1). Az AFB1 esetében viszont az aktivált toxin már 0,078 µg/ml-es koncentrációban indukálta az *sfi*A gént és eredményezett egy viszonylag magas IF=2 értéket, szemben a metabolikus aktiválás nélkül vizsgált toxinnal, amely ebben a koncentrációban mindösszesen IF=1,22 értékkel volt jellemezhető, amely szakirodalmi adatok alapján nem tekinthető genotoxikusnak.



4.1. sz. ábra: A aflatoxin-B1 (AFB1) és a zearalenon (ZEA) vizsgálata *SOS*-Chromo teszttel a metabolikus aktiváláshoz szükséges enzimek nélkül és azok jelenlétében

Vizsgálataim alapján az AFB1-re vonatkozóan 0,078 µg/ml koncentrációjú oldat mutatható ki az *SOS*-Chromo teszttel, amely tiszta AFB1-re vonatkoztatva 0,78 µg-nak felel meg. Quillardet és munkatársai (1985) az eredetileg kémcsőben kivitelezett *SOS*-Chromo tesztben a minimálisan kimutatható AFB1 mennyiséget 1,56 µg-ban adták meg. Tehát a mikrotiteres verzió valamivel érzékenyebb, a kimutathatósági határ 50%-kal alacsonyabb (0,78 µg) az eredetileg kialakított vizsgálati rendszerben mérthez képest (1,56 µg).

Vizsgálati eredményeimet összehasonlítottam az egyik leginkább elterjedt mutagenitás vizsgálattal, az Ames teszt AFB1-re mutatott eredményeivel.

Ueno és munkatársai (1978) az AFB1-et vizsgálták Ames-tesztben a *S. typhimurium* TA 98 és TA 100 törzzsel. A maximális genotoxikus hatást az egy agarlemezre vonatkoztatott 100 µg AFB1 esetében tapasztalták. A legkisebb vizsgált anyagmennyiség, aminél az AFB1 genotoxikus hatását vizsgálták 10 µg volt. Dunn és munkatársai 1982-ben az AFB1 mutagenitását vizsgálta szintén az Ames-tesztben a *S. typhimurium* tesztszervezet 5 különböző törzsével. Az így kimutatható AFB1 mennyiségre szintén 10 µg-ot kaptak. Hasonló értéket kaptak Carvajal és munkatársai (2004) a TA 98-as törzzsel.

A felsorolt kutatók által elvégzett kísérletek és a saját eredményeimet figyelembe véve az *SOS*-Chromo teszt AFB1-re mutatott érzékenysége hozzávetőlegesen 2 nagyságrenddel nagyobb, mint az Ames-teszt, Petri-csészés módszerének publikációkban közölt eredményeinek érzékenysége. Mindazok ellenére, hogy az *SOS*-Chromo teszt már 0,078 µg/ml AFB1 koncentrációjú oldatra is képes reagálni, nem alkalmas direkt élelmiszer- és takarmányvizsgálatokra, mivel az csak a vonatkozó határértékek (0,02–0,005 mg/kg között,

amely megfelel 0,02–0,005 μg/ml közötti koncentrációnak – 2.2.3 fejezet) felett képes az AFB1 detektálására (0,078 μg/ml). Alkalmas lehet viszont screening módszerként való alkalmazásra biodegradációs kísérletekben, hiszen a mikotoxin-bontás elemzésére alkalmazott koncentráció – ami a környezetben előforduló koncentrációnak megfelelően beállított szintnek felel meg – kimutatására alkalmas.

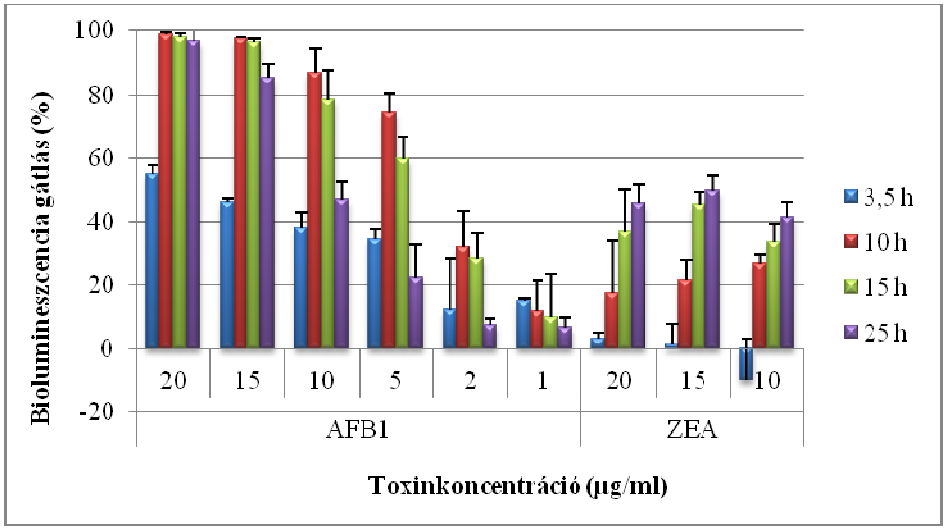
4.1.2 *Aliivibrio fischeri* citotoxicitás teszt

Célom volt, hogy az *A. fischeri* tesztbaktérium segítségével információt kapjak az AFB1 és ZEA toxinok citotoxicitásáról. Irodalmi kutatásaink szerint ezidáig egyetlen publikáció (SARTER ET AL., 2008) foglalkozott a mikotoxinok ilyen irányú vizsgálatával, amelyben a szerzők az AFB1-et 10 μg/ml-es koncentrációban, a deoxinivalenolt 20 μg/ml-es koncentrációban vizsgálták.

Az elvégzett kísérletek eredményeit a 4.2. sz. ábrán foglaltam össze, amelyről leolvasható, hogy a 10 μg/ml AFB1 koncentráció esetében, 10 és 15 órás kontaktidőnél több mint 80%-os gátlást tapasztaltam, amely eredmények korrelálnak a Sarter és mtsai által mért eredményekkel, akik közel 100%-os inhibíciót tapasztaltak. Mindazonáltal a saját mérési eredményeim 3,5 és 25 órás kontaktidő esetében jelentősen nagyobb gátlást mutattak. A lengyel kutatócsoport ezen kontaktidő esetében még 40%-os gátlást sem mért, addig a laboratóriumi méréseim közel 80%-os gátlást mutattak, továbbá a szélesebb koncentrációs tartományban végzett tesztnél, még 1 μg/ml-es koncentrációban is kimutatható gátlást tapasztaltam.

A ZEA 15 μg/ml-es koncentrációban 50%-al gátolta a tesztbaktérium lumineszcenciáját. Vizsgálataim alapján az *A. fischeri* tesztszervezet 10-15-25 órás kontaktidővel is alkalmas a ZEA detektálására.

Fentiek alapján azonban az *A. fischeri* teszt kimutatási érzékenysége nem teszi lehetővé az élelmiszerbiztonsági célokra történő alkalmazást, hiszen egy nagyságrenddel nagyobb tartományban képes kimutatni az AFB1-et, mint a jelenleg hatályban lévő határértékek, de alkalmas lehet AFB1-bontó mikroszervezetek toxinbontásának értékelésére az *SOS*-Chromo teszthez hasonlóan.



4.2. sz. ábra: Az aflatoxin-B1 (AFB1) és a zearalenon (ZEA) vizsgálata *Aliivibrio fischeri* teszttel

Az aflatoxin-B1 esetében meghatároztam a 3,5-10-15-25 órás kontaktidőnél azt a hatásos koncentráció szintet is, amely 10, 20, és 50% lumineszcencia gátlást okoz a tesztszervezet számára ($EC_{10,\ 20,\ 50}$). A szórás és konfidencia intervallum értékeit metrikus adatok alapján állapítottam meg (CHRISTENSEN & NYHOLM, 1984). Az EC értékeket különböző kontaktidőnél a 4.1. sz. táblázat, illetve a részletes számítást a statisztikai jellemzőkkel a 3. sz. melléklet tartalmazza.

4.1. sz. táblázat: Az *A. fischeri* tesztszervezet aflatoxin-B1-re meghatározott EC értékei 3,5-10-15-25 órás kontaktidő esetében

Kontaktidő	EC_{10} (µg/ml)	EC_{20} (µg/ml)	EC_{50} (µg/ml)
3,5 h	0,9	2,4	17,1
10 h	0,9	1,4	3,0
15 h	1,0	1,6	3,8
25 h	4,2	5,5	9,1

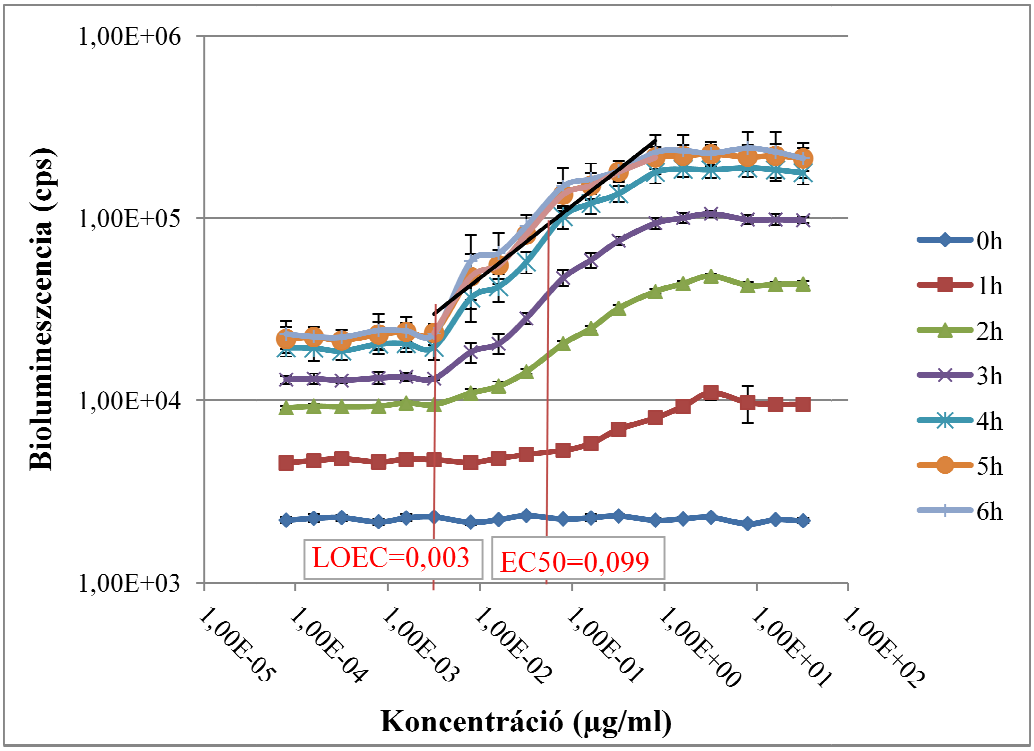
A 4.1. sz. táblázatból látható, hogy az EC értékek alapján a 10 és 15 órás kontaktidőnél bizonyult az *A. fischeri* tesztszervezet az AFB1 hatására a legérzékenyebbnek. Ezen kontaktidők esetében az EC_{50} érték 3 illetve 3,8 µg/ml, miközben az akut standard vizsgálat esetében 15 perces kontaktidővel az $EC50_{(15\ min)}$ érték 23,3 µg/ml. A vizsgálataink alapján a károsan még nem ható AFB1 szint 0,9 µg/ml koncentráció alatt adható meg.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.1.2 fejezetben bemutatott eredmények alapján):
(1. tézis) A mikrotiter-lemezen végzett *Aliivibrio fischeri* teszt alkalmas az aflatoxin-B1 toxin 1 µg/ml-es koncentrációig történő detektálására ($EC50_{(10h)}$=3 µg/ml; $EC50_{(15h)}$=3,8 µg/ml), míg az akut szabványos *Aliivibrio fischeri* lumineszcencia-gátlási teszt (ISO 11348) alkalmazása esetén az aflatoxin-B1 kimutatási határa 20 µg/ml ($EC50_{(15min)}$=23,3 µg/ml).

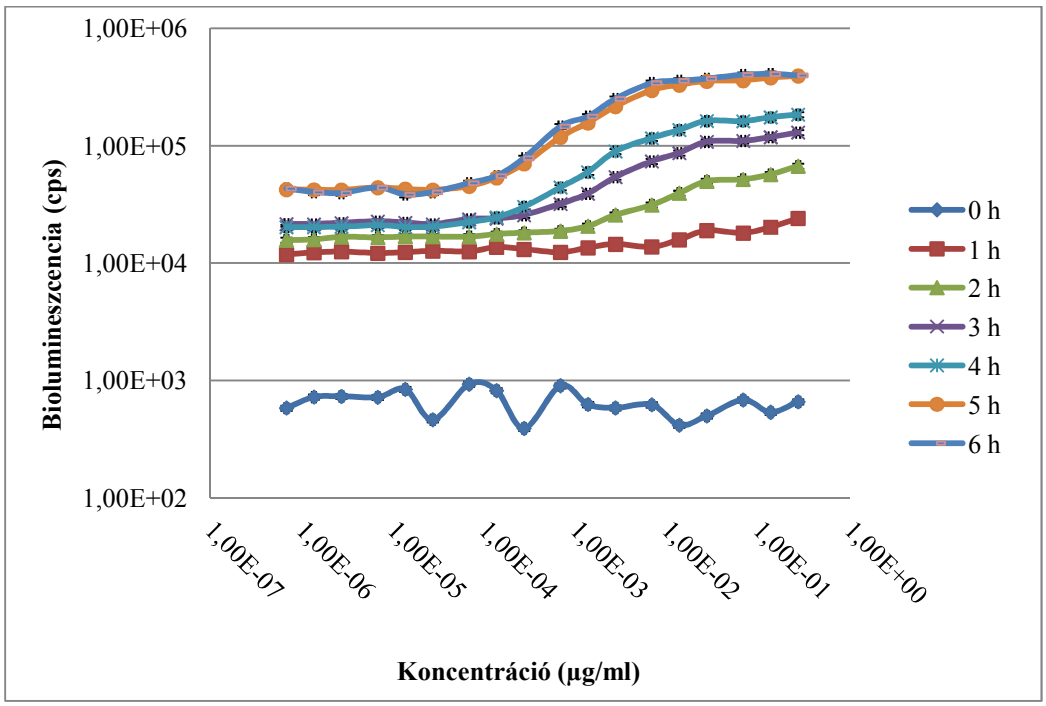
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.1.1 és 4.1.2 fejezetben bemutatott eredmények alapján):
(2. tézis) Az *SOS*-Chromo és az *Aliivibrio fischeri* teszt alkalmas az aflatoxin-B1 mikotoxin geno- és citotoxikus hatásának detektálására, így ezek a vizsgálatok felhasználhatóak toxinbontó mikroorganizmusok biológiai hatásmérésen alapuló screening vizsgálatára.

4.1.3 BLYES/BLYR hormonhatás elemző tesztrendszer

A vizsgálatok során a teszt-mikroorganizmus érzékenységét ellenőriztem ZEA toxinra. Az eredményeket a 4.3 és a 4.4. sz. ábrákon foglaltam össze, valamint a vizsgálathoz tartozó pozoitív kontroll (17-ß ösztradiol) biolumineszcencia értékeit a 4.3/a és 4.4/b ábrán mutatom be az összehasonlíthatóság kedvéért.



4.3. sz. ábra: A BLYES tesztszervezet zearalenon hatására mutatott biolumineszcencia értékei 0–6 órás kontaktidő elteltével

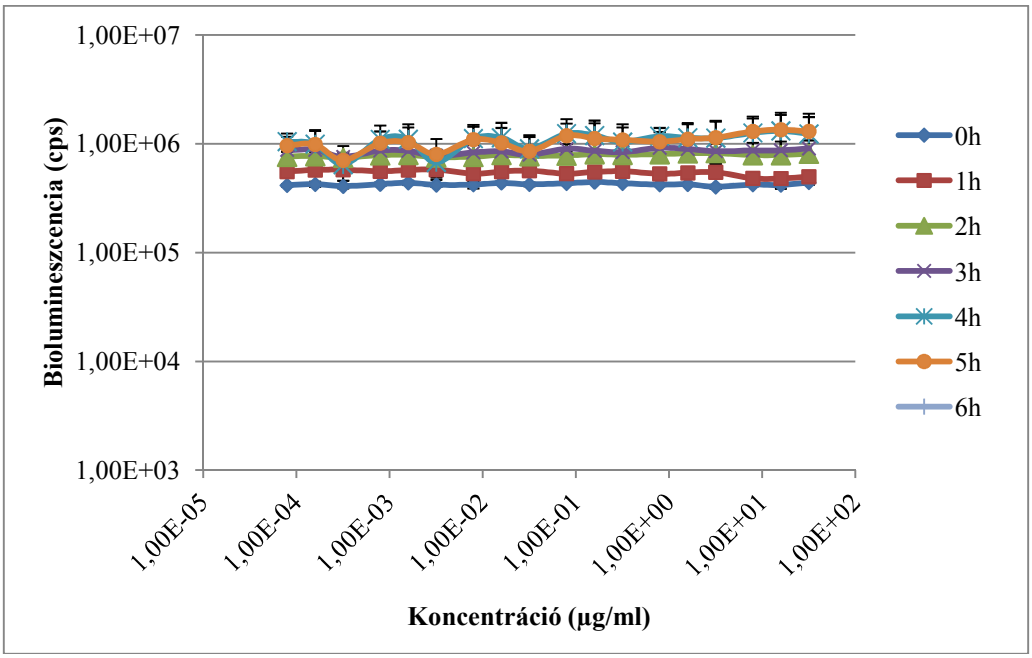


4.3/a sz. ábra: A BLYES tesztszervezet 17-ß ösztradiol hatására mutatott biolumineszcencia értékei 0–6 órás kontaktidő elteltével

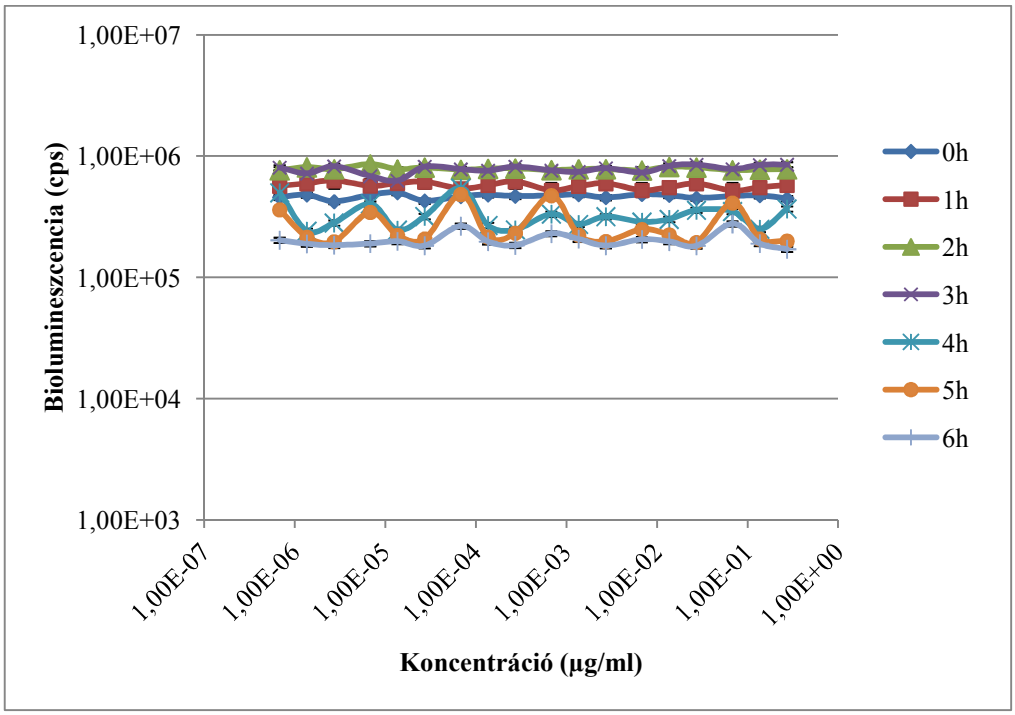
A 4.3. sz. ábrán a ZEA koncentráció függvényében ábrázoltam a BLYES tesztszervezet biolumineszcencia változását. A koncentráció-válasz függvény lineáris részéből meghatároztam az EC_{50} és LOEC értékeket. Az ábráról leolvasható, hogy a BLYES tesztszervezet esetében a ZEA-ra megállapított EC_{50} érték a 0,99 µg/ml koncentrációjú oldat, amely a tesztben 0,099 µg/ml ZEA toxinnak felel meg (a 10%-ra hígulást figyelembe véve, amelyet a tesztszervezet hozzáadása okoz), így a szakirodalmi adatokhoz képest (EC_{50}=0,6 µg/ml SANSEVERINO ET AL., 2009), az általam kivitelezett tesztben az érzékenység tekintetében 0,5 µg/ml eltérés volt tapasztalható. A legkisebb kimutatható ZEA koncentráció pedig méréseink alapján 0,003 µg/ml a tesztben, amely 0,03 µg/ml oldatkoncentrációnak felel meg. Az ábráról leolvasható, hogy az 5. és 6. óra közötti fénykibocsátás-különbség már elhanyagolható mértékű, így a további vizsgálatok során az 5 órás eredményeket vettük alapul.

A fentiek alapján a BLYES módszer érzékenysége a ZEA-t tekintve megfelel a ma hatályban lévő takarmánybiztonsági határértékeknek, amely gabonafélék és gabonakészítmények esetében 2 mg/kg, kukorica melléktermékek esetében pedig 3 mg/kg; továbbá a teszt alkalmas lehet mikotoxin bontó mikroszervezetek screening vizsgálatára. Eredményeim alapján a későbbiekben elvégzett mikrobiális ZEA bontási kísérletek kiindulási koncentrációját az élesztő érzékenységéhez igazítva (EC_{50} értéke 0,99) 1 µg/ml koncentrációra állítottam be, így a koncentráció-válasz függvény alapján mind a csökkent, mind az erősödött válaszreakciót detektálni tudtam.

A BLYR tesztszervezet esetében a tesztszervezetre 20%-os gátlást szakirodalmi adatok (SANSEVERINO ET AL., 2009) alapján a ZEA 5,7 µg/ml-es koncentrációja okoz. Saját méréseink szerint a ZEA a vizsgált koncentráció tartományban nem gátolja a *S. cerevisiae* tesztszervezet szaporodását (4.4. sz. ábra).



4.4. sz. ábra: A BLYR tesztszervezet zearalenon koncentráció mutatott bioluminescencia értékei 0–6 órás kontakidő elteltével



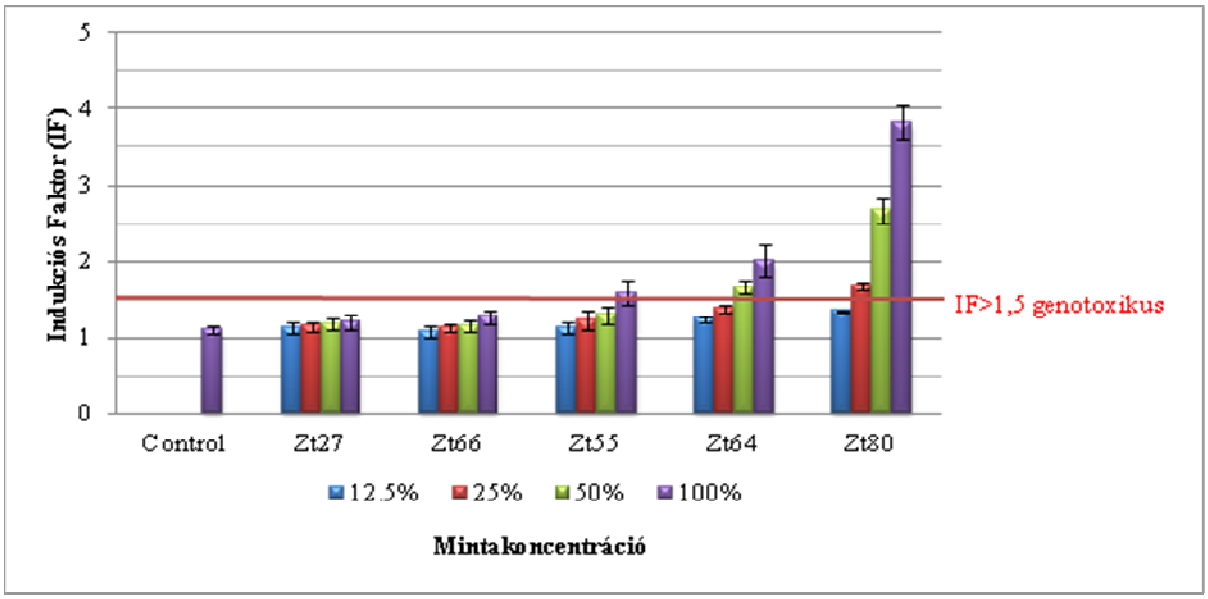
4.4/a sz. ábra: A BLYR tesztszervezet 17-ß ösztradiol hatására mutatott bioluminescencia értékei 0–6 órás kontaktidő elteltével

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.1.3.fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(3. tézis) Az EDC (ösztrogén) hatás detektálására alkalmazott *Saccharomyces cerevisiae* teszt (BLYES) alkalmas a zearalenon toxin 0,03 µg/ml-es koncentrációig történő kimutatására; így a teszt kimutatási határa megfelel az Európai Unió takarmánybiztonsági határértékeire vonatkozó ajánlásainak. Mindemellett a módszer felhasználható toxinbontó mikroorganizmusok biológiai hatásmérésen alapuló screening vizsgálatára is.

4.2 Hazai kukorica mintákból izolált *Aspargillus flavus* törzsek aflatoxin-B1 termelésének kimutatása *SOS*-Chromo teszttel

A vizsgálatokat a 3.2. fejezetben leírt módon végeztük el, az eredményeket a 4.5. sz. ábrán foglaltam össze, míg a vizsgált minták kémiai- és immunanalitikai eszközökkel mért AFB1 tartalmát a 4.2. sz. táblázat tartalmazza.



4.5. sz. ábra: Hazai kukorica mintákbóból izolált *Aspergillus flavus* törzsek aflatoxin-B1 termelő képességének kimutatása *SOS*-Chromo teszttel

A 4.5. sz. ábráról és a 4.2. sz. táblázatból látható, hogy egyrészt nem volt kimutatható genotoxikus hatás azon kukorica minták esetében, amelyek az Zt27 és Zt66 jelzésű *A. flavus* törzsekkel lettek beoltva; másrészt ezek a törzsek a HPLC és ELISA mérések eredményei alapján kevesebb, mint 100 µg/kg AFB1-et termeltek. A Zt64 jelzésű törzzsel beoltott mintából készült extraktum olyan magas genotoxikus potenciállal jellemezhető (IF=2), amely érték az AFB1 standard sort (lásd 4.1. sz. ábra) és a metanollal történő 25-szörös hígítást figyelembe véve 1950 µg/kg AFB1 koncentrációnak felelne meg; továbbá még 50%-os hígítás esetében is genotoxicitást mutatott. Mindezek ellenére az analitikai eredmények ennél jóval alacsonyabb toxinkoncentrációt mutattak ki (ELISA: 293,2 µg/kg; HPLC=397,7 µg/kg). Ellentmondásos továbbá, hogy a Zt64 esetében magasabb genotoxikus hatást tapasztaltam, mint a Zt55 jelű minta esetében, amely *A. flavus* törzs az analitikai mérések alapján magasabb AFB1 termelő képességgel rendelkezik (2031 µg/kg; 575 µg/kg). Feltételezhetően a Zt64 jelzésű törzs az AFB1-en kívül más mutagén hatású metabolitokat is termelt. Vizsgálataim alapján a Zt80 jelzésű törzzsel inokulált kukorica minta volt a legnagyobb genotoxikus potenciállal jellemezhető; a metanollal extrahált minta igen magas indukciós faktort mutatott

(IF=3,8); az 50%-os hígítás IF=2,67; sőt az 1:4-es hígítás is mutagénnek bizonyult (IF=1,64). A nem inokulált kontroll minta nem indukálta az *SOS*-repair rendszert a baktériumban.

4.2. sz. táblázat: A magyarországi területekről izolált *A. flavus* törzsek toxintermelésének értékelése immunanalitikai (ELISA) és kémiai analitikai (HPLC) módszerekkel

A. flavus törzs	ELISA (µg/kg)	HPLC-FLD (µg/kg)	*SOS*-Chromo teszt (IF)
Zt27	2,8	0,1	1,20
Zt66	28,3	72,6	1,27
Zt64	293,2	397,7	2,01*
Zt55	2031,0	575,0	1,59*
Zt80	6228,0	2774,0	3,81*

Jelmagyarázat
* genotoxikus minta (IF>1,5)

Ezen eredmények hangsúlyozzák az analitikai mérések mellett a biotesztek alkalmazásának fontosságát, hiszen olyan veszélyes, például mutagén hatásra hívhatják fel a figyelmet, ami az analitikai mérések előtt rejtve marad.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.2 fejezetben bemutatott eredmények alapján):
(4. tézis) Az *SOS*-Chromo teszt alkalmas hazai kukorica mintákból származó *Aspergillus flavus* izolátumok aflatoxin-B1 termelő képességének kimutatására. A módszer segítségével, hazánkban eddig a tudományos közvélemény által nem létezőnek tekintett, kiugróan magas aflatoxin B1 termelő *Aspergillus flavus* törzsek kerültek kimutatásra.

4.3 Aflatoxin-B1 és zearalenon biológiai lebontásának vizsgálata

A vizsgálatokba a 3.3. fejezetben felsorolt mikroorganizmusokat vontam be, amelyek mikotoxin bontó képessége korábban meghatározásra került.

Az analitikai eredmények alapján a mikroorganizmusokat mikotoxin bontási képességük szempontjából három csoportra oszttottam:

I. kiváló (>90%-os) toxinbontási képességgel rendelkező törzsek

II. jó (50–90%-os) toxinbontási képességgel rendelkező törzsek

III. elégtelen (<50%-os) toxinbontási képességgel rendelkező törzsek

A következő fejezetekben leírt kísérleteim során a vizsgált mikroorganizmusok toxinbontási eredményeit hasonlítottam össze a mikroorganizmusok azon képességével, hogy milyen mértékben szüntetik meg vagy csökkentik a káros biológiai hatásokat.

4.3.1 Az aflatoxin-B1 biológiai lebontásának vizsgálatára irányuló előkíséreltek

A kísérletek során 16 mikroorganizmus AFB1 degradációs képességét határoztam meg.. A bontási rendszereket 24 óránként mintáztam, amely mintákat a 3.4. fejezetben leírt módon kezeltem. A felülúszó minták genotoxicitását indukciós faktorral (IF) kifejezve 24 óránként határoztam meg az *SOS*-Chromo teszt segítségével, míg az ELISA-teszt és HPLC eredményeket bontási százalékban adtam meg a bontási kísérlet végén, amely ELISA és HPLC tesztek eredményei szoros egyenes arányú összefüggést (Pearson-féle korrelációs érték: 0,98) mutattak. A kapott eredményeket a 4.3. sz. táblázatban foglaltam össze.

A pellet kémiai analitika vizsgálata alapján a minták az eredeti AFB1 koncentrációnak kevesebb, mint 1%-át tartalmazták, így kizárható az AFB1 sejtfalhoz történő adszorpciója, tehát a mért toxin koncentráció csökkenések a törzsek metabolikus aktivitásának tulajdoníthatók.

4.3. sz. táblázat: Az aflatoxin-B1 (2 µg/ml) biológiai lebontásának eredményei a mikrobák biodegradációs képessége (HPLC, ELISA teszt) és a genotoxicitás (*SOS*-Chromo teszt) alapján

Faj neve	Laboratóriumi jelzése	*SOS*-Chromo teszt			HPLC	ELISA-teszt
		Indukciós Faktor			Bontási %	Bontási %
		24 h degradáció	48 h degradáció	72 h degradáció	72 h degradáció	72 h degradáció
VAK[a]		2,43* ± 0,04	2,38* ± 0,01	2,40* ± 0,03	<20	<20 ± 0,00
E. coli	TOP10[a]	2,42* ± 0,07	2,13* ± 0,15	2,32* ± 0,06	<20	<20 ± 0,00
R. erythropolis	N11[a]	1,98*± 0,05	1,36 ± 0,02	1,29 ± 0,18	89,35 ± 7,79	97,67 ± 0,30
	AK35[a]	2,56* ± 0,08	1,73* ± 0,04	1,44 ± 0,29	96,73 ± 0,90	94,31 ± 0,45
	AK42[a]	3,06* ± 0,03	1,87* ± 0,30	1,42 ± 0,08	87,14 ± 0,00	90,77 ± 0,21
	GD2A[a]	2,90* ± 0,14	1,51* ± 0,19	1,39 ± 0,25	96,25 ± 5,24	96,04 ± 2,07
	GD2B[a]	2,71* ± 0,06	1,48 ± 0,16	1,34 ± 0,21	99,96 ± 0,00	92,85 ± 0,73
	BRB1AB[a]	2,85* ± 0,01	1,53* ± 0,2	1,37 ± 0,15	99,96 ± 0,00	93,64 ± 0,00
R. ruber	N361[a]	2,81*± 0,02	2,89* ± 0,02	3,00* ± 0,03	<20 ± 0,00	<20 ± 0,00
R. globerulus	N58[a]	2,60* ± 0,04	2,43* ± 0,03	2,56* ± 0,05	<20 ± 0,00	20,79 ± 0,00
	AK36[a]	2,89* ± 0,06	1,60*± 0,03	1,40 ± 0,35	91,46 ± 2,38	86,24 ± 1,94
R. rhodochrous	NI2[a]	1,83* ± 0,13	1,26 ± 0,03	1,22 ± 0,13	99,98 ± 0,00	97,97 ± 0,00
	ATCC 12674[a]	2,30* ± 0,05	1,4 ± 0,05	1,23 ± 0,08	96,05 ± 1,29	97,90 ± 0,11
R. pyridinivorans	K402[a]	2,70* ± 0,22	1,92* ± 0,21	1,38 ± 0,27	99,92 ± 0,00	97,60 ± 0,05
	K403C[a]	2,45* ± 0,37	1,85* ± 0,04	1,41 ± 0,29	92,00 ± 2,23	90,35 ± 0,34
	K404[a]	2,39* ± 0,10	1,86* ± 0,16	1,38 ± 0,35	82,06 ± 2,59	89,80 ± 0,97
	K405[a]	2,01* ± 0,14	1,38 ± 0,04	1,39 ± 0,35	99,92 ± 0,00	92,81 ± 1,00
	AK37[a]	2,97* ± 0,02	1,58* ± 0,21	1,42 ± 0,19	87,78 ± 1,50	87,73 ± 1,61

Jelmagyarázat

[a] minden adatpont három párhuzamos mérés átlagát mutatja
* genotoxikus minta (IF>1,5)
minta a vakhoz viszonyított <50% AFB1 degradációval
minta a vakhoz viszonyított 50-90% AFB1 degradációval
minta a vakhoz viszonyított >90% AFB1 degradációval

A 4.3. sz. táblázatból kiolvasható, hogy tizennégy *Rhodococcus* törzs képes volt lebontani az AFB1-et 72 óra alatt közel 100%-ban (NI1, AK35, AK42, GD2A, GD2B, BRB1AB, AK36, NI2, ATCC 12674, K402, K403C, K404, K405, AK37), közülük öt (NI1, GD2B, NI2, ATCC 12674, K405) képes volt megszüntetni az AFB1 genotoxikus hatását 48 óra alatt. A 72 órás minták *SOS*-Chromo teszt eredményei szoros fordított arányú korrelációt mutattak a HPLC és ELISA eredményekkel (Pearson-féle korrelációs érték: -0,96), tehát a nagyobb bontási potenciál kisebb genotoxicitást eredeményezett a vizsgált mintákban. A 80%-nál nagyobb bontási potenciállal rendelkező törzsek sikeresen megszűntették az AFB1 mutagén hatását, míg a negatív kontroll *E. coli* és a két alacsony bontási képességgel rendelkező rhodococcus (N361, N58) AFB1 bontása során a minták genotoxicitása nem csökkent (IF>1,5).

4.3.2 Kombinált toxikológiai profil kialakítása az aflatoxin-B1 biológiai lebontásának vizsgálatára

Az AFB1 biodegradációs kísérletek komplex értékelése érdekében vizsgáltam az AFB1 biológiai lebontása során esetlegesen jelentkező genotoxikus és citotoxikus hatást.

A biodegradációs kísérleteket összeállítása során bizonyos változtatásokat eszközöltem: a mikroba törzsek szaporítását egy módosított BM oldatban végeztem, amelynek összsó-koncentrációja a felére csökkent, így optimalizálva a tenyésztési körülményeket mind a bontótörzsek, mind az *A. fischeri* tesztszervezet számára, illetve az AFB1 koncentrációját kétszeresére emeltem (4 µg/ml), mivel az előkísérletek során több mikroorganizmus is képes volt azt 72 óra alatt teljesen eliminálni (lásd 4.3.1 fejezet). Továbbá vizsgálatba vontam AFB1 mentes negatív kontrollokat, annak érdekében, hogy a bontótörzsek által termelt anyagcseretermékek *A. fischeri*-re mutatott gátló hatásáról kapjunk információt. Mindezek mellett az előkísérletek alapján a toxint bontani nem képes törzsek, mint nem bontó kontroll mikroorganizmusok kerültek alkalmazásra. A bontási rendszereket a 72 óra inkubáció után mintáztuk.

A teszt során a felülúszó minták 100 µl-ét adagoltam a mikrotiter-lemez megfelelő részeibe, a módosított BM oldatból hiányzó sókat visszapótoltam, majd hozzáadtam az *A. fischeri* tesztszervezet folyékony tenyészetét (100 µl), amely sejtsűrűségét ebben az esetben OD=0,2-re állítottam be 550 nm-en. Ellenőriztem a kezdő fénykibocsátást, majd a mintákat rázó termosztátban 25ºC-on, 30 rpm-en inkubáltam, és a minták által kifejtett gátló hatást a 3.1.2 pontban leírt módon állapítottam meg.

Az előkísérletek eredményeire alapozva, amely során az ELISA teszt eredményei nagyban korreláltak a HPLC eredményekkel (4.3.1 fejezet), a kombinált toxikológiai profil eredményeit párhuzamos ELISA tesztekkel támasztottam alá.

Az értékelési rendszerben harminchárom AFB1 bontásra képes mikroba törzs vizsgálata történt két bakteriális bioteszt, az *A. fischeri* teszt és az *SOS*-Chromo teszt segítségével, amely eredményeket párhuzamos ELISA vizsgálatokkal hasonlítottam össze (4.4. sz. táblázat, 4.6. sz. ábra).

4.4. sz. táblázat: Az AFB1 (4 µg/ml) biodegradáció (72 h) eredményei a mikrobák biodegradációs képessége (ELISA teszt) és a kombinált toxikológiai profil alapján

		Aliivibrio fischeri teszt		*SOS*-Chromo teszt	ELISA teszt
		Gátlás (%)		Indukciós Faktor	Bontási %
Faj	Törzs	10 h kontaktidő	15 h kontaktidő		
VAK[a]		74,75 ± 5,62	65,88 ± 4,01	3,66* ± 0,08	<20±0,00
R. erythropolis	N1[a]	6,50 ± 8,36	14,68 ± 21,65	2,13* ± 0,01	93,91 ± 0,13
	AK35[a]	32,33 ± 4,67	46,27 ± 5,49	1,72* ± 0,02	96,45 ± 0,86
	AK42[a]	36,04 ± 10,99	58,91 ± 8,23	2,69* ± 0,05	79,25 ± 3,06
	GD2A[a]	41,50 ± 11,62	57,81 ± 10,97	2,23* ± 0,11	92,08 ± 0,38
	GD2B[a]	74,21 ± 9,16	92,92 ± 2,15	1,75* ± 0,05	96,97 ± 0,12
	BRB1AB[a]	53,08 ± 16,25	62,08 ± 16,62	1,73* ± 0,09	97,60 ± 0,78
R. ruber	N361[a]	60,78 ± 8,04	65,89 ± 7,95	3,62* ± 0,03	<20 ± 0,00
R. globerulus	N58[a]	67,29 ± 0,17	66,44 ± 8,45	3,24* ± 0,13	<20 ± 0,00
	AK36[a]	30,33 ± 21,29	50,27 ± 18,85	2,02* ± 0,10	93,15 ± 0,45
R. rhodochrous	NI2[a]	-35,72 ± 7,56	-66,79 ± 1,07	1,50 ± 0,02	99,05 ± 0,06
	ATCC 12674[a]	3,14 ± 4,45	35,02 ± 2,81	1,87* ± 0,07	95,74 ± 1,55
R. pyridinivorans	K402[a]	-42,29 ± 12,9	-66,41 ± 49,96	1,56* ± 0,05	97,00 ± 0,55
	K403C[a]	76,17 ± 2,60	85,10 ± 6,43	1,46 ± 0,01	94,50 ± 4,58
	K404[a]	32,80 ± 5,87	45,83 ± 10,19	1,94* ± 0,38	93,06 ± 5,72
	K405[a]	81,93 ± 0,20	89,93 ± 0,16	1,54* ± 0,01	97,84 ± 0,23
	K406[a]	43,82 ± 0,02	40,84 ± 2,14	1,58* ± 0,02	96,16 ± 0,81
	K408[a]	33,89 ± 7,94	34,18 ± 8,50	1,72* ± 0,28	95,81 ± 3,27
	AK37[a]	14,93 ± 12,34	15,25 ± 9,53	2,70* ± 0,01	70,77 ± 0,68
Streptomyces heliomycini.	K2[b]	7,95 ± 4,29	1,12 ± 3,87	2,59* ± 0,03	59,75 ± 7,45
Streptomyces cavourensis	K14[b]	-138,17 ± 20,15	-135,7 4 ± 20,67	2,69* ± 0,03	80,22 ± 1,20
Chryseobacterium formosense	UA58[b]	-12,16 ± 6,10	-16,84 ± 10,82	2,36* ± 0,07	76,79 ± 1,52
Chryseobacterium hydrocarbonovorans	TN4[b]	9,82 ± 10,46	13,57 ± 7,84	1,75* ± 0,27	56,88 ± 1,59
Pseudomonas citronellolis	ZS1[b]	-5,75 ± 9,25	-32,41 ± 39,09	1,96* ± 0,03	91,24 ± 0,61
Pseudomonas pseudoalcaligenes	FEH28[b]	-1,16 ± 5,83	-42,24 ± 34,31	1,78* ± 0,04	97,61 ± 0,04
Pseudomonas azelaica	TN5[b]	-11,28 ± 9,31	-56,68 ± 49,79	2,19* ± 0,07	86,65 ± 0,26
Pseudomonas monteilii	ZV6[b]	-14,93 ± 9,52	-62,51 ± 51,71	2,24* ± 0,05	80,14 ± 0,78
Pseudomonas putida	DN1[b]	-17,05 ± 10,29	-22,86 ± 14,33	1,42 ± 0,07	90,80 ± 0,18
Pseudomonas stutzeri	KÖ5[b]	-0,69 ± 7,36	-7,47 ± 11,07	1,95* ± 0,03	91,44 ± 0,19
Microbacterium esteraromaticum	NZS9[b]	44,31 ± 4,31	57,68 ± 6,30	2,11* ± 0,02	64,80 ± 4,01
Microbacterium barkeri	EL1[b]	62,15 ± 8,64	49,92 ± 6,17	1,87* ± 0,08	74,19 ± 0,96
Pseudoxanthomonas suwonensis	NZS6[b]	36,63 ± 4,56	15,22 ± 6,62	2,17* ± 0,08	76,75 ± 1,51
Pseudoxanthomonas kalamensis	H4[b]	27,79 ± 6,05	33,54 ± 4,29	2,02* ± 0,04	70,89 ± 4,09
Arthrobacter protophormiae	J4[b]	-11,03 ± 3,32	-51,00 ± 7,37	2,05* ± 0,08	77,07 ± 1,44

Jelmagyarázat

[a]	minden adatpont két párhuzamos mérés átlagát mutatja
[b]	minden adatpont három párhuzamos mérés átlagát mutatja
*	genotoxikus minta (IF>1,5)
piros	nagyobb mint 50% bioluminesszencia gátlást okozó minta
	AFB1 degradáció <50%
	AFB1 degradáció 50-90%
	AFB1 degradáció >90%

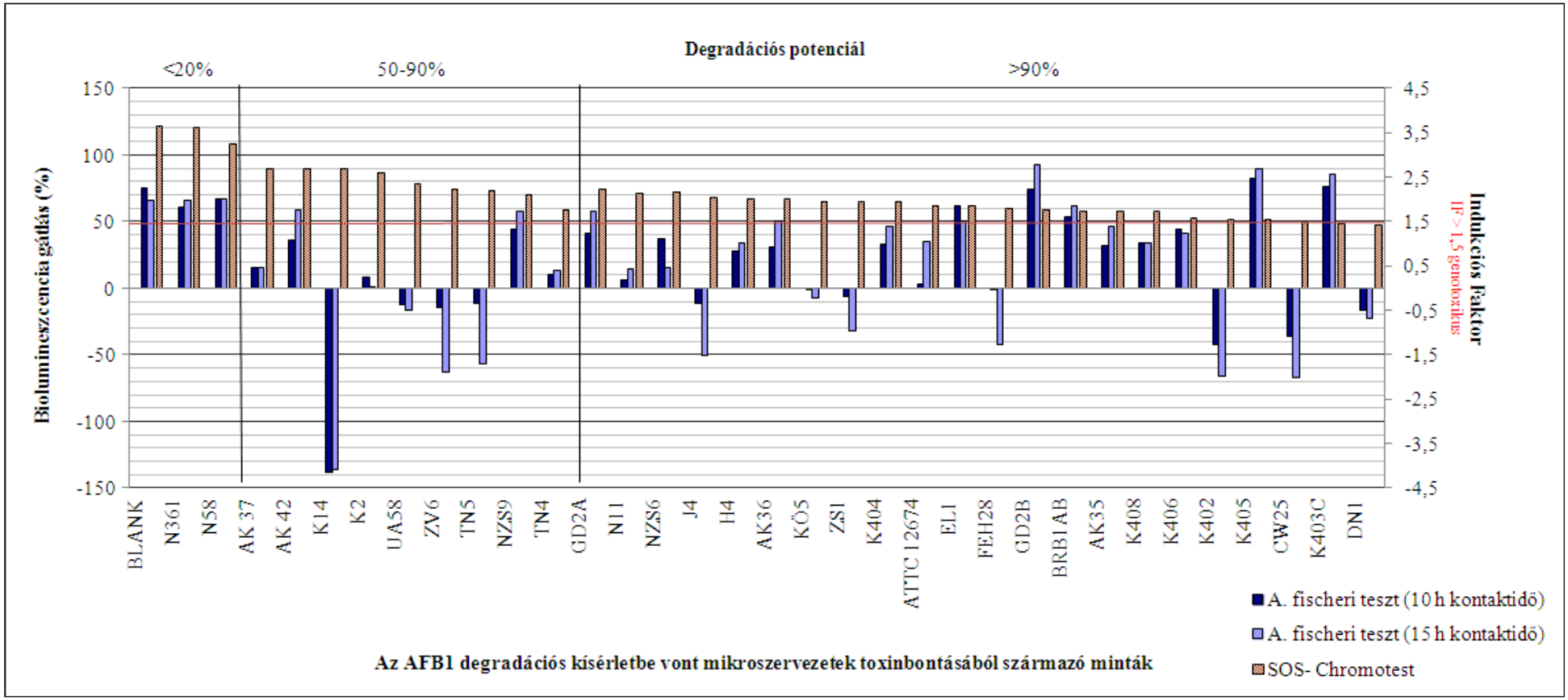
Az elégtelen degradációs képességgel (<50%) rendelkező törzsek (N58, N361) mindkét biotesztben a mikrobamentes vakkal közel azonos eredményeket mutattak, több mint 60%-os gátlást az *A. fischeri*, illetve az IF>3 genotoxicitást az *SOS*-Chromo tesztben.

Az ELISA teszt alapján jó (50–90%) bontási képességgel rendelkező törzsek nem tudták egyik esetben sem megszűntetni a genotoxicitást (AK42, K2, K14, UA58, TN4, TN5,

ZV6, NZS9, EL1, NZS9, EL1, NZS6, H4, J4). A citotoxicitás tekintetében azonban egyik törzs bontási termékei sem okoztak jelentős, több mint 50%-os gátlást az *A. fischeri* tesztszervezet számára; öt törzs esetében (K14, UA58, TN5, ZV6, J4) pedig lumineszcencia intenzitást tapasztaltam, amely olyan metabolitok termelődésére utalhat, amelyek stimuláló hatással vannak a tesztszervezetre vagy a lux géncsalád expressziójára.

Négy kivételtől (GD2B, BRB1AB, K403C, K405) eltekintve a kiváló (>90%) bontási képességgel rendelkező törzsek nem okoztak jelentős gátlást, némely esetben pedig lumineszcencia növekedést okoztak (NI2, K402, K14, UA58, ZS1, FEH28, TN5, ZV6, DN1, KÖ5). Három törzs (GD2B, K403C, K405) szignifikánsan nagyobb gátlást okozott, mint a mikrobamentes vak. A kiváló bontótörzsek közül csak *a R. rhodochrous* NI2*,* a *R. pyridinivorans* K403C, és a *P. putida* DN1 tudta megszüntetni a kiindulási 4 µg/ml AFB1 genotoxikus hatását 72 óra alatt, amelyek közül az NI2 és DN1 jelzésű törzsek magas (>90%) bontási százalékot mutattak az ELISA tesztben és bontási termékei nem mutattak citotoxikus hatást sem az *A. fischeri* tesztszervezetre nézve. Érdekes módon a *R. pyridinivorans* K403C magas degradációs potenciál (94,5%) mellett megszűntette a genotoxikus hatást (IF=1,46), viszont bontási termékei citotoxikus hatással voltak (>70% gátlás) az *A. fischeri* tesztben.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.3.2. fejezetben bemutatott eredmények alapján): (5. tézis) A biodetoxifikációs eljárások értékeléséhez végzett módszerfejlesztés, illetve adaptált *SOS*-Chromo teszt és az *Aliivibrio fischeri* tesztek felhasználásával kialakított kombinált toxikológiai profil alkalmas az aflatoxin-B1 mikotoxint a leghatékonyabban és a legkisebb maradék toxicitással lebontó, gyakorlati alkalmazásokra felhasználható mikroba törzsek kiválasztására, amelyek a vizsgálatok alapján a *Pseudomonas* és a *Rhodococcus* nemzetség képviselői.



4.6. sz. ábra: Az aflatoxin-B1 bontási kísérletből származó minták kombinált toxikológiai profilja

4.3.3 Zearalenon biológiai lebontásának nyomon követése élesztő alapú bioriporter rendszerrel

Az értékelési rendszerben tizenkét mikroba törzs vizsgálata történt, amelynek értékelését a BLYES/BLYR élesztő alapű bioteszt segítségével végeztem, és az eredményeket párhuzamos HPLC és ELISA vizsgálatokkal hasonlítottam össze (4.5. sz. táblázat).

A HPLC és ELISA eredmények között szoros egyenes arányú összefüggés tapasztalható, amelyet bizonyít, hogy a Pearson–féle korrelációs érték a HPLC és ELISA eredmények tekintetében 0,97 volt. Az eredmények sorában egyetlen esetben volt tapasztalható nagyobb eltérés. Az NZS6 jelzésű törzs esetében a HPLC mérések alapján 98,2% bontási képességet tapasztaltam, míg az ELISA eredmények alapján ez az érték 78,89% volt.

4.5. sz. táblázat: A zearalenon (1 µg/ml) biológiai lebontásának eredményei a mikrobák biodegradációs képessége (HPLC, ELISA teszt) és a hormonhatás (BLYES teszt), valamint citotoxikus hatás (BLYR teszt) alapján

		HPLC	ELISA	BLYES teszt						BLYR teszt
				Mintakoncentráció						
				100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,13%	
Faj	**Törzs**	**Bontási %**		**Biolumineszcencia intenzifikáció (%)**						
VAK[a]		<20,00 ± 0,00	<20,00 ± 0,00	269,37 ± 20,54	269,37 ±	246,28 ±	215,24 ±	168,83 ±	121,38 ±	n.g.
S. cavourensis[a]	K14	98,53 ± 0,00	92,99 ± 1,75	0,4 ± 14,72	0,40 ± 6,51	1,22 ± 4,15	-2,03 ± 4,67	-2,38 ± 0,86	-6,63 ± 3,76	n.g
P. kalamensis[a]	H4	98,20 ± 0,00	97,70 ± 0,00	-58,64 ±8,98	-58,64 ± 13,88	-42,39 ± 10,71	-26,38 ± 7,46	-20,00 ± 5,74	-14,41 ± 6,81	n.g
G. paraffinivorans[a]	NZS6	98,20 ± 0,00	78,89 ± 4,80	164,31 ± 11,44	161,31 ± 18,12	118,14 ± 11,61	73,86 ± 11,20	39,53 ± 7,50	23,22 ± 6,74	n.g
R. pyridinivorans[a]	K402	93,63 ± 4,31	93,02 ± 0,76	0,41 ± 6,62	0,41 ± 2,83	2,09 ± 5,06	-0,18 ± 2,83	-0,88 ± 4,13	-0,37 ± 6,96	n.g
R. pyridinivorans[a]	K404	90,93 ± 0,53	93,00 ± 0,36	9,06 ± 9,95	9,06 ± 9,82	-1,09 ± 1,82	-0,40 ± 3,94	-5,92 ± 5,91	-14,24 ± 2,23	n.g
R. pyridinivorans[a]	K408	87,85 ± 2,69	85,39 ± 1,02	75,69 ± 9,67	75,69 ± 15,37	52,75 ± 12,67	34,46 ± 4,44	23,02 ± 1,49	5,79 ± 4,63	n.g
P. pseudoalcaligenes[a]	FEH28	86,96 ± 0,74	82,69 ± 1,14	52,93 ± 8,41	52,93 ± 7,07	30,63 ± 3,84	14,36 ± 4,73	9,47 ± 4,18	0,07 ± 4,44	n.g
R. erythropolis[a]	NI1	75,95 ± 1,00	70,93 ± 2,56	112,33 ± 37,33	112,33 ± 31,58	74,41 ± 20,64	61,83 ± 13,29	37,38 ± 10,57	16,62 ± 1,86	n.g
R. pyridinivorans[a]	AK37	61,14 ± 2,77	63,02 ± 2,64	199,64 ± 8,30	199,64 ± 13,70	149,64 ± 7,92	104,64 ± 7,58	62,44 ± 5,64	37,19 ± 2,63	n.g
R. ruber[a]	N361	54,70 ± 3,46	54,60 ± 3,33	192,83 ± 18,17	192,83 ± 14,80	163,15 ± 7,02	117,49 ± 4,86	70,79 ± 11,81	50,22 ± 2,53	n.g
R. aetherivorans[a]	AK44	27,12 ± 2,24	30,64 ± 2,13	257,75 ± 7,60	257,75 ± 8,76	196,23 ± 5,31	183,91 ± 17,80	138,30 ± 2,44	87,34 ± 1,65	n.g
R. gluberulus[a]	N58	26,24 ± 20,93	19,92 ± 15,87	264,07 ±12,20	264,07 ± 11,62	222,25 ± 14,85	178,78 ± 8,91	120,39 ± 13,61	75,87 ± 13,34	n.g

Jelmagyarázat

[a] minden adatpont három párhuzamos mérés átlagát mutatja

n.k. nem volt gátlás tapasztalható

AFB1 degradáció <50%

AFB1 degradáció 50-90%

AFB1 degradáció >90%

BLYR teszt

Az előkísérletek során nem tapasztaltam a ZEA esetében az alkalmazott 1 µg/ml-es koncentrációban citotoxikus hatást, ennek ellenére a bontási kísérlet során folyamatosan vizsgáltam a mintákat a BLYR tesztszervezettel is, hiszen elképzelhető volt olyan melléktermékek keletkezése, amelyek gátló hatással vannak a tesztszervezetre.

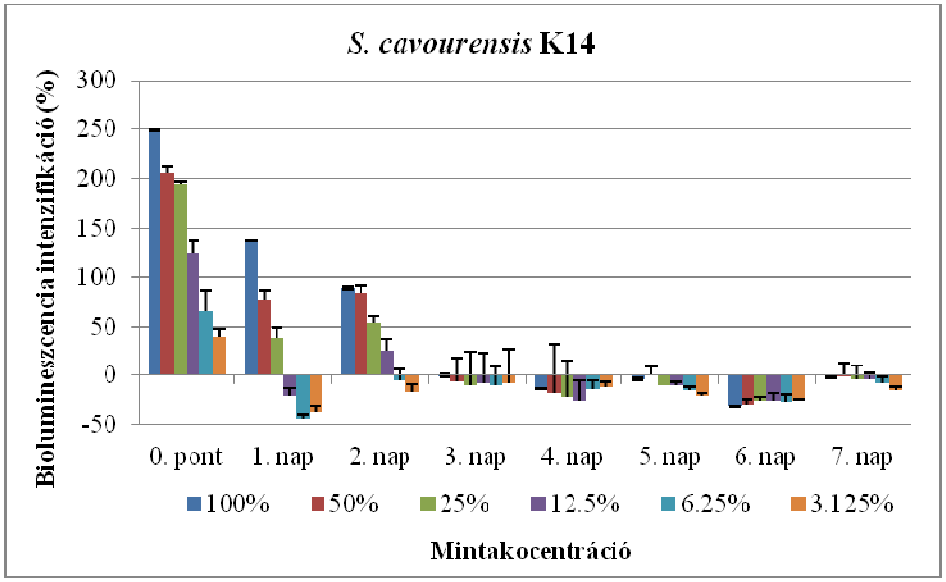
A bontási kísérletek során sem tapasztaltam a BLYR tesztszervezettel sejtnövekedést gátló hatást, amely eredményeket extrapolálva magasabb szerveződési szintekre, azt feltételezhetjük, hogy nincs káros citotoxikus hatás. Mindezek mellett, ezen eredmények azt is jelentik, hogy az alkalmazott *S. cerevisiae* tesztszervezetre a minták nem fejtenek ki gátló hatást, tehát a hormonhatás vizsgálatára alkalmazott BLYES törzs eredményei megbízhatóan fogják a hormonhatást jelezni.

BLYES teszt

A 4.7–4.18. sz. ábrák a zearalenon bontási kísérlet felülúszó mintáiban tapasztalt hormonhatást mutatják a 7 napos kísérlet folyamán, ahol a három párhuzamos minták közötti szórást Y hibasávokkal jelöltem. Minél nagyobb lumineszcencia intenzitást mutat adott mikroba esetében a minta, annál inkább kifejezett a minta ösztrogén hatása.

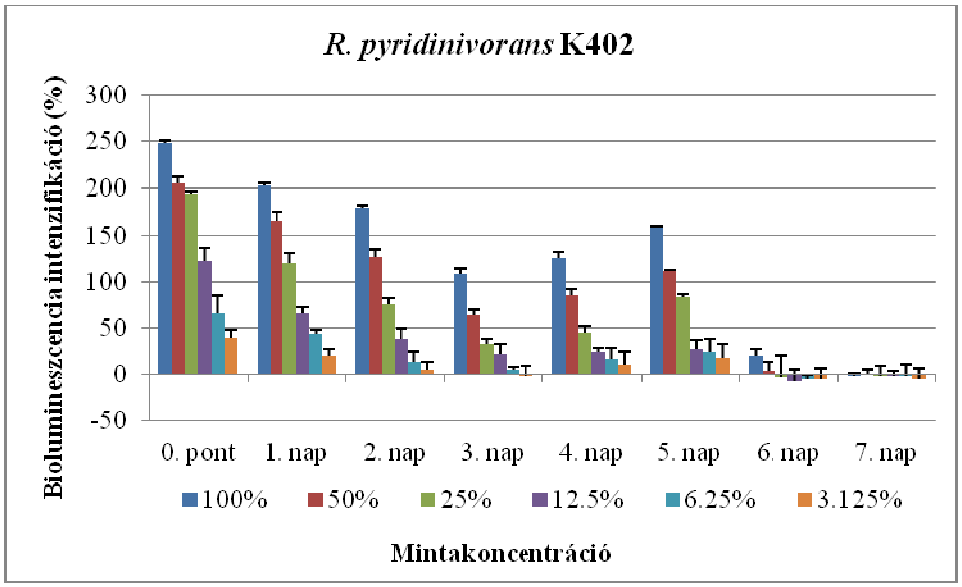
I. Kiváló zearalenon bontási képességgel rendelkező mikroba törzsek

Mind a kémia analitikai eredmények, mind a BLYES teszt alapján a legjobb hatásfokú törzsnek a *Streptomyces cavourensis* K14 bizonyult, amelynek felülúszója a bontási kísérlet végére egyáltalán nem mutatott hormonhatást. Hatékonysága jól látható a 4.7. sz. ábrán, amely megmutatja, hogy a mintában csak az első két nap során volt tapasztalható ösztrogén hatás, a harmadik naptól a törzs megszüntette a ZEA káros biológiai hatását.

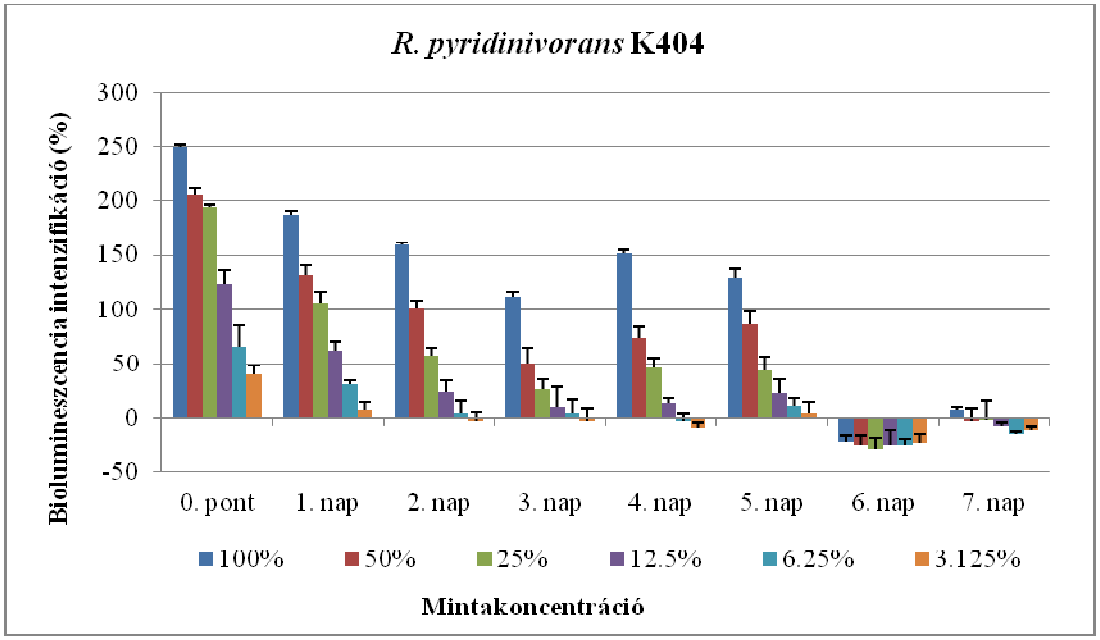


4.7. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Streptomyces cavourensis* K14 zearalenon metabolizációja során

A *Rhodococcus pyridinivorans* K402 és K404 törzsek estében hasonlóság mutatkozik. A 4.8-4.9. sz. ábrákon látható, hogy mindkét törzs esetében a zearalenon biológiai hatásának megszűnése csak a 6. napon következett be. Az első három napon a minták hormonhatása csökkeni kezdett, bár a változás kismértékű volt. A negyedik, ötödik napon kismértékű emelkedést mutatott, végül az utolsó két napra a minták ösztrogén hatása nagymértékben lecsökkent.



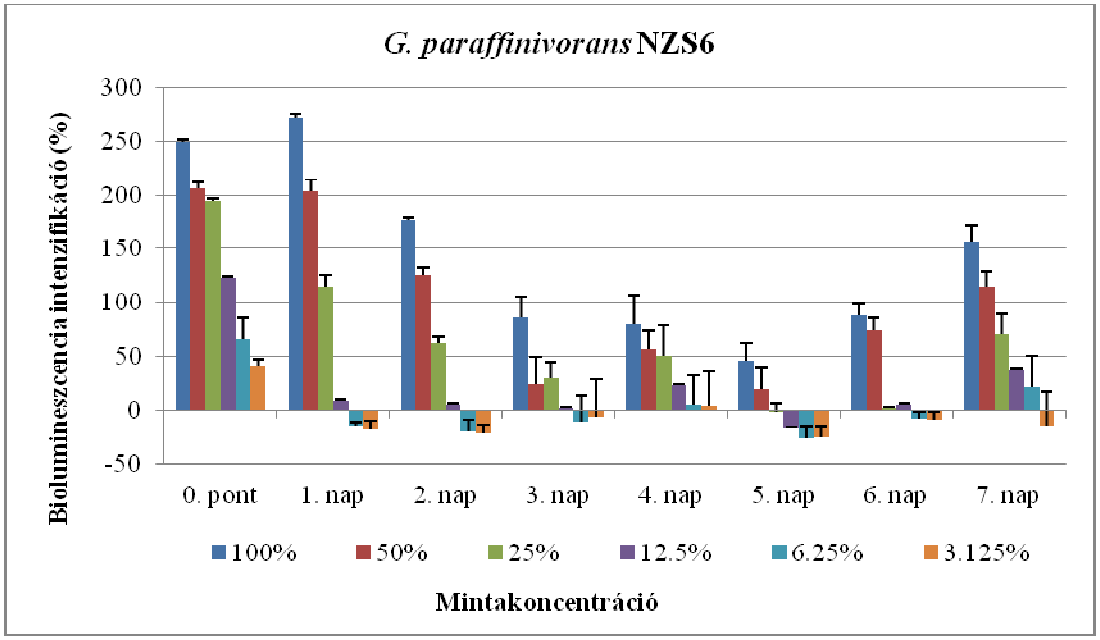
4.8. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus pyridinivorans* K402 zearalenon metabolizációja során



4.9. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus pyridinivorans* K404 zearalenon metabolizációja során

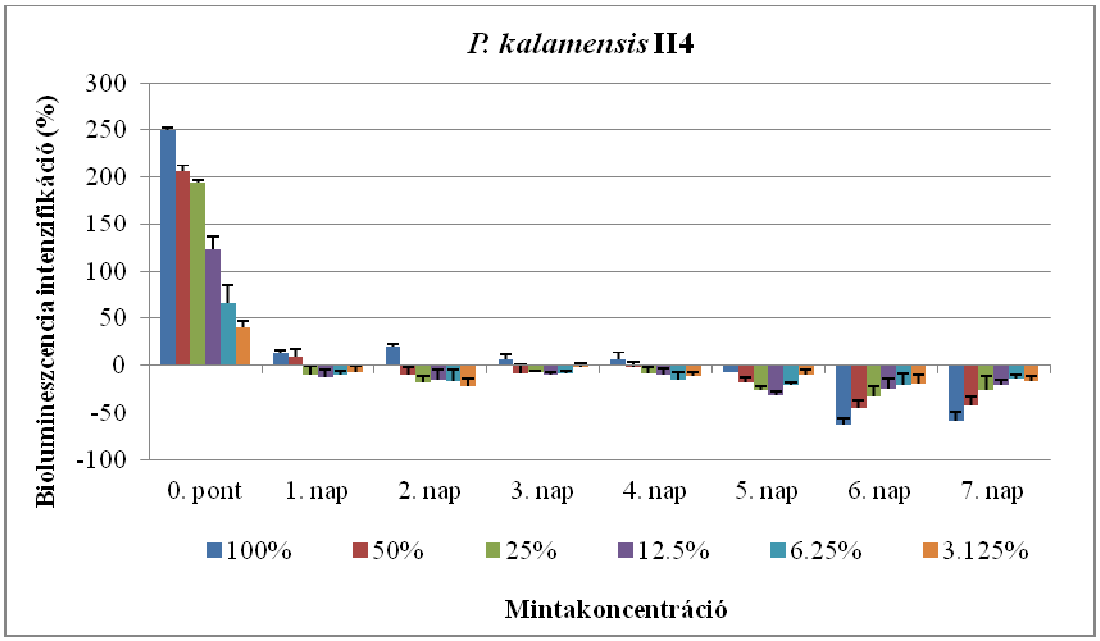
A 4.5. sz. táblázat szerint a *Gordonia paraffinivorans* NZS6 jelzésű törzsnél volt egyedül eltérés a kémiai analitikai és az immunkémiai mérések adatai között. Kiváló ZEA bontási potenciállal rendelkezik a HPLC vizsgálat alapján (98%), míg az ELISA csupán 79%-os bontást jelzett. Ugyanakkor a biológiai hatásmérés eredményei alapján nem szűnt meg a hormonhatás. A 4.10. sz. ábrán jól látható, hogy a toxin bontása megindult, ami egészen a kísérlet közepéig tartott, majd a 6. naptól a hormonhatás újra emelkedni kezdett, mely valószínűsíthetően az ösztrogén hatású metabolitok termelésével magyarázható.

A kémiai, immunanalitikai tesztek során tapasztalt ellentmondás feloldására magyarázatot adhat a ZEA és annak metabolitjai között lejátszódó keresztreakciók az ELISA mérés során. A tesztben alkalmazott 201072-88 monoklonális antitest szakirodalmi adatok alapján a következő keresztreakciókat mutatja: zearalanon (138 %), α-zearalenol (91%), β-zearalenol (21%), α-zearalanol (69%), β-zearalanol (6%). Tehát a teszt a képződő metabolitokat is érzékeli, így a ZEA-ra adott végkoncentráció e vegyületeket is tartalmazhatja – szemben a HPLC vizsgálat eredményeivel. Ezen hormonhatású metabolitok megjelenését támasztja alá a BLYES teszt is a tapasztalt 150%-os biolumineszcencia intenzifikácóval.

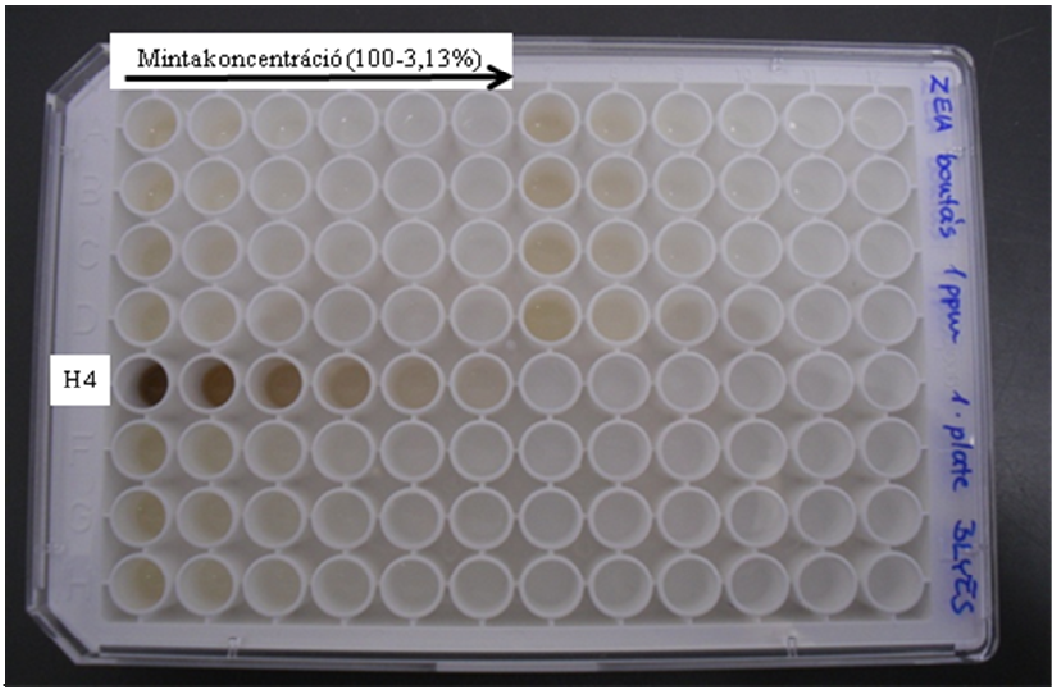


4.10. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Gordonia paraffinivorans* NZS6 zearalenon metabolizációja során

A *Pseudoxanthomonas kalamensis* H4 jelzésű törzset a kiválóan bontó törzsek közé soroltam az analitikai eredmények szerint (~ 98% bontás), viszont a biológiai hatásmérés alapján ez nem állítható teljes bizonyossággal. A 4.11. sz. ábrán látható, hogy lumineszcencia gátlás következett be, ami alapján egy citotoxikus hatás lenne feltételezhető. A BLYR tesztszervezettel viszont nem volt kimutatható ilyen hatás. Ebben az esetben a H4 törzs olyan sötétbarna pigmentet választott ki (4.2. sz. kép), melynek árnyékoló hatása miatt nem volt detektálható a lumineszcencia változás. Erős pigment termelő mikroba törzsek esetén a tesztrendszer nem alkalmazható, annak további módosítása szükséges.



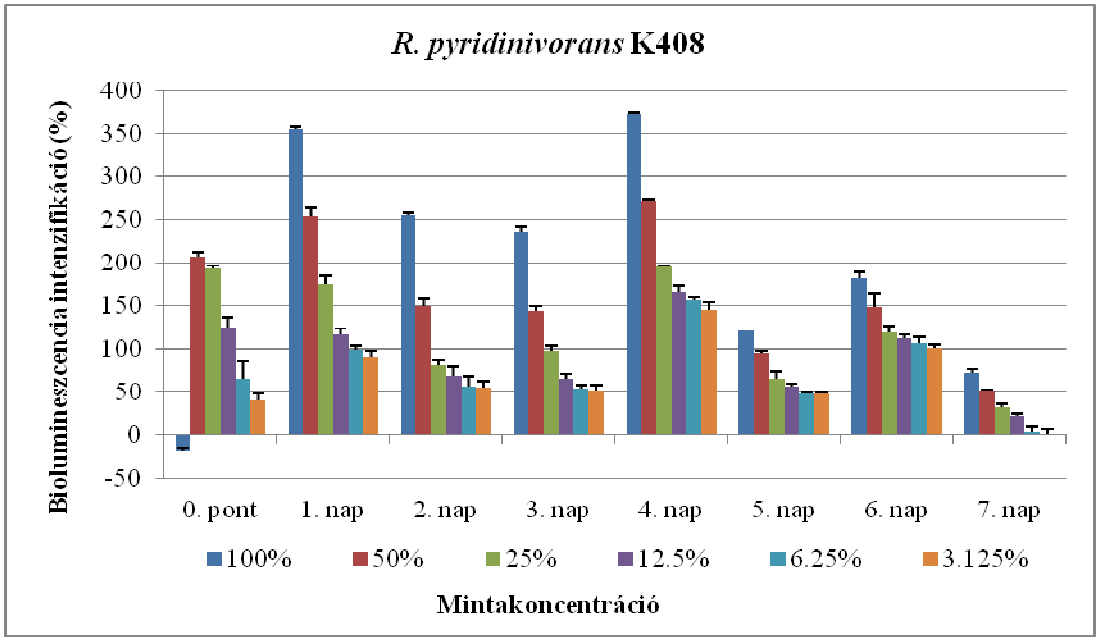
4.11. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Pseudoxanthomonas kalamensis* H4 zearalenon metabolizációja során



4.2. sz. kép: A *Pseudoxanthomonas kalamensis* H4 törzs zearalenon-bontási kísérlet mintáinak (7. nap) hígítási sora és vizsgálata BLYES teszttel (forrás: a szerző saját felvétele, 2011)

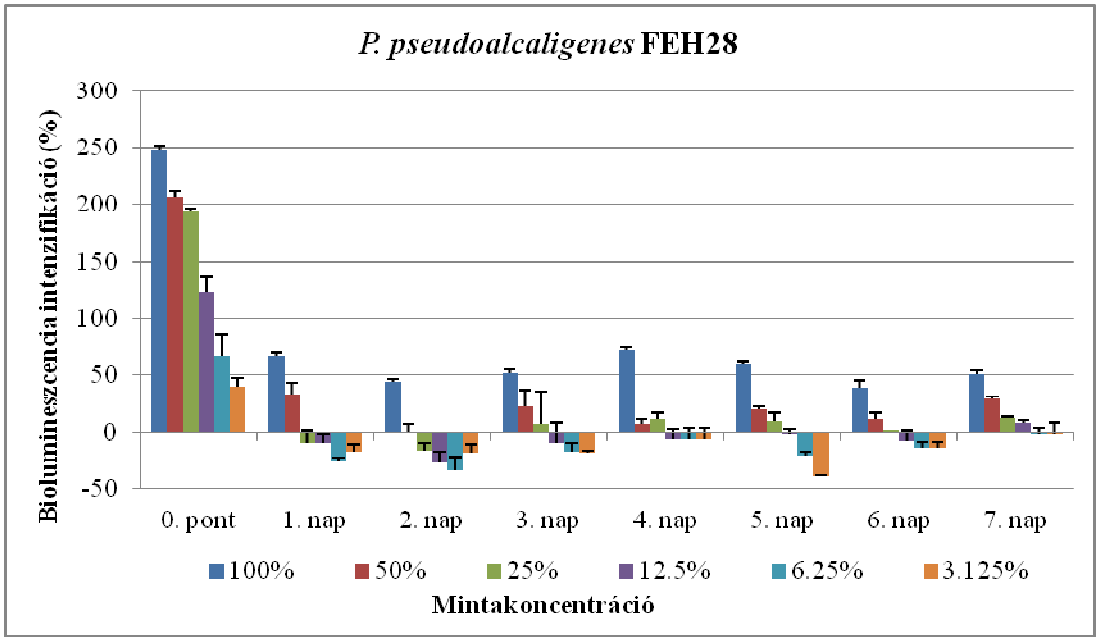
II. Jó zearalenon bontási képességgel rendelkező mikroba törzsek

A *R. pyridinivorans* K408 mikroba esetében tapasztalt bontás látható a 4.12. sz. ábrán. Érdekes módon az első napra hormonhatás emelkedés volt tapasztalható a kiindulási értékhez képest, majd a következő két nap folyamán a minták hormonhatása csökkent, a 4. napon ismét egy kiugró emelkedés volt tapasztalható. A kísérlet másik felében viszont újra jelentős csökkenés figyelhető meg. A törzs jól bontotta a ZEA-t, de ahogyan az analitikai eredmények is mutatták, nem volt annyira hatékony, mint a fentebb említett kiválóan bontó három törzs, a *S. cavourensis* K14, a *R. pyridinivornas* K402 és a *R. pyridinivorns* K404.



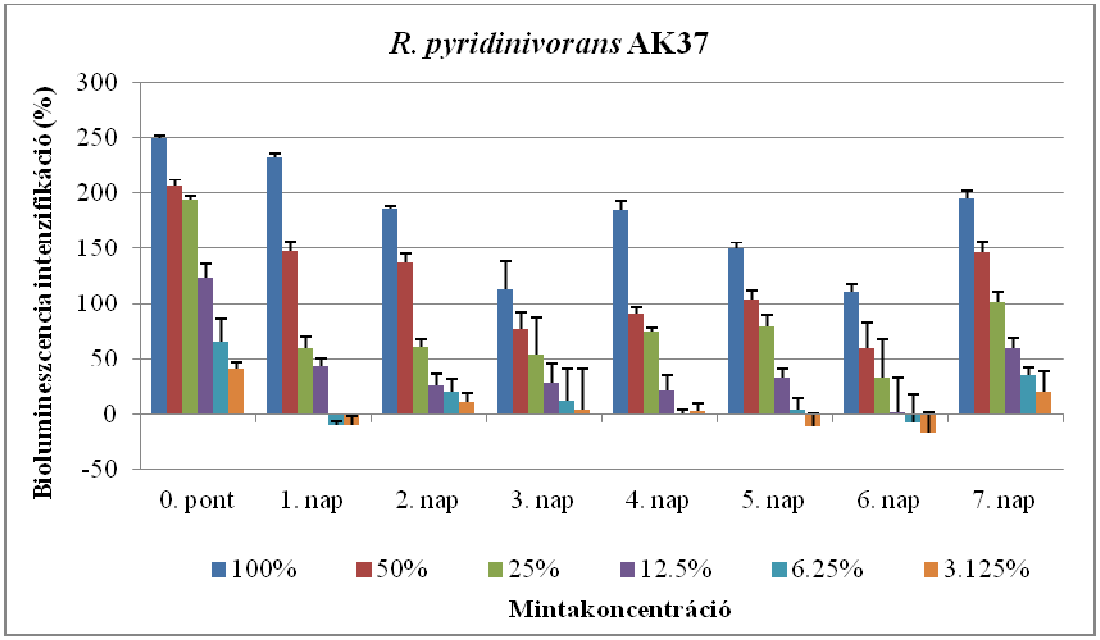
4.12. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus pyridinivorans* K408 zearalenon metabolizációja során

A 4.13. sz. ábráról leolvasható, hogy a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* FEH28 törzs bár nem szüntette meg a hormonhatást, de már az 1. napra jelentős csökkenést eredményezett és ez az érték volt jellemző a bontási kísérlet végéig.

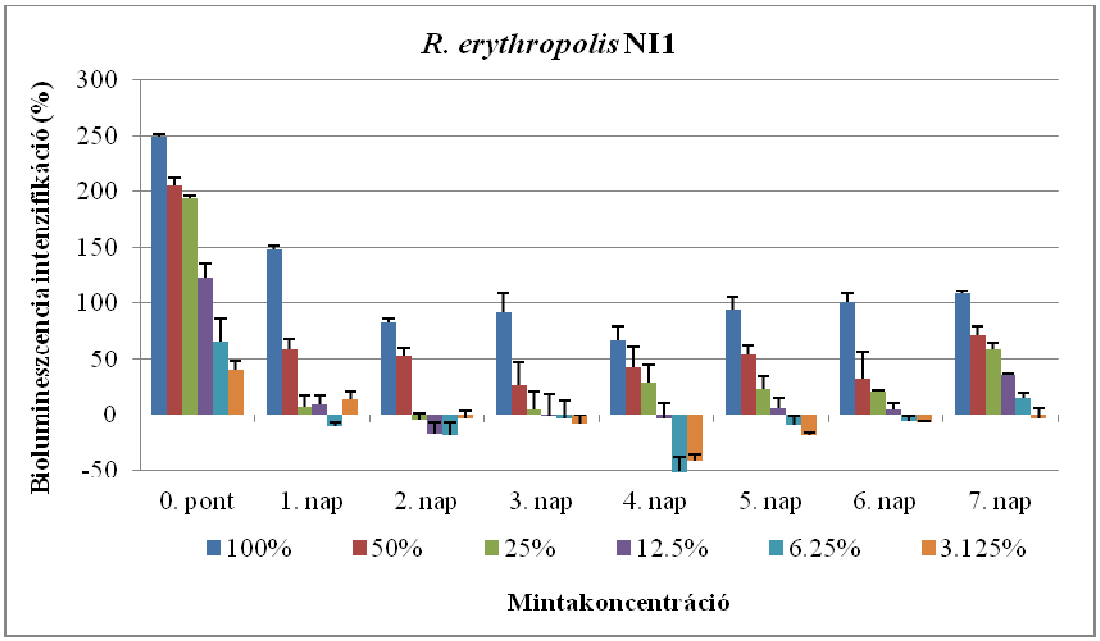


4.13. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* FEH28 zearalenon metabolizációja során

R. erythropolis NI1 és a *R. pyridinivorans* AK37 törzsek esetében is jól látszik a 4.14-15. sz. ábrán, hogy a kezdeti értékekhez képest történt bizonyos mértékű biológiai hatás csökkenés, ám nem szüntették meg a teljes hormonhatást. Az AK37 esetében nem volt folyamatos a hormonhatás csökkenés, hiszen egy emelkedés is volt tapasztalható a 4. napon, bár kisebb mértékű, mint a korábbi K408 jelzésű törzs esetében.

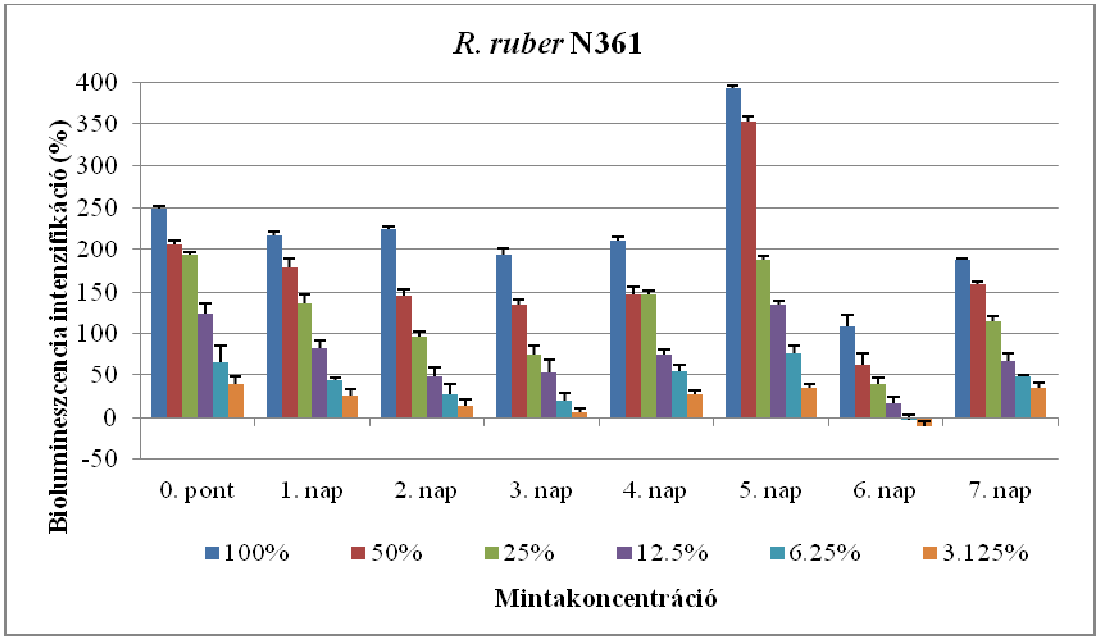


4.14. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 zearalenon metabolizációja során



4.15. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus erythropolis* NI1 zearalenon metabolizációja során

A *R. ruber* N361 a kémiai- és immunoanalitikai eredmények alapján 50% felett bontotta a ZEA-t, de a 4.16. sz. ábráról leolvasható, hogy csak kismértékben csökkent a minta hormonhatása a kísérlet során. Az előbbi példákhoz hasonlóan (K4078, AK37) ebben az esetben is volt hormonhatás növekedés az 5. napon, mely ráadásul a kezdeti értékhez képest is magasabb volt. A hormonhatás csökkenése végül a 6. napon következett be.

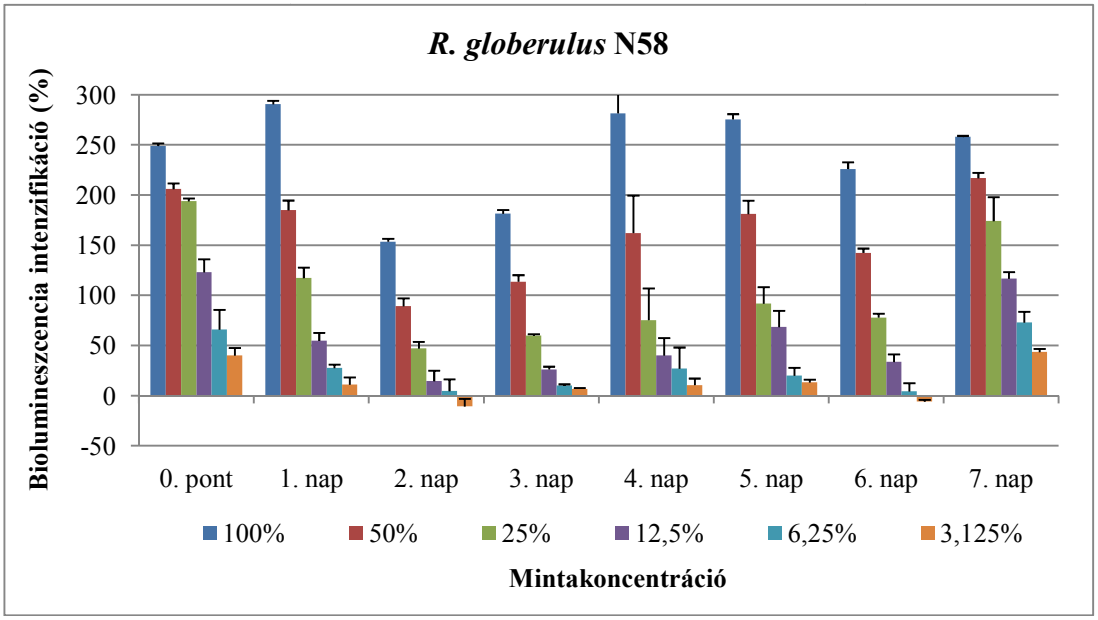


4.16. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus ruber* N361 zearalenon metabolizációja során

III. Elégtelen bontási potenciállal rendelkező törzsek

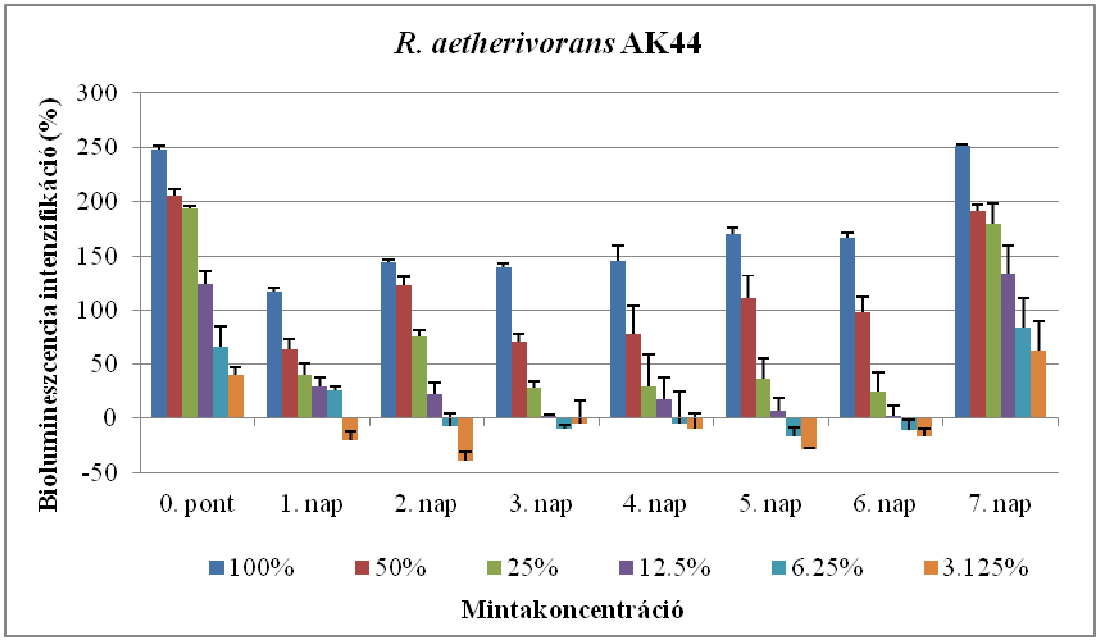
Az analitikai eredményekkel összhangban a BLYES teszt alapján is két törzs a *Rhodococcus aetherivorans* AK44 és a *R. globerulus* N58 bizonyult a legkevésbé alkalmasnak a ZEA bontására.

A *R. globerulus* N58 jelzésű törzset mutató 4.17. sz. ábrán jelentős hormonhatás ingadozást figyelhetünk meg. Már a 2. naptól kezdve bekövetkezett egy csökkenés, viszont a 4. napon mért biolumineszcencia intenzifikáció elérte az 1. napon mért értéket. Ezt a megemelkedett hatást a törzs már nem tudta megszüntetni a bontási kísérlet végére, így hatékonysága elégtelennek bizonyult.



4.17. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus globerulus* N58 zearalenon metabolizációja során

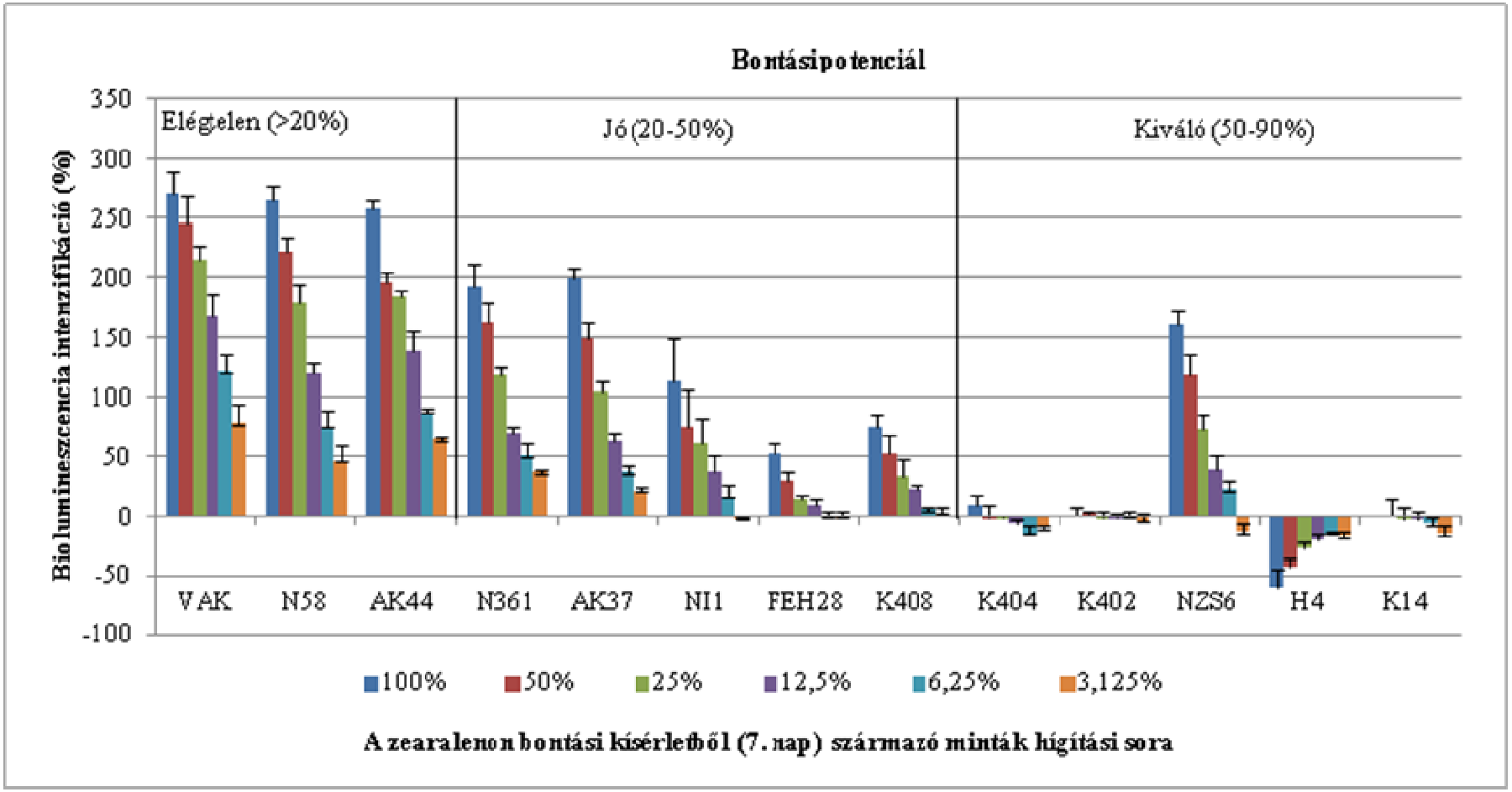
A *R. aetherivorans* AK44 törzset mutató 4.18. sz. ábrán megfigyelhetjük, hogy bár az első napra csökkent a hormonhatás, a kísérlet 7. napjára a kiinduló ponttal megegyező hatást mértünk.



4.18. sz. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus aetherivorans* AK44 zearalenon metabolizációja során

4.3.4 A zearalenon bontási kísérlet végpontján tapasztalt hormonhatás összegző értékelése és összevetése a kémiai- és immunanalitikai vizsgálatokkal

A különböző mikroorganizmusokkal végzett zearalenon bontási vizsgálatok során a BLYES teszttel a kísérletek végén (7. nap) mért hormonhatások értékeit a 4.19. sz. ábra grafikonja foglalja össze.



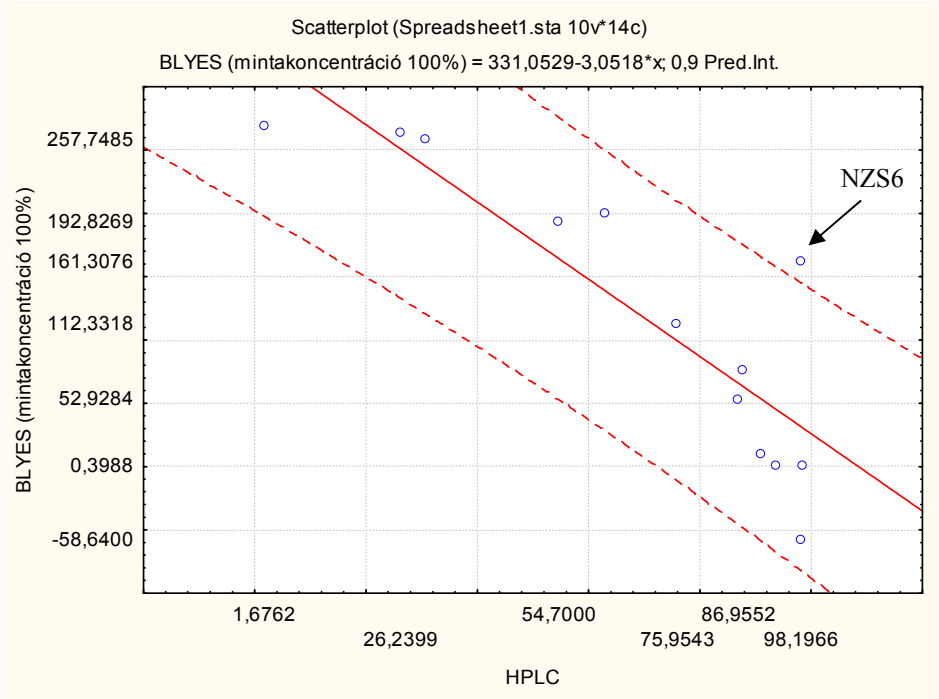
4.19. sz. ábra: A zearalenon bontási kísérletből származó minták ösztrogénhatásának elemzése BLYES teszttel

A 4.19. sz. ábra és a vizsgálataim alapján elmondható, hogy a hormonhatás-eredmények, a kémiai analitika valamint az ELISA teszt eredmények korrelálnak egymással. A statisztikai értékelésnél a HPLC és ELISA eredméynek tekintetében a Pearson-féle korrelációs együttható 0,98; az ELISA és BLYES teszt minden hígítás esetben -0,91 és -0,97 között volt, tehát igen szoros fordított arányú összefüggés tapasztalható; míg valamivel alacsonyabb korrelációs értéket (-0,87 és -0,97 között) kaptunk a kémiai analitika és a a BLYES teszt hígításait elemezve, amelynek magyarázatára a 4.20. sz. ábrán visszatérünk. Mindazonáltal elmondható, hogy a vizsgált mikroorganizmusok többségénél a rosszabb degradációs képesség a BLYES tesztszervezetnél magasabb lumineszcencia értékkel jár, tehát kifejezettebb hormonhatás tapasztalható.

A zearalenon bontására alkalmas mikroorganizmusok részletes értékelése alapján megállapítható, hogy az elégtelen bontási képességgel rendelkező törzsek (N58, AK44) bontási folyamatából származó felülúszó minták hormonhatása közelít a mikrobamentes kontroll (vak) hatásához.

A jó bontási képességgel rendelkező mikrobák esetében tapasztalt lumineszcencia intenzitás kisebb, mint a rosszul bontó törzseknél tapasztalt, de nagyobb, mint a kiváló bontási képességgel rendelkező mikroba törzsek esetében.

A kiváló bontási képességgel rendelkező törzsekkel folytatott kísérletek végén a hormonhatás, egy kivételtől eltekintve, a mintákban nem kimutatható. A *Gordonia paraffinivorans* NZS6 jelzésű mikroba a kémiai analitika alapján kiemelkedő, 98,20%-os bontási potenciállal jellemezhető, míg az ELISA eredmények csupán 78,89% ZEA csökkenést jeleztek, továbbá a hormonhatás esetében is inkább a gyengébb bontási képességgel rendelkező mikroorganizmusokhoz hasonló eredményeket kaptunk, azaz a kísérlet végére a ZEA ösztrogén hatása nem szűnt meg teljes mértékben. Azt, hogy az analitikai eredmények és a BLYES tesztek korrelálnak egymással, már korábban leírtam, de a korreláció számszerű értéke mellett érdemes a változók pontfelhő (scatter plot) diagramját is megnézni, mert a két információ együttesen ad teljes felvilágosítást a változók viselkedéséről. A 4.20 sz. ábrán egyértelműen látszik egy kiugró érték, ami az NZS6 jelzésű mintának felel meg. Mindezek alapján elmondható, hogy az NZS6 jelzésű *G. paraffinivorans* törzs képes a ZEA kémiai szerkezetének megbontására, de a keletkezett bontási termékek további bontására már nem, ami maradék hormonhatást eredményezett.



4.20. sz. ábra: A bontási kísérletből származó minták HPLC és BLYES teszt eredményeinek statisztikai összefüggése és a kiugró értékek

A vizsgált mikroba törzsek közül további biodetoxifikációs célra a *Streptomyces cavourensis* K14 jelzésű törzs javasolt, amely a HPLC és ELISA tesztekben is kimagasló ZEA lebontási eredményeket mutatott és teljes mértékben megszüntette a toxin káros ösztrogén hatását.

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

(6. tézis) A biodetoxifikációs eljárások értékeléséhez végzett módszerfejlesztés és az adaptált, élesztő alapú bioriporter BLYES teszt alkalmas a zearalenon mikotoxint a leghatékonyabban és a legkisebb maradék hormonhatással lebontó, gyakorlati alkalmazásokra felhasználható mikroba törzsek kiválasztására, amelyek a vizsgálatok alapján a *Streptomyces* és a *Rhodococcus* nemzetség képviselői.

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A szakirodalomban egyre több szerző tárgyalja az AFB1 vagy a ZEA bontására alkalmas mikroorganizmusok degradációs képességét (TENIOLA ET AL., 2005; ALBERTS ET AL., 2006; ALTALHI & EL-DEEB, 2009; YU ET AL., 2011), amelyek leginkább egy olyan biodetoxifikációs rendszer (Mycofix® Plus) kialakítását célozzák, amilyet a Biomin Ltd. már létrehozott ZEA és OTA esetében (HTTP9). Ezen célok megvalósítása érdekében az első feladat optimális screening rendszerek kialakítása, amely az AFB1 esetében a genotoxikus és citotoxikus hatást, a ZEA esetében az ösztrogén hatást képes detektálni. Ennek érdekében az AFB1 és a ZEA legjellemzőbb káros biológiai hatásának vizsgálatára különböző bioteszteket alkalmaztam és ezek módszerfejlesztését végeztem el.

A mikotoxinok biomonitoringja céljából alkalmazott bakteriális biotesztek között szerepelt a citotoxicitás vizsgálatra alkalmas *A. fischeri* lumineszcencia gátlási teszt, a genotoxicitás vizsgálatra alkalmas *SOS*-Chromo teszt, és a hormonhatás detektálását célzó eukarióta sejtet alkalmazó biolumineszcencia alapú vizsgálati rendszer (*S. cerevisiae* BLYES) a hozzá tartozó konstitutív kontroll (*S. cerevisiae* BLYR) törzzsel.

Az *A. fischeri* tesztszervezet széles körben alkalmazott környezeti minták ökotoxicitásának megállapítására, de a mikotoxinokra mutatott érzékenysége még alig felderített. Ezidáig mindössze egyetlen publikáció foglalkozott ennek a módszernek mikotoxinokra alkalmazott vizsgálatával, ahol az AFB1 toxint 10 µg/ml, a DON toxint 20 µg/ml koncentrációban vizsgálták a tesztszervezet 50 ml-es tenyészetével Erlenmeyer lombikokban, 3,5-10-15-25 órás kontaktidőkkel (SARTER ET AL., 2008). A módszerfejlesztés során mikrotiter-lemez alkalmazását vezettem be, amellyel lehetővé vált nagy mennyiségű minta egy időben történő gyors tesztelése. Szélesebb koncentrációtartományokban vizsgálva a mikotoxinokat megállapítottam, hogy az AFB1 1 µg/ml-es koncentrációban is gátló hatással van a tesztszervezetre, míg a ZEA 15 µg/ml-es koncentrációban mutatott 50%-os gátló hatást a tesztszervezetre. A kifejlesztett módszerrel meghatározásra kerültek az AFB1 esetében az EC50 értékek ($EC50_{(3,5h)}$=17,1 µg/ml, $EC50_{(10h)}$=3,0 µg/ml, $EC50_{(15h)}$=3,8 µg/ml, $EC50_{(25h)}$=9,1 µg/ml), amelyeket összehasonlítva az ISO 11348 szabványsorozat szerinti mérés eredményével ($EC50_{(15\ min)}$=23,3 µg/ml), megállapítható, hogy az érzékenység jelentősen javítható. Ugyanakkor a teszt direkt takarmány vagy élelmiszer monitoringra nem alkalmazható, mivel az érzékenysége a jelenleg hatályban lévő jogszabályban meghatározott aflatoxin határérték felett van egy nagyságrenddel; viszont alkalmas mikotoxin-bontó mikrooganizmusok vizsgálatára.

A genotoxicitás vizsgálatra alkalmazott *SOS*-Chromo teszt méréseim alapján kevésbé alkalmas a ZEA biomonitoringjára, hiszen csak 10 µg/ml-es koncentrációban indukálta az *E. coli* PQ37 tesztszervezet *SOS*-repair rendszerét, viszont alkalmas az AFB1 vizsgálatára, hiszen még 0,078 µg/ml koncentrációjú oldatban is kimutatható mutagén hatása, amely közelíti a jelenleg hatályos élelmiszer- és takarmány-alapanyagokra vonatkozó határértékeket.

Az *SOS*-Chromo tesztet a kutatások mellett gyakorlati célokra is alkalmaztam, miszerint *Aspergillus flavus* hazai izolátumainak AFB1 termelő képességét mutattam ki vele Magyarországon elsőként. Vizsgálataim rámutattak a biotesztek alkalmazásának fontosságára, hiszen *A. flavus* törzsek analitikai módszerekkel meghatározott AFB1 termelő képességéről derült ki, hogy egy kevésbé intenzíven AFB1-et termelő törzs is képes volt nagyobb mutagén hatás kiváltására. Következtetésként az is levonható, hogy a megváltozott éghajlati jellemzők hatására szembesülünk eddig nem tapasztalt problémákkal, a területileg nem jellemző károsító gombák teret nyerhetnek hazánkban, azaz AFB1 jelenlétével már számolnunk kell Magyarországon is (DOBOLYI ET AL., 2011)

A fentebb említett mindkét módszer alkalmas mikotoxin-bontó mikrobák screenelésére. Az *SOS*-Chromo teszt az AFB1 legveszélyesebb biológiai hatásának kimutatására alkalmas, így szelektálhatóak azok a mikroba törzsek, amelyek mutagén hatású metabolitok nélkül képesek az AFB1 biodegradációjára. Az *A. fischeri* lumineszcencia teszt biodegradációs vizsgálatokhoz történő modifikálás után kiválóan alkalmas mikroba törzsek biodetoxifikációs tulajdonságának vizsgálatára, hiszen jól mutatja az AFB1 jelenlétét és/vagy eliminálódását a bontási rendszerekből. A két bioteszt egyidejű alkalmazásával kialakítottam egy kombinált toxikológiai profilt, amelynek segítségével kiválasztottam a legaktívabb és biztonságos – káros metabolitokat nem termelő – mikroorganizmusokat további biodetoxifikációs célokra. A vizsgáltak közül három mikroba, a *Rhodococcus rhodochrous* NI2, *R. pyridinivorans* K403C és a *Pseudomonas putida* DN1 szüntette meg az AFB1 mutagén hatását 72 óra elteltével. Érdekes eredményeket adott a lumineszcencia vizsgálat, miszerint a rhodococcus-ok, két kivételtől (*R. rhodochrous* NI2, *R. pyridinivorans* K402) eltekintve gátolták az *A. fischeri* fénykibocsátását, néhány esetben ezek a gátlások még a mikroba mentes negatív kontrollét is meghaladták (*Rhodococcus erythropolis* GD2B, *Rhodococcus pyridinivorans* K403C, K405); míg a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek szinte teljesen megszűntették a citotoxikus hatást. Ez a felismerés előrevetíti, hogy az AFB1 metabolizáció nem csak genuszok között, hanem genuszon belül is különbözhet, sőt különböző *Rhodococcus* törzsek különböző lebontási útvonalakat használhatnak az AFB1

degradációja során. Egyes esetekben lumineszcencia intenzifikációt is tapasztaltam. Egyrészről ismeretes az a tény, hogy toxikus anyagok kis dózisa stimuláló hatású lehet, másrészről a termelődött bontási melléktermékek is mimikálhatnak egy szubsztrátot, amely stimuláló hatással bír. Hasonló lumineszcencia intenzifikációt tapasztaltak Sarter és munkatársai (2008) a DON esetében.

A kombinált toxikológiai profil alapján a *R. rhodochrous* NI2 bizonyult a legmegfelelőbb törzsnek további felhasználásra, mivel a legmeggyőzőbb toxinbontást végezte a kísérletekben (AFB1 koncentráció 2 µg/ml és 4 µg/ml) és a bontás után nem volt sem geno-, sem citotoxicitás tapasztalható. A *P. putida* DN1 és a *R. pyridinivorans* K402 törzsek – az első kisebb degradációs potenciállal a második maradék gyenge mutagén hatással – szintén alkalmasak lehet további biodegradációs célokra.

Az *SOS*-Chromo teszt és az *A. fischeri* teszt együttes alkalmazása nagy jelentőséggel bír, hiszen rámutat arra, hogy a toxindegradáció során veszélyes metabolitok keletkezhetnek, nagyarányú toxinbontás mellet is lehetséges maradék cito- és genotoxicitás a bontási rendszerekben.

A ZEA vizsgálata során egy olyan biolumineszcencián alapuló hormon és citotoxicitás vizsgálatra alkalmas tesztrendszert (BLYES, BLYR) alkalmaztam, amely akár direkt takarmánybiztonsági célokra is felhasználható, hiszen a BLYES tesztszervezet a jelenleg érvényes határértékek alatt képes a ZEA kimutatására.

Ezt a biológiai hatáselemző rendszert adaptáltam a toxinbontási kísérletekhez. A szakirodalomban számos ZEA biodegradációjára alkalmas mikroorganizmust jegyeztek le, ám kevés esetben bizonyított a hormonhatás megszűnése is, amelyet két kutatócsoport bizonyított az utóbbi években (YU ET AL., 2011; VEKIRU ET AL., 2010). Munkám során célom volt egy olyan bakteriális biodegradáción alapuló toxinmentesítési eljárás kezdeti lépéseinek kifejlesztése, amely a hormonhatás megszűnésével is jár. Ennek érdekében egy olyan screening eljárást dolgoztam ki, amellyel akár több száz tételből álló törzsgyűjtemény biodegradációs potenciállal rendelkező tagjainak gyors és hatékony kiválasztása érhető el. Ez a komplex vizsgálati rendszer integrálja a kémiai analitikai, az immunanalitikai és a toxikológiai eljárásokat. A kialakított módszerrel kiválaszthatók azok a ZEA mikrobiális bontására alkalmazható baktériumtörzsek, amelyek káros melléktermékek nélkül képesek a toxin bontására. Az általam vizsgált törzsek közül a ZEA bontására a *S. cavourensis* K14 jelzésű törzs bizonyult a legalkalmasabbnak, amely a HPLC és ELISA tesztekben is kimagasló, több mint 90%-os bontási hatékonysággal volt jellemezhető, valamint nem eredményezett a bontás folyamán kimutatható káros metabolitokat. A *R. pyridinivorans* K402

és K404 szintén magas bontási potenciál (HPLC eredmények alapján több mint 85%, ELISA eredmények alapján több mint 90%) mellett képes volt a ZEA ösztrogén hatásának megszüntetésére a bontási folyamat végére.

Kísérleteim igazolták azt, hogy az analitikai eredmények önmagukban nem mindig elégségesek, hiszen a biológiai rendszerekben olyan folyamatok játszódhatnak le, amelyek analitikai módszerekkel már nem követhetőek. A *G. paraffinivorans* NZS6 jelzésű törzs HPLC eredményei alapján kiváló toxinbontással rendelkezik. A ZEA 98%-ban eliminálódott a biodegradációs rendszerből, viszont az ELISA mérések már csupán 76%-os toxin-degradációt mutattak. A ZEA bomlása során keletkező metabolitok megjelenésével az ELISA tesztben alkalmazott monoklonális antitest ezen köztitermékeket is ZEA-ként detektálta, amely a keresztreakcióknak tudható be. A keletkező metabolitok jelenlétét a BLYES teszttel is igazoltam, hiszen e törzs tekintetében tapasztaltam jelentős maradék hormonhatást is, amely a káros köztitermékek jelenlétét igazolja.

A biodegradáció során hormonhatású metabolitok keletkezéséről nemcsak az NZS6 jelzésű baktérium törzs esetében beszélhetünk. A kísérletekben résztvevő törzsek közül továbbiak esetében is megfigyelhető hormonhatás emelkedés a bontás során (*Rhodococcus pyridinivorans* K408, AK37, *Rhodococcus ruber* N361), ám az említett NZS6 jelzésű *G. paraffinivorans* baktérium törzzsel szemben ezek a mikroorganizmusok képesek voltak a káros köztitermékeket is kisebb-nagyobb mértékben elbontani a toxinnal együtt, így a detoxifikációs folyamat végén a káros hatás jelentősen csökkent/megszűnt. Fontos megemlíteni viszont, hogy a bontási folyamatban azokon a pontokon, ahol a hormonhatás jelentősen megemelkedett kockázattal kell számolni. Ezekkel szemben ki kell emelnem azt az általam vizsgált két mikroba törzset, amelyek vizsgálata során ilyen jellegű hormonhatás növekedés nem volt megfigyelhető, azaz kockázatértékelési szempontból a legalkalmasabbnak mondhatók gyakorlati felhasználásra. Ezek a kiválóan bontó *Streptomyces cavourensis* K14 és a jól bontó *Rhodococcus erythropolis* NI1 jelzésű törzsek voltak.

Fenti eredmények hangsúlyozzák az biológiai hatásmérésen alapiuló tesztek fontosságát a biodegradációs eljárások értékelése során. Az adaptált és kifejlesztett biológiai hatáselemző rendszerek a törzsgyűjtemények vizsgálata mellett, alkalmazhatóak genetikai eszközökkel javított mikroorganizmusok screening vizsgálata céljából is. Javasolható egy UV mutagenezissel kialakított klónkönyvtár létrehozása, majd az AFB1 esetében a kombinált toxikológiai profillal, ZEA esetében pedig az élesztő alapú bioriporter rendszerrel értékelni a

mutáns törzsek toxinbontó képességét. A vizsgálati rendszerekkel nagy biztonsággal kiválaszthatóak a megnövekedett bontási képességgel rendelkező egyedek.

A kialakított rendszer másik fontos felhasználási területe lehet a ZEA és AFB1 biológiai lebontásának vizsgálata. Egy tízezer klónból álló transzpozon mutagenezis könyvtár kialakítása után, segítségével költséghatékony módon kiválaszthatóak a nullmutánsok, amelyeket tovább vizsgálva beazonosíthatók a mikotoxin bontásért felelős génszakaszok. Az ilyen jellegű munkákat nagyban segítik az adott mikroba teljes genom adatai, amely a *R. pyridinivorans* AK37 esetében már rendelkezésünkre állnak (KRISZT ET AL., 2011). Ezek a szekvenciák lehetőségeket biztosítanak eddig ismeretlen toxinbontásért felelős enzimgének azonosítására is. További cél lehet a kiválasztott, ipari folyamatokban használható enzimek klónozása, biokémiai jellemzése, szinergista módon működő enzim-mixek kialakítása és optimalizálása.

6.ÖSSZEFOGLALÁS

A mikotoxinok a mikroszkópikus gombák másodlagos anyagcseretermékei, amelyek emberekre és állatokra nézve is jelentős egészségügyi kockázatot jelentenek. Ide tartozik az *Aspergillus* spp. által termelt aflatoxin-B1 (AFB1), ami az egyik legveszélyesebb mikotoxin, köszönhetően mutagén, karcinogén, citotoxikus, teratogén és immunszupresszív tulajdonságának; illetve a *Fusarium*-ok által termelt zearalenon (ZEA), ami ösztrogénszerű hatása miatt reprodukciós zavart okoz gerinces állatokban. E két mikotoxin erős biológiai hatása felveti olyan alternatív vizsgálati módszerek szükségességét a hagyományos analitikai mérések mellett, amelyek egy biomonitoring rendszer alkotórészeként képesek a kockázatot jelentő mikotoxin-szintek indikációjára.

Az említett biológiai hatásmérésen alapuló tesztek a monitoring mellett alkalmasak lehetnek a biodetoxifikációs eljárások hatékonyságának mérésére is. Ugyanis a mikotoxin-eliminálási módszerek egyik ígéretes ágát képezik a biodetoxifikációs eljárások, amelyeken belül egyre nagyobb figyelmet kapnak a mikotoxinok lebontására képes mikroorganizmisok. Azonban meglepően kevés, a biotranszformációs eljárások biológiai hatását is értékelő, szakirodalmi adat áll rendelkezésre.

Munkám során az AFB1 és ZEA biológiai hatását vizsgáltam pro- és eukarióta mikroba tesztrendszerekkel: egyrészt az *Escherichia coli*-ra optimalizált genotoxicitást elemző *SOS*-Chromo teszttel (1), és a citotoxicitás vizsgálatára kialakított, *Aliivibrio fischeri* alapú módszerrel (2), másrészt az ösztrogén hatás vizsgálatára alkalmazott *Saccharomyces cerevisiae* BLYES teszttel (3), illetve az ehhez tartozó, toxicitást mérő, BLYR kontroll törzzsel (4). Meghatároztam a tesztek érzékenységét a vizsgált toxinokra és adaptáltam a vizsgálatokat toxinbontási eljárások támogatására, annak érdekében, hogy a megfelelő degradációs képességgel rendelkező, de biztonságos mikroorganizmusokat szelektáljam. A toxinhatás monitorozásán és a mikroorganizmusokat detoxifikációs aktivitásnak szűrésén kívül az *SOS*-Chromo tesztet magyarországi gabonamintákról származó *Aspergillus flavus* izolátumok toxintermelési kockázatának elemzésére is felhasználtam.

Az AFB1-re vonatkozó vizsgálataim eredményeképpen megállapítottam, hogy az *SOS*-Chromo teszt és az *A. fischeri* mikroorganizmussal végzett citotoxicitási teszt érzékenysége nem teszi lehetővé élelmiszervizsgálati célokra történő alkalmazásukat, hiszen csak a jelenlegi szabályozási szintek felett képesek az AFB1 kimutatására, de rendkívül hatékony eszközök biodetoxifikációra képes mikroba törzsek tesztelésére. Ennek érdekében az *SOS*-Chromo tesztet és az *A. fischeri* tesztet adaptáltam toxinbontási kísérletekhez és a két teszt kombinálásával kialakítottam egy toxikológiai értékelési rendszert (kombinált

toxikológiai profilt), amellyel kiválaszthatóak egy standard vagy célzottan izolált törzsgarnitúrából az AFB1 bontásra legalkalmasabb mikroorganizmusok. A kombinált toxikológiai profil alapján az eddigi vizsgálat szerint a *Rhodococcus* és a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek bizonyultak a legmegfelelőbbeknek további biodetoxifikációs felhasználásra, mivel a hatékony toxinbontás mellett esetükben nem volt kimutatható sem geno-, sem citotoxikus metabolit.

A hormonhatás-vizsgálatok során a BLYES tesztszervezet alkalmasnak bizonyult akár direkt élelmiszer- és takarmányvizsgálati célokra is, hiszen a jelenleg hatályos határértékek alatt képes kimutatni a ZEA-t. Ezt az élesztő alapú bioriportert adaptáltam toxinbontási kísérletekhez és kialakítottam egy komplex értékelési rendszert, ami integrálja a kémiai analitika, az immunanalitika és a biológiai hatásmérő rendszerek előnyeit. Az alkalmazott komplex értékelési rendszerrel sikerült kiválasztanom a legmegfelelőbb mikroorganizmusokat, amelyek maradék ösztrogén- és citotoxikus hatás nélkül képesek a toxin bontására. Vizsgálataim alapján ZEA-bontásra a legígéretesebb törzsek a *Rhodococcus* és a *Streptomyces* nemzetséghez tartoznak.

A biológiai tesztek gyakorlati hasznosításaként magyarországi termőterületekről izolált *Aspergillus* törzsekkel fertőzött kukoricából származó mintákat vizsgáltam. A genotoxikus hatást mérő *SOS*-Chromo teszt segítségével Magyarországon elsőként igazoltuk takarmányalapanyagokból izolált *Aspergillus flavus* törzsek jelentős mértékű aflatoxin termelését.

Fentiek alátámasztják a biológiai tesztek alkalmazásának fontosságát a hagyományos analitikai módszerek mellett, hiszen olyan hatásokra mutatnak rá, amelyek a kémiai analitika előtt rejtve maradnak. Mindazonáltal a biológiai módszerek gyors, költségkímélő és megbízható tesztek, amelyek alkalmazásával akár több száz törzsből álló gyűjtemények screenelése is lehetővé válik.

7. ENGLISH SUMMARY

Mycotoxins are secondary fungal metabolites that pose serious health risks to humans and animals as well. Among the most hazardous mycotoxins are the aflatoxin-B1 (AFB1) produced by *Aspergillus* spp. due to its mutagenic, carcinogenic, teratogenic, immunomodulant and cytotoxic effects, and zearalenone (ZEA) produced by *Fusarium sp.* that causes various problems associated with reproduction thorough its estrogen effect. Significant biological effect of these mycotoxins pose the necessity of alternative monitoring methods beside conventional analitical methods; since biological monitoring systems are able to indicate the hazardous mycotoxin levels.

To eliminate mycotoxins, recently innovated biological methods came into prominance, taking advantage of the capability of certain microbes that utilize mycotoxins as an energy source. However, insufficient data present that evaluate the residual biologcal effect of biotransformation. The mentioned biological effect testing procedures, beside mycotoxin-monitoring, are suitable for evaluating the effectiveness of biodetoxification processes

In the present work biological effect of AFB1 and ZEA were investigated by procaryotic and eucaryotic test organisms: on the one hand with the genotoxicity testing *SOS*-Chromotest optimized for *Eserichia coli* (1), and with the cytotoxicity testing method that is based on *Aliivibrio fischeri* (2), on the other hand with the *Saccharomyces cerevisiae* BLYES strain for testing estrogenic effect (3), and with the BLYR control strain for measuring toxicity (4). Sensitivity of these tests was determined for AFB1 and ZEA and these biological effect testing procedures were adapted to mycotoxin degradatation for secelting safe microbes with the sufficient degradiong potential. Aside monitoring mycotoxins on the base of their biological effect and screening microorganisms on the base of their biodetoxification activity, *SOS*-Chromotest was applied for evaluating *Aspergillus flavus* isolates originated from Hungarian corn samples.

Experiments to investigate sensitivity of the test-organisms for AFB1 showed that *SOS*-Chromotest and *A. fischeri* test is not suitable for direct monitoring of food and feed stuffs, as it works at a much higher concentration than the current limits, though these biological effect testing procedures are effective tools for evaluating the biodetoxificaton capacity of miroorganisms. For that reason *SOS*-Chromotest and *A. fischeri* test were adapted to mycotoxin degradation experiments. By the combination of the two modified assays, the most appropriate microbes for AFB1 degradation were selected. On the base of this combined toxicity-profiling method strains belonging to the *Rhodococcus* and the *Pseudomonas* genus

proved to have effective toxin degradation without creating geno- and/or cytotoxic metabolites.

Results of the estrogen tests proved the applicability of BLYES test organism for direct monitoring of food and feed stuffs, as the thest is responsive for ZEA under the current limits. The yeast based bioriporter was adapted to experiment for testin mycotoxin biodegradation, and a comples evaluating system were created that integrates the advantages of chemical, immunanalitical and biological methods. With the useage of this complex evaluating method the most appropriate microorganisms with the weakest residual estrogen and/or cytotoxic effest were selected. On the base of this complex evaluating method the most promising strains belong to the *Rhodococcus* and the *Streptomyces* genus.

For utiliazing the biological effect testing prosedures for practical purposes, corn samples that were contaminated with *Aspergillus* strains isolated from Hungarian fields were examined. Foremost in Hungary, significant aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains were proved by the *SOS*-Chromotest that measures genotoxicity.

Above mentioned results underline the neccessity of biological tests beside conventional analitical methods, since those effects are revealed by these biological tests wich can not be detected by analitical methods. Nevertheless, biological methods are fast, cost-effective and reliable tests; moreover, strain collections with hundred of microbes can be screened by the use of these biologocal effect testing procedure.

8. MELLÉKLETEK

1. számú melléklet: Irodalomjegyzék

Bibliográfikus hivatkozások

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

ALBERTS, J.F, ENGELBRECHT, Y., STEYN, P.S., HOLZAPFEL, W.H., & VAN ZYL A. (2006): Biological degradation of aflatoxin-B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology,* 109 (1-2) 121–126. p.

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.

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.

AMBRUS Á., & SZEITZNÉ SZABÓ M. (2008): Élelmiszer- biztonsági helyzetelemzés és kockázatértékelés. Agroinform Kiadó: Budapest, 234 p.

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

AVANTAGGIATO, G., SOLFRIZZO, M., & VISCONTI, A. (2005): Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 22 379-388. p.

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

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

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

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

BOUDERGUE, C., BUREL, C., DRAGACCI, S., FAVROT, M-C., FREMY, J-M., MASSIMI, C., PRIGENT, P. (AFSSA); DEBONGNIE, P., PUSSEMER, L. (CODA-CERVA); BOUDRA, H., MORGAVI, D. (INRA CLERMONT-FERRAND); OSWALD, I. (INRA TOULOUSE); PEREZ, A.

(IRTA) & AVANTAGGIATO, G. (ISPA) (2009): Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *Scientific Report*, EFSA, CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01, 192 p.

BRAMS A, BUCHET JP, CRUTZEN-FAYT MC, DE MEESTER C, LAUWERYS R, & LÉONARD, A., (1987): A comparative study, with 40 chemicals, of the efficiency of the Salmonella assay and the SOS chromotest (kit procedure). *Toxicology Letters,* 38 (1-2) 123–133. p.

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.

CALOW, P. (eds.) (1993): Handbook of Ecotoxicology, Blackwell Science Ltd., 487 p.

CARVAJAL, M., AGUIRRE, J.J.E., DE GUADALUPE MOCTEZUMA, M., GONSEBATT M.E., & LÓPEZ, I.P. (2004): Minimal amount of aflatoxin B1 to produce a mutation in the Ames test with *Salmonella thyphimurium* TA-98. *Revista Mexicana de Micología,* 19 71-79. p.

CHRISTENSEN C.M.. & KAUFMAN H.H. (1969): Grain Storage. The Role of Fungi in Quality Loss. University of Minnesota Press. Minneapolis, MN., 153 p.

CHRISTENSEN. E.R. & NYHOLM N. (1984): Ecotoxicological assays with algae: Weibull dose-response curves. *Environmental Science Technology,* 18 (9) 713–718. p.

CIEGLER, A., LILLEHOJ, E.B., PETERSON, R.E., & HALL, H.H. (1966): Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology,* 14 (6) 934–939. p.

CZYZ, A., PLATA, K. & WÊGRZYN, G. (2002): Induction of light emission by luminescent bacteria treated with UV light and chemical mutagens. *Journal of Applied Genetics,* 43 377-389. p.

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.

D'MELLO, J.P.F. & MACDONALD, A.M.C. (1997): Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology,* 69 (1-3) 155–166. p.

DÄNICKE, S.(2002): Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat grain and of a detoxifying agent on rumen physiological parameters and in sacco dry matter degradation of wheat straw and lucerne hay in wethers. *Journal of animal and feed sciences*, 11 437-451.p.

DÄNICKE, S., GÄDEKEN, D., UEBERSCHÄR, K.H., MEYER, U. & SCHOLZ, H. (2002A): Effects of fusarium toxin contaminated wheat and of a detoxifying agent on performance of

growing bulls, on nutrient digestibility in wethers and on the carry over of zearalenone. *Archives of Animal Nutrition/Archiv fur Tierernahrung*, 56 245-261. p.

DÄNICKE, S., UEBERSCHÄR, K.H., HALLE, I., MATTHES, S., VALENTA, H., & FLACHOWSKY, G. (2002B): Effect of addition of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or *Fusarium* toxin-contaminated maize on performance of hens and on carryover of zearalenone. *Poultry Science*, 81 1671-1680. p.

DÄNICKE, S., MATTHES, S., HALLE, I., UEBERSCHAR, K.H., DÖLL, S., & VALENTA, H. (2003): Effects of graded levels of Fusarium toxin-contaminated wheat and of a detoxifying agent in broiler diets on performance, nutrient digestibility and blood chemical parameters. *British Poultry Science,* 44 113-126.p.

DIAZ, G.J., 2002. Evaluation of the efficacy of a feed additive to ameliorate the toxic effects of 4,15-diacetoxiscirpenol in growing chicks. *Poultry Science,* 81 1492-1495.p.

DIAZ, G.J., CORTES, A., & ROLDAN, L. (2005): Evaluation of the efficacy of four feed additives against the adverse effects of T-2 toxin in growing broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 14 226-231.p.

DOBOLYI CS., SEBŐK F., VARGA J., KOCSUBÉ S., SZIGETI GY., BARANYI N., SZÉCSI Á., LUSTYIK GY., MICSINAI A., TÓTH B., VARGA M., KRISZT B. & KUKOLYA J. (2011): Aflatoxin-termelő *Aspergillus flavus* törzsek előfordulása hazai kukorica szemtermésben. *Növényvédelem,* 47 (4) 125–133. p.

DUNN, J. J., LEE, L. S. & CIEGER, A. (1982): Mutagenicity and Toxicity of Aflatoxin Precursors. *Envinronmental Mutagenesis,* 4 19–26. p.

DURA GY. & GRUIZ K. (2001): Ökotoxikológiai vizsgálat és környezeti kockázat felmérése. In: Németh Tamás (szerk) *Kármentesítési kézikönyv 3*. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium, Budapest, 128 p.

EDER E., DEININGER C. & KÜTT W. (1989): Genotoxicity of monofunctional methanesulphonates in the SOS chromotest as a function of alkylation mechanisms. A comparison with the mutagenicity in *S. typhimurium* TA100. *Mutation Research,* 211 (1) 51–64 p.

ELDRIGE 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 Environmwntal Microbiology*, 73 (19) 6012-6018. p.

EL-SHARKAWY, S.H. & ABUL-HAJJ, Y.J. (1988A): Microbial transformation of zearalenone. *Xenobiotica,* 18 365-371. p.

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

EL-SHARKAWY, S.H. & ABUL-HAJJ, Y.J. (1991): Microbial transformation of zearalenone to zearalenone sulfate, *Applied Environmental Microbialogy,* 57 (2) 549-552. p.

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.

FJELD, R.A., EISENBERG, M.A., & COMPTON, K.L. (2007): Quantitative environmental risk analysis for human health, New Jersy, *John Wiley & Sons,* 390 p.

FITZPATRICK, D. W., PICKEN, C.A., MURPHY, L.C., BUHR, M.M. (1989): Measurement of the relative binding affinity of zearalenone, α-zearalenol and β-zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: An indicator of estrogenic potencies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 94 (2) 691-694. p.

FROEHNER, K., MEYER, W. & GRIMME, L.H. (2002): Time-dependent toxicity in the long-term inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere,* 46 987-997. p .

FUCHS, E., BINDER, E. M., HEIDLER, D. & KRSKA, R (2002): Structural characterization ofmetabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by bacterial strain BBSH 797. *Food Additives and Contaminants,* 4 379–386. p.

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.

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

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.

GYÖRGY É., HARAI É., ANDRÁS CS. D., TOLOKÁN A., & HANTZ A. (2008): Mikotoxinogén penészgombák vizsgálata és az általuk termelt mikotoxinok analitikai kimutatása fűszerekből és takarmányból. *Orvostudományi Értesítő,* 81 (4) 275–278. p.

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.

HANIF, N.Q., MUHAMMAD, G., SIDDIQUE, M., KHANUM, A., AHMED, T., GADAHAI, J.A., & KAUKAB, G. (2008): Clinico-pathomorphological, serum biochemical and histological

studies in broilers fed ochratoxin A and a toxin deactivator (Mycofix (R) Plus). *British Poultry Science*, 49 632-642. p.

HAO, Y. & BRACKETT, R.E. (1988). Removal of aflatoxin B1 from peanut milk inoculated with *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Science*, 53 1384- 1386. p.

HOFSTETTER, U., SCHATZMAYR, D., STARKL, V., BINDER, E.M., & FORAT, M. (2006): A novel concept for simultaneous deactivation of various mycotoxins in piglets. *BOKU symposium*.

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.

IARC (1993): Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, International Agency for Research on Cancer, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 56 245–395. p.

IARC (2002): Some tradiotional herbal medicines, some mycotoxins, naphtaleneand styrene. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 82 1–556. p.

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

KÁDÁR I. (1998): Kármentesítési kézikönyv 2.: A szennyezett talajok vizsgálatáról. Környezetvédelmi Minisztérium, Budapest, 177 p.

KELLER N.P., TURNER, G. & BENNETT, J.W. (2005): Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology,* 3 937–947. p.

KOVÁCS F. (1990): Állathigiénia, Budapest: Mezőgazdasági Kiadó 601 p.

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

KOVÁCS M. (2010): Mikotoxinok és a humány-egészségügy. 93-94. p. In: Kovács M. (szerk): Aktualitások a mikotoxin kutatásban. Kaposvár. Agroinform Kiadó, 160 p.

KOVÁTS N., SZALAY T. & KÁRPÁTI Á. (2005): Mikrobiotesztek alkalmazása szennyvizek toxicitásának minősítése során. MaSzeSz hírcsatorna, 9–13. p.

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

KRISZT B., TÁNCSICS A., CSERHÁTI M., TÓTH Á., NAGY I., HORVÁTH B., NAGY I., TAMURA T., KUKOLYA J & SZOBOSZLAY S. (2011): De novo genome project of the aromatic degrader *Rhodococcus pyridinivorans* AK37. *Journal of Bacteriology,* in press

LUDEWIG, A., KABSCH, U., & VERRETIN, J.A. (2005): Mycotoxin production of 31 *Fusarium graminearum* isolates and aggressiveness against wheat seedlings. *Journal of Plant Diseases and Protection,* 11 (2) 124–133. p.

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.

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.

LIU, D.L., YAO, D.S., LIANG, Y.Q., ZHOU, T.H., SONG, Y.P., ZHAO, L., & MA, L. (2001): Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifizyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food and Chemical Toxicology*, 39 461-466. p.

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.

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.

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

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.

MCLEAN, M. & DUTTON, M.F. (1995): Cellular Interactions and metabolism of aflatoxin: an update, *Parmacology & Therapeutics*, 65 (2) 163–192. p.

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.

MEIGHEN, E.A. (1993): Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB Journal*, 7 1016-1022. p.

MÉZES M. (1997): Takarmányártalmak, takarmánytoxikológia. Egyetemi jegyzet, Gödöllő, 60. p.

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

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.

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.

MILLER, D.M. & WILSON, D.M. (1994): Veterinary disease related to aflatoxins 347– 364. p. In: Eaton, D.L., Groopman, J.D. (Eds.), The Toxicology of Aflatoxins. Academic Press, Inc., New York.

NAGY SZ. (2005): Réz és Nikkel ökotoxikológiai vizsgálata *Vibrio fischeri* lumineszcens baktérium felhasználásával. Diplomadolgozat, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Környezeti Elemek Védelme Tanszék.

NAKAZATO, M., MOROZUMI, S., SAITO, K., FUJINUMA, K., NISHIMA, T., & KASAI, N., (1990): Interconversion of Aflatoxin B1 and Aflatoxicol by Several Fungi. *Applied and Envionmental Microbiology*, 56 1465-1470. p.

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.

PETERI, Z., TÉREN, J., VÁGVÖLGYI, C., & VARGA, J. (2007): Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, 24 205-210. p.

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

POLITIS, I., FEGEROS, K., NITSCH, S., SCHATZMAYR, G. & KANTAS, D. (2005): Use of *Trichosporon mycotoxinivorans* to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks. *British Poultry Science*, 46 58-65. p.

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.

QUILLARDET, P., DE BELLECOMBE, C., HOFNUNG, M. (1985): The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutation. Research,* 147 (3) 79–95. p.

QUILLARDET, P. & HOFNUNG, M. (1985): The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation. Research,* 147 (3) 65-78. p.

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

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.

ROBENS, J.F. & RICHARD, J.L. (1992): Aflatoxins in animal and human health 69–94. p. In: Ware, G.W. (Eds.), Reviews of Envinronmental Contamination and Toxicology, Springer-Verlag, New York, 127 p.

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.

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.

SANSEVERINO, J., ELDRIGE, 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. *Toxicological Sciences*, 107 (1) 122-134. p.

SANSEVERINO, J., GUPTA, R. K., LAYTON, A.C., PATTERSON, S.S., RIPP, S.A., SAIDAK, L., SIMPSON, M.L., SCHULTZ, T.W., & SAYLER, G.S. (2005): Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid, Sensitive Detection of Estrogenic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology,* 71 (8) 4455–4460. p.

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.

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. *Science of the Total Environment*, 409 326–333. p.

SEHU A., CAKIR S., CENGIZ O., & ESSIZ D. (2005): Mycotox and aflatoxicosis in quails. *British Poultry Science*, 46 520-524.p.

SCHATZMAYR, G., ZEHNER, F., TÃUBEL, M., SCHATZMAYR, D., KLIMITSCH, A., LOIBNER, A.P., & BINDER, E.M. (2006): Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 543-551. p.

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

SHIER, W.T., SHIER, A.C., XIE, W. AND MIROCHA, C.J. (2001): Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon*, 39 (9) 1435-1438. p.

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.

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

SZEITZNÉ SZABÓ M. (2010) A mikotoxinok ellenőrzésére vonatkozó jógi háttér, az EU élelmiszerekre és takarmányokra vonatkozó, gyors veszélyjelző (RASFF) rendszerébe érkező bejelentések értékelése, 103–118. p. In: Kovács Melinda (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban. Kaposvár, Agroinform Kiadó, 156 p.

SZOBOSZLAY S., SOLYMOSI J., LAUER J., AZTÉL B., SZABÓ I. & KRISZT B. (2002): Environmental safety and biodegradation of hydrocarbons. 4th International Scientific Conference „Foreign Substances int he Environment", Nitra, Slovakia, Proceedings, 200-204. p.

SZOBOSZLAY S. (2003): Katonai tevékenységek során a talajba és talajvízba kerülő szénhidrogén szennyezések kármentesítésének környezetbiztonsági következményei. PhD értekezés, Zrínyi Miklós Nemzetvédelmi Egyetem, 122 p.

TAKAHASHI-ANDO, N., KIMURA, M., KAKEYA, H., OSADA, H., & YAMAGUCHI, I. (2002): A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochemical journal*, 3651-6.p.

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.

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.

TERRATOX™ VIBRIO FISCHERI DATABASE (2007), Terrabase Inc.

UENO, Y., KUBOTA, K., ITO, K. & NOKAMURA, Y. (1978): Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Research*, 38 (3) 536-542. p.

UENO, Y., NAKAYAMA, K., ISHII, K., TASHIRO, F., MINODA, Y., OMORI, T., & KOMAGATA, K., (1983): Metabolism of T-2 Toxin in *Curtobacterium sp*. Strain 114-2. *Applied and Envionmental Microbiology*, 46 120-127. p.

URBANCZYK, H., AST, J.C., HIGGINS, M.J., CARSON J. & DUNLAP, P.V. (2007): Reclassification of *Vibrio fischeri, Vibrio logei, Vibrio salmonicid*a and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri gen. nov., comb. nov., Aliivibrio logei comb. nov., Aliivibrio salmonicida comb. nov.* and *Aliivibrio wodanis comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 57 (12) 2823–2829. p.

VAAJASAARI, K., AHTIAINEN J., NAKARI, T., & DAHLBO, H. (1998): Hazard assessment of the industrial waste leachabiliy studies: Chemical characterization and biotesting by routine test. International Symposium on new microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring. Brno. Czech Republic. Book of Abstracts, 10 p.

VARGA J. & TÓTH B. (2005): Novel strategies to control mycotoxins in feeds. A reviw. *Acta Veterinaria Hungarica,* 53 (2)189–203. P.

VARGA, J., PÉTERI ZS., TÁBORI K., TÉREN J., VÁGVÖLGYI CS. (2005): Degradation of ochratoxin A and other mycotoxin by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 99 (3) 321-328.P.

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 Environmental Microbiology*, 76 (7) 2353–2359. p.

VON DER HUDE W, BEHM C, GÜRTLER R, & BASLER A. (1988): Evaluation of the SOS chromotest. *Mutatation Resesearch,* 203(2) 81–94. p.

WANG, J.S. & GROOPMAN, J.D. (1999): DNA damage by myxotoxins. *Mutation Research,* 424 (1-2) 167–181. p.

WEISER, I., ULITZUR, S. &YANNAI, S. (1981): DNA-damaging agents and DNA-synthesis inhibitors induce luminescence in dark variants of luminous bacteria. *Mutation Research,* 91 443-450. p.

WONG, K.-Y., ZHANG, M.-Q., LI, X.-M, & LO, W. (1997): A luminescence-based scanning respirometer for heavy metal toxicity monitoring. *Biosensors and Bioelectronics.* 12 (2) 125–133. p.

Wu, F. (2004): Mycotoxin risk assessment for the pupose of setting international regulatory standards, *Environmental Science Technology,* 38 4049–4055. p.

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.

XU, H.H. & SCHURR, K.M. (1990) Genotoxicity of 22 pesticides in microtitration SOS chromotest. *Toxicity Assessment*, 5 1–14. p.

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 cultures. *Biodegradation,* 22 (3) 613–622. p.

YUKSEL, C. & BULLERMAN, L.B. (2005): Evaluation of Reduced Toxicity of Zearalenone by Extrusion Processing As Measured by the MTT Cell Proliferation Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53 (16) 6558–6563. p.

YULE, G.U. & KENDALL, M.G. (1950): An Introduction to the Theory of Statistics, Charles Griffin & Co., 258–270. p.

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.

Internetes hivatkozások

HTTP1 http://www.kfki.hu/chemonet/osztaly/eloadas/mesterhazya.html – Mesterházy Á. (2002): A mikotoxinok és az élelmiszerbiztonság, a megoldás lehetőségei, Szeged, letöltés ideje: 2011.02.15.

HTTP2 http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/2096 – letöltés ideje: 2012.03.19

HTTP3 http://en.wikipedia.org/wiki/Coumarin – letöltés ideje: 2012.03.19

HTTP4 http://en.wikipedia.org/wiki/Furanocoumarin – letöltés ideje: 2012.03.19

HTTP5 http://www.biosite.dk/leksikon/aflatoxin.htm – letöltés ideje: 2012.03.19

HTTP6 http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/07_NRKP/01_berichte_nrkp/00_ErgaenzendeDokumente_2000_2001/lm_nrkp_bericht_2000_2001_basepage.html?nn=1934934, letöltés ideje: 2011.08.10.

HTTP7 http://softflow.hu/Letoltesek/PDF_Toxi_ELISA.pdf – letöltés ideje: 2012.04.19

HTTP8 http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/Biodegradáció.pdf. – Gruiz K., Molnár M,: Biodegradáción alapuló remediáció, szerves szennyezőanyagok biodegradációja, letöltés ideje: 2011.06.23.

HTTP9 http://www.biomin.hu/index_elemei/Page464.htm, letöltés ideje: 2012.03.19

Egyéb hivatkozások

17/1999. (VI.16.) EÜM rendelet az élelmiszerek vegyi szennyezettségének megengedhetõ mértékérõl

165/2010/EU: A Bizottság 165/2010/EU rendelete (2010. február 26.) az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról szóló 1881/2006/EK rendeletnek az aflatoxinok tekintetében történő módosításáról

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

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

2002/32/EK: Az Európai Parlament és Tanács 2002/32/EK irányelve (2002. május 7.) a takarmányban előforduló nemkívánatos anyagokról

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

AOAC OFICIAL METHOD 990.33 Aflatoxins in corn and peanutbutter(KSZ-89)

CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01: Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety

MSZ EN ISO 11348-1:2000 Vízminőség. Vízminták gátló hatásának meghatározása a Vibrio fischeri fénykibocsájtására (Lumineszcensbaktérium-baktérium teszt). 1. rész: Vizsgálat frissen előkészített baktériumokkal (ISO 11348:1:1998)

2. melléklet: Biotranszformációs lehetőségek a szakirodalom alapján

Kategória	Leírás	Cég /labor	Eredet	Célzott mikotoxin	Szakirodalom
Baktérium	Anaerob baktérium *Eubacterium* sp. BBSH 797	Biomin	Bendő	T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2 tetraol, T-2 triol, scirpentriol	FUCHS ET AL., 2002
	Nocardia asteroides *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. *Rhodococcus erythropolis*			AFB1	WU ET AL., 2009
	Kevert tenyészet (*Alcaligenes*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, és *Pseudomonas*			ZEA	MEGHARAJ ET AL., 1997
	Curtobacterium sp. strain 114-2			T-2 toxin	UENO ET AL., 1983
Gomba	*Aspergillus niger*, *Eurotium herbariorum*, *Rhizopus sp*., énem aflatoxin termelő *A. flavus*			AFB1, Aflatoxiol	NAKAZATO ET AL., 1990
	Aspergillus parasiticus NRRL 2999 és NRRL 3000			AFB1	WU ET AL., 2009
Élesztő	*Trichosporon mycotoxinivorans*			OTA, ZEA, DON	MOLNAR ET AL., 2004 SCHATZMAYR ET AL., 2006
	Phaffia rhodozyma és *Xanthophyllomyces dendrorhous* izolátumok			OTA	PETERI ET AL., 2007
	Mycotox® (Oxicinol, timol, élesztő-sejtfal kivonat)			Aflatoxin	SEHU ET AL., 2005
	Mycofix® Plus (Toxin mentesítő készítmény amely taralmazza a *Trichosporon mycotoxinivorans* élesztőt, és abszorpciós tulajdonságokat mutat, epoxidáz és laktanáz aktivitással kiegészítve.	Biomin		FB1, ZEA, DON, NIV, DAS, T-2 toxin, OTA	AVANTAGGIATO ET AL., 2005 DÄNICKE ET AL., 2002A DÄNICKE ET AL., 2002B DÄNICKE, 2002 DÄNICKE ET AL., 2003 DIAZ ET AL., 2002 DIAZ ET AL., 2005 HANIF ET AL.,2008 POLITIS ET AL., 2005

Baktérium + élesztő	*Eubacterium* BBSH 797 és *Trichosporon mycotoxinivorans*	Biomin		OTA, ZEA	HOFSTETTER ET AL., 2006
Enzimek	Protease A	Amano Inc..	*Aspergillus niger*	OTA	ABRUNHOSA ET AL., 2006
	Pancreatin	Biocatalysts	Sertés hasnyálmirigy	OTA	ABRUNHOSA ET AL., 2006
	Epoxidase from *Eubacterium* BBSH 797			ZEA, OTA, DON	SCHATZMAYR ET AL., 2006
	Aflatoxin-detoxifizyme (ADTZ)		*Armillariella tabescens*	AFB1	LIU ET AL., 2001
	Lactonohydrolase		*Clonostachys rosea* IFO 7063	ZEA	TAKAHASHI-ANDO ET AL., 2002

3. melléklet: Az aflatoxin B1-re számított EC értékek részletes ismertetése a ToxRet program alapján

Evaluation of a Metric Response

Effective Concentrations (ECx) with bioluminescens at 3.5 h

Probit analysis using Linear Max. Likelihood Regression

Treatm. [µg/ml]	Log(x)	%Decrease	n	Emp. Probit	Weight	Probit
Control		0.0	3			excluded
1.0	0.000	15.0	3	3.962	0.226	3.781
2.0	0.301	12.1	3	3.831	0.428	4.079
5.0	0.699	34.5	3	4.603	0.757	4.473
10.0	1.000	38.1	3	4.698	0.948	4.770
15.0	1.180	46.0	3	4.900	0.997	4.944
20.0	1.300	55.1	3	5.128	0.995	5.067

excluded: value not in line with the chosen function

Parameters of the Probit analysis

Parameter	Value
Computation runs:	3.0000
Slope b:	0.9886
Intercept a:	3.7814
Variance of b:	1.6459
Goodness of Fit	
Chi²:	0.0538
Degrees of freedom:	4.0000
p(Chi²):	0.9996
Log EC50:	-0.33937
Variance Log EC50:	13.8683
g-Criterion:	0.1745
Residual Variance (Chi²/df):	0.0135
r²:	0.9170
F:	44.1510
p(F) (df: 1;4):	0.0030

Results of the Probit analysis

Parameter	EC10	EC20	EC50
Value [µg/ml]	0.9	2.4	17.1
lower 95%-cl	0.2	0.9	11.7
upper 95%-cl	1.8	3.9	33.4
lower 99%-cl	0.1	0.5	8.3
upper 99%-cl	4.1	6.5	47.2

n.d.: not determined due to mathematical reasons
Computation of variances and confidence limits was adjusted to metric data (Christensen & Nyholm 1984).
Slope function after Litchfield and Wilcoxon: 10.268

Range-to-standard-deviation-ratio Test on Normal Distribution

Treatm. [µg/ml]	R	s	n	R/s	cl	ch	Sign.
Control	21087.0	10924.64	3	1.930	1.758	1.999	-
1.0	7460.0	3790.47	3	1.968	1.758	1.999	-
2.0	101302.0	54415.16	3	1.862	1.758	1.999	-
5.0	20905.0	10543.98	3	1.983	1.758	1.999	-
10.0	32143.0	16731.23	3	1.921	1.758	1.999	-
15.0	8421.0	4568.48	3	1.843	1.758	1.999	-
20.0	18285.0	9778.51	3	1.870	1.758	1.999	-

+: significant; -: non-significant

One-way Analysis of Variance

Source	SS	df	MSS	F	p(F)
Treatment	54629720064.00	6	9104953344.00	17.693	< 0.001
Residuals	7204650496.00	14	514617888.00		
Total	61834371072.00	20			

+: significant; -: non-significant
p(F) is smaller than or equal to the selected significance level of 0.050; therefore, treatments are significantly different.

Williams Multiple Sequential t-test Procedure

Treatm. [µg/ml]	Mean	s	df	LhM	%MDD	t	t*	Sign.
Control	275134.0	22685.19						
1.0	233976.3	22685.19	14	237879.3	28.9	-2.01	2.14	-
2.0	241782.3	22685.19	14	237879.3	29.9	-2.01	2.22	-
5.0	180123.3	22685.19	14	180123.3	30.2	-5.13	2.24	+
10.0	170316.7	22685.19	14	170316.7	30.4	-5.66	2.26	+
15.0	148550.0	22685.19	14	148550.0	30.5	-6.83	2.26	+
20.0	123566.7	22685.19	14	123566.7	30.5	-8.18	2.27	+

+: significant; -: non-significant
A NOEC of 2.0 µg/ml is suggested by the program.

Evaluation of a Metric Response
Effective Concentrations (ECx) with bioluminescens at 10 h

Probit analysis using Linear Max. Likelihood Regression

Treatm. [µg/ml]	Log(x)	%Decrease	n	Emp. Probit	Weight	Probit
Control		0.0	3			excluded
1.0	0.000	11.8	3	3.816	0.239	3.804
2.0	0.301	31.9	3	4.529	0.827	4.564
5.0	0.699	74.5	3	5.658	0.724	5.568
10.0	1.000	86.5	3	6.103	0.172	6.328
15.0	1.180	97.3	3	6.926	0.043	6.772
20.0	1.300	98.7	3	7.216	0.013	7.088

excluded: value not in line with the chosen function

Parameters of the Probit analysis

Parameter	Value
Computation runs:	3.0000
Slope b:	2.5230
Intercept a:	3.8045
Variance of b:	5.2056
Goodness of Fit	
Chi^2:	0.0192
Degrees of freedom:	4.0000
$p(Chi^2)$:	1.0000
Log EC50:	-0.14214
Variance Log EC50:	9.0471
g-Criterion:	0.0302
Residual Variance (Chi^2/df):	0.0048
r^2:	0.9850
F:	254.9680
p(F) (df: 1;4):	0.0000

Results of the Probit analysis

Parameter	EC10	EC20	EC50
Value [µg/ml]	0.9	1.4	3.0
lower 95%-cl	0.7	1.1	2.6
upper 95%-cl	1.1	1.6	3.4
lower 99%-cl	0.6	1.0	2.4
upper 99%-cl	1.4	1.9	3.7

n.d.: not determined due to mathematical reasons
Computation of variances and confidence limits was adjusted to metric data (Christensen & Nyholm 1984).
Slope function after Litchfield and Wilcoxon: 2.491

Range-to-standard-deviation-ratio Test on Normal Distribution

Treatm. [µg/ml]	R	s	n	R/s	cl	ch	Sign.

Control	572077.0	297103.75	3	1.926	1.758	1.999	-
1.0	520227.0	265894.66	3	1.957	1.758	1.999	-
2.0	617210.0	313090.59	3	1.971	1.758	1.999	-
5.0	312702.0	163728.77	3	1.910	1.758	1.999	-
10.0	395746.0	217804.64	3	1.817	1.758	1.999	-
15.0	27954.0	14466.96	3	1.932	1.758	1.999	-
20.0	30989.0	16756.83	3	1.849	1.758	1.999	-

+: significant; -: non-significant

One-way Analysis of Variance

Source	SS	df	MSS	F	p(F)
Treatment	16040693071872.00	6	2673448845312.00	56.413	< 0.001
Residuals	663464771584.00	14	47390339072.00		
Total	16704157515776.00	20			

+: significant; -: non-significant
p(F) is smaller than or equal to the selected significance level of 0.050; therefore, treatments are significantly different.

Williams Multiple Sequential t-test Procedure

Treatm. [µg/ml]	Mean	s	df	LhM	%MDD	t	t*	Sign.
Control	2261177.0	217693.22						
1.0	1993877.6	217693.22	14	1993877.6	33.7	-1.5	2.14	-
2.0	1540970.4	217693.22	14	1540970.4	34.9	-4.05	2.22	+
5.0	576781.3	217693.22	14	576781.3	35.3	-9.48	2.24	+
10.0	305312.0	217693.22	14	305312.0	35.5	-11	2.26	+
15.0	61218.3	217693.22	14	61218.3	35.6	-12.38	2.26	+
20.0	30227.7	217693.22	14	30227.7	35.7	-12.55	2.27	+

+: significant; -: non-significant
A NOEC of 1.0 µg/ml is suggested by the program.

Evaluation of a Metric Response

Effective Concentrations (ECx) with bioluminescens at 15 h

Probit analysis using Linear Max. Likelihood Regression

Treatm. [µg/ml]	Log(x)	%Decrease	n	Emp. Probit	Weight	Probit
Control		0.0	3			excluded
1.0	0.000	9.8	3	3.706	0.186	3.703
2.0	0.301	28.3	3	4.427	0.683	4.383
5.0	0.699	60.0	3	5.254	0.924	5.280
10.0	1.000	78.4	3	5.784	0.398	5.960
15.0	1.180	96.4	3	6.799	0.158	6.358
20.0	1.300	97.8	3	7.014	0.068	6.640

excluded: value not in line with the chosen function

Parameters of the Probit analysis

Parameter	Value
Computation runs:	4.0000
Slope b:	2.2579
Intercept a:	3.7027
Variance of b:	3.5170
Goodness of Fit	
Chi^2:	0.0381
Degrees of freedom:	4.0000
$p(Chi^2)$:	0.9998
Log EC50:	-0.11376
Variance Log EC50:	6.5928
g-Criterion:	0.0507
Residual Variance (Chi^2/df):	0.0095
r^2:	0.9740
F:	152.0460
p(F) (df: 1;4):	0.0000

Results of the Probit analysis

Parameter	EC10	EC20	EC50
Value [µg/ml]	1.0	1.6	3.8
lower 95%-cl	0.6	1.1	3.1
upper 95%-cl	1.4	2.0	4.5
lower 99%-cl	0.5	0.9	2.7
upper 99%-cl	1.8	2.5	5.1

n.d.: not determined due to mathematical reasons
Computation of variances and confidence limits was adjusted to metric data (Christensen & Nyholm 1984).
Slope function after Litchfield and Wilcoxon: 2.773

Range-to-standard-deviation-ratio Test on Normal Distribution

Treatm. [µg/ml]	R	s	n	R/s	cl	ch	Sign.
Control	989458.0	530656.19	3	1.865	1.758	1.999	-
1.0	1199019.0	656543.56	3	1.826	1.758	1.999	-
2.0	701154.0	384216.78	3	1.825	1.758	1.999	-
5.0	645430.0	323541.09	3	1.995	1.758	1.999	-
10.0	856086.0	435605.22	3	1.965	1.758	1.999	-
15.0	81558.0	45428.61	3	1.795	1.758	1.999	-
20.0	98061.0	53447.34	3	1.835	1.758	1.999	-

+: significant; -: non-significant

One-way Analysis of Variance

Source	SS	df	MSS	F	p(F)
Treatment	45944145969152.00	6	7657357836288.00	46.223	< 0.001
Residuals	2319238037504.00	14	165659852800.00		
Total	48263382171648.00	20			

+: significant; -: non-significant
p(F) is smaller than or equal to the selected significance level of 0.050; therefore, treatments are significantly different.

Williams Multiple Sequential t-test Procedure

Treatm. [µg/ml]	Mean	s	df	LhM	%MDD	t	t*	Sign.
Control	3939539.0	407013.33						
1.0	3554317.3	407013.33	14	3554317.3	36.2	-1.16	2.14	-
2.0	2823564.3	407013.33	14	2823564.3	37.5	-3.36	2.22	+
5.0	1574830.0	407013.33	14	1574830.0	37.9	-7.12	2.24	+
10.0	852856.3	407013.33	14	852856.3	38.1	-9.29	2.26	+
15.0	141952.0	407013.33	14	141952.0	38.2	-11.43	2.26	+
20.0	86861.3	407013.33	14	86861.3	38.3	-11.59	2.27	+

+: significant; -: non-significant
A NOEC of 1.0 µg/ml is suggested by the program.

Evaluation of a Metric Response

Effective Concentrations (ECx) with bioluminescens at 15 h

Probit analysis using Linear Max. Likelihood Regression

Treatm. [µg/ml]	Log(x)	%Decrease	n	Emp. Probit	Weight	Probit
Control		0.0	3			excluded
1.0	0.000	6.7	3	3.504	0.000	1.277
2.0	0.301	-7.5	3			excluded
5.0	0.699	22.4	3	4.242	0.365	3.996
10.0	1.000	47.2	3	4.929	0.972	5.167
15.0	1.180	84.8	3	6.026	0.483	5.852
20.0	1.300	96.4	3	6.804	0.167	6.339

excluded: value not in line with the chosen function

Parameters of the Probit analysis

Parameter	Value
Computation runs:	6.0000
Slope b:	3.8914
Intercept a:	1.2759
Variance of b:	15.9061
Goodness of Fit	
Chi^2:	0.1440
Degrees of freedom:	3.0000
$p(Chi^2)$:	0.9861
Log EC50:	0.5576
Variance Log EC50:	0.1060
g-Criterion:	0.5103
Residual Variance (Chi^2/df):	0.0480
r^2:	0.8690
F:	19.8410
p(F) (df: 1;3):	0.0210

Results of the Probit analysis

Parameter	EC10	EC20	EC50
Value [µg/ml]	4.2	5.5	9.1
lower 95%-cl	0.4	1.1	5.0
upper 95%-cl	6.6	7.8	12.5
lower 99%-cl	0.1	0.5	3.4
upper 99%-cl	20.4	18.1	18.4

n.d.: not determined due to mathematical reasons
Computation of variances and confidence limits was adjusted to metric data (Christensen & Nyholm 1984).
Slope function after Litchfield and Wilcoxon: 1.807

Range-to-standard-deviation-ratio Test on Normal Distribution

Treatm. [µg/ml]	R	s	n	R/s	cl	ch	Sign.
Control	470434.0	252873.39	3	1.860	1.758	1.999	-
1.0	289042.0	144684.88	3	1.998	1.758	1.999	-
2.0	1086857.0	578274.31	3	1.879	1.758	1.999	-
5.0	890348.0	504661.53	3	1.764	1.758	1.999	-
10.0	519099.0	264582.13	3	1.962	1.758	1.999	-
15.0	408403.0	214604.17	3	1.903	1.758	1.999	-
20.0	331831.0	189935.59	3	1.747	1.758	1.999	+

+: significant; -: non-significant

Kruskal-Wallis-test Procedure

Treatm. [µg/ml]	Mean	n	Ri
Control	3894180.0	3	52.0
1.0	3632028.3	3	46.0
2.0	4186671.8	3	55.0
5.0	3021188.8	3	33.0
10.0	2057753.4	3	24.0
15.0	593749.7	3	14.0
20.0	138832.7	3	7.0

+: significant; -: non-significant
Results:
df = 6
H = 18.459
p(H)= 0.005
p(H) is smaller than or equal to the selected significance level of 0.050; therefore, treatments are significantly different.

Williams Multiple Sequential t-test Procedure

Treatm. [µg/ml]	Mean	s	df	LhM	%MDD	t	t*	Sign.
Control	3894180.0	343531.52						
1.0	3632028.3	343531.52	14	3909350.0	30.9	0.05	2.14	-
2.0	4186671.8	343531.52	14	3909350.0	32.0	0.05	2.22	-
5.0	3021188.8	343531.52	14	3021188.8	32.3	-3.11	2.24	+
10.0	2057753.4	343531.52	14	2057753.4	32.5	-6.55	2.26	+
15.0	593749.7	343531.52	14	593749.7	32.6	-11.77	2.26	+
20.0	138832.7	343531.52	14	138832.7	32.7	-13.39	2.27	+

+: significant; -: non-significant
A NOEC of 2.0 µg/ml is suggested by the program

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Kriszt Balázsnak, aki kitüntetett bizalmával és támogatásával, valamint szakmailag és emberileg is példamutatást adott.

A munkám során felmerülő rengeteg kérésben segítségemre volt Dr. Kukolya József, akinek szakmai iránymutatásáért és állandó tanácsaiért hálával tartozom.

Köszönetet mondok hallgatóimnak, így Risa Anitának, Szűcs Ádámnak a kísérletekben nyújtott segítségükért és együttműködésükért; illetve Cserháti Mátyás kollégámnak, akinek munkája megalapozta a disszertációmban bemutatott kísérleteket és eredményeket.

Köszönöm a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék, valamint a Környezetipari Regionális Egyetemei Tudásközpont munkatársainak segítségüket, támogatásukat és azt, hogy öröm velük együtt dolgozni.

Dolgozatomat szüleimnek ajánlom, akik lehetővé tették számomra, hogy tanuljak és különös figyelemmel, türelemmel voltak irányomba, még akkor is, ha én ezt nem tudtam eléggé viszonozni.

A doktori kutatásaim megvalósulsához az alábbi projectek nyújtottak támogatást:

- Élelmiszer biztonság fokozása gabona alapanyagok mikotoxin szennyezettségének csökkentésével (NKTH TECH_08-A3/2-2008-0385 MYCOSTOP)
- Piacorientált kutatás-fejlesztési tevékenység támogatása (KMOP 1.1.1.-07/1-2008-0002)
- Új módszerek a hormonháztartást károsító szennyezők kockázat elemző/kezelő rendszerének fejlesztésére, Baross Gábor Program (HALEDC09)
- Az oktatás és kutatás színvonalának emelését célzó (TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003) kódszámú projekt