SZENT ISTVÁN EGYETEM

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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, D.Sc.
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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK 4
2. ANYAG ÉS MÓDSZER 6
2.1 A mikotoxinok biológiai hatáselemzésre alkalmazott tesztek 6
2.1.1 *SOS*-Chromo genotoxicitás teszt 6
2.1.2 *Aliivibrio fischeri* citotoxicitás teszt 6
2.1.3 BLYES/BLYR hormonhatás elemző tesztreszdszer 7
2.2 Hazai kukorica mintákból izolált *Aspargillus flavus* törzsek aflatoxin-B1 termelésének kimutatása *SOS*-Chromo teszttel 8
2.3 A biodegradációs kísérletekben felhasznált mikroorganizmusok és tenyésztési körülmények 8
2.4 Az aflatoxin-B1 és zearalenon biológiai lebontásának vizsgálata 8
3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 9
3.1 Az aflatoxin-B1 és a zearalenon biológiai-hatáselemzése 9
3.1.1 *SOS*-Chromo genotoxicitás teszt 9
3.1.2 *Aliivibrio fischeri* citotoxicitás teszt 9
3.1.3 BLYES/BLYR hormonhatás elemző tesztrendszer 11
3.2 Hazai kukorica mintákból izolált *Aspargillus flavus* törzsek aflatoxin-B1 termelésének kimutatása *SOS*-Chromo teszttel 12
3.3 Aflatoxin-B1 és zearalenon biológiai lebontásának vizsgálata 13
3.3.1 Az aflatoxin-B1 biológiai lebontásának vizsgálatára irányuló előkíséreltek 13
3.3.2 Kombinált toxikológiai profil kialakítása az aflatoxin-B1 biológiai lebontásának vizsgálatára 15
3.3.3 Zearalenon biológiai lebontásának nyomon követése élesztő alapú bioriporter rendszerrel 17
4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK 20
5. A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA 24

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

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 (AFB1), amely humán karcinogén hatása mellett, mutagén és citotoxikus hatással is rendelkezik. Világviszonylatban a másik igen nagy gondot okozó mikotoxin a zearalenon (ZEA), 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. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy egyes *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó baktérium törzsek kiváló aflatoxin-bontó képességgel rendelkeznek, 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 a zearalenon vizsgálatára.
- Takarmány alapanyagok (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 termelése nélkül képesek az aflatoxin-B1, valamint a zearalenon degradációjára; illetve ezzel összefüggésben a biodegradáció folyamatának nyomon követése, és az esetlegesen fellépő kockázatok detektálása.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 A mikotoxinok biológiai hatáselemzésére alkalmazott tesztek

2.1.1 *SOS*-Chromo genotoxicitás teszt

Az *SOS*-Chromo teszt az *Eserichia coli* PQ37 jelzésű törzset alkalmazza tesztszervezetként, amely esetében mutagén anyag hatására indukált *SOS* válaszreakcióval együtt a *β*-galaktozidáz enzim termelésért felelős génszakasz traszkripciója is megtörténik. A teszt lehetővé teszi indirekt genotoxinok vizsgálatát, amelyek hatásuk kifejezéséhez metabolikus aktiválására van szükség (S9 patkánymáj enzimkivonat alkalmazása a tesztben). Az *SOS*-Chromo teszt (Environmental Bio-Detection Products, Kanada) alkalmazása a gyártó útmutatásai szerint történt. Az enzimaktivitást (*β*-galaktozidáz és alkalikus foszfatáz) (BioTek Inctruments) 620 és 405 nm-en határoztuk meg, majd a genotoxikus aktivitás kifejezésére az eredményeket indukciós faktorban (IF) adtuk meg. A genotoxikus aktivitás kifejezésére szolgáló IF érték az egyes koncentrációs szinteken az alábbi egyenlettel számszerűsíthető:

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

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

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.

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 kontroll minták, az *SOS*-Chromo teszt esetében, mint pozitív genotoxikus kontroll szerepeltek.

2.1.2 *Aliivibrio fischeri* citotoxicitás teszt

Az akut biolumineszcencia tesztet Sarter és mtsi (2008) alapján módosítottuk, majd mikrotiter-lemezre adaptáltuk a módszert. A biolumineszcens *Aliivibrio fischeri* (DSM-7151) 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 (BM) tápoldatban szaporítottuk és 4°C-on tartottuk fenn BM ferde agaron.

A módszer elve az *Aliivibrio fischeri* fénykibocsátás-gátlásának egyedi elegyvizsgálatban való meghatározása, amelyet a tesztminta és a tesztorganizmus szuszpenziónak egyesítésével történik. Az alapkísérletek során a tesztszervezet érzékenységét kívántam megállapítani az AFB1 és ZEA toxinokra. A vizsgálatokat 100 µl *A. fischeri* tesztkultúrával BM tápoldatban végeztem, amely sejtsűrűségét beállítottuk OD=0,1-re állítottam be. A mikotoxin-mentes kontroll minták tartalmazták a tesztszervezet folyékony kultúráját és a hígító oldatnak használt acetont. A vizsgálatban résztvevő kontrollokat, az AFB1 (20-10-5-2-1 µg/ml) és a ZEA (20-15-10 µg/ml) minták mindegyikét három párhuzamos rendszerben vizsgáltam 3,5-10-15-25 órás kontaktidő után.

A kapott fénykibocsájtási értékekből megállapítottam a hatásos koncentráció értékeket, illetve kiszámítottám Froehner és mtsai (2002) alapján a toxinok által kifejtett gátlást:

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

,ahol *K*: párhuzamos kontrollok fénykibocsátásának átlagértéke
M: párhuzamos minták fénykibocsátásának átlagértéke
tx: kontaktidő

2.1.3 BLYES/BLYR hormonhatás elemző tesztreszdszer

A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES és BLYR tesztszervezetek (Tennessee University, USA) szaporításához uracil és leucin szelektív tápoldatot ($YMM_{ura-,\ leu-}$) alkalmaztam. A tenyészeteket -80°C-on tároltam a további vizsgálatokig.

Az előkísérletek során megállapítottam a tesztszervezetek érzékenységét zearalenonra. A BLYES és BLYR tesztszervezeteket 24 órán keresztül inkubáltam (30°C, 200 rpm) és sejtsűrűségét 600 nm-en (OD_{600}) 1-re állítottam be. Pozitív kontrollként 17-ß-ösztradiolt alkalmaztam, 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 ZEA biológiai lebontásának vizsgálata céljából a BLYES/BLYR tesztet adaptáltam toxinbontási kísérletekhez. A vizsgálatok során pozitív kontrollként a bontási kísérletből származó pozitív kontroll oldatot alkalmaztam.

A bontási kísérlet felülúszó mintái esetében egy lumineszcencia intenzitási értéket határoztam meg a 2.1.2 fejezetben megadott, 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.

2.2 Hazai kukorica mintákból izolált *Aspergillus flavus* törzsek aflatoxin-B1 termelésének kimutatása *SOS*-Chromo teszttel

A biológiai tesztek gyakorlati hasznosításaként magyarországi termőterületekről izolált *Aspergillus* törzsekkel fertőzött kukoricából származó mintákat vizsgáltam. Az *A. flavus* által beszőtt kukoricaszem-tömeg aflatoxin tartalmának kimutatására biológiai hatáselemzést végeztem *SOS*-Chromo teszttel, amely eredményeket ELISA, HPLC-FLD módszerekkel vetettem össze.

2.3 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.

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.

2.4 Az aflatoxin-B1 és a zearalenon biológiai lebontásának vizsgálata

A biodegradációs kísérletek Erlenmeyer lombikban (300 ml), 50 ml LB tápoldatban folytak, 3 párhuzamos rendszer beállításával, amelynek paramétereit 2.1. sz. táblázat tartalmazza. A bontási rendszereket 28ºC, 170 rpm rázatás mellett inkubáltam és 24 óránként mintáztam azokat. 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), illetve a Soft Flow Hungary Kft. ELISA módszerrel. A degradációs kísérlet felülúszó mintáit az adaptált biomonitoring rendszerekkel vizsgáltam a maradék geno/citotoxikus és ösztrogén hatás meghatározása céljából.

2.1. sz. táblázat: A toxinbontási-kísérlet beállításának paraméterei

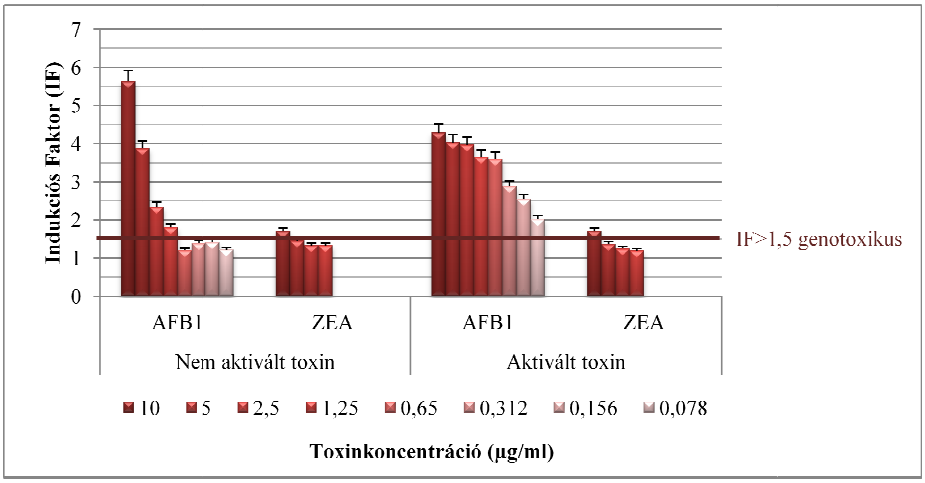
	AFB1	ZEA
Toxintartalom	2 µg/ml	1 µg/ml
Inkubációs idő	3 nap	7 nap
Biológiai hatáselemzés	*SOS*-Chromo teszt	BLYES/BLYR teszt

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1 Az aflatoxin-B1 és a zearalenon biológiai hatáselemzése

3.1.1 *SOS*-Chromo genotoxicitás teszt

Az AFB1 toxint 10–0,078 µg/ml, míg a ZEA toxint 10–1,25 µg/ml koncentrációs tartományban vizsgáltam. Az eredményeket a 3.1. sz. ábrán foglaltam össze, amelyről 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.



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

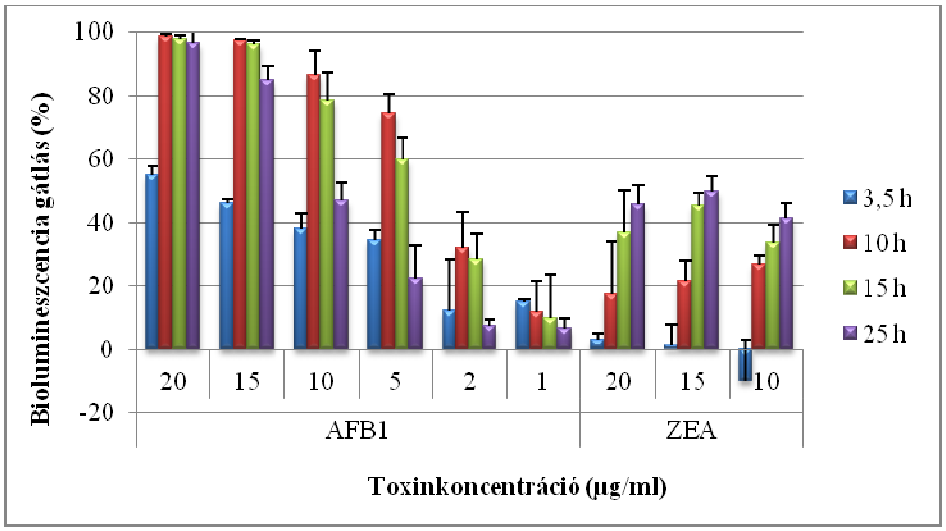
Vizsgálataim alapján az AFB1-re vonatkozóan 0,078 µg/ml koncentrációjú oldat mutatható ki az *SOS*-Chromo teszttel, amely tiszta AFB1-re vonatkoztatva 0,78 µg-nak felel meg. Quillardet és munkatársai (1985) az eredetileg kémcsőben kivitelezett *SOS*-Chromo tesztben a minimálisan kimutatható AFB1 mennyiséget 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).

3.1.2 *Aliivibrio fischeri* citotoxicitás teszt

Az elvégzett kísérletek eredményeit a 3.2. 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 alkalmas a ZEA detektálására.



3.2. 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%-os lumineszcencia gátlást okoz a tesztszervezet számára ($EC_{10, 20, 50}$).

3.1. 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 3.1. 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 3.1.2 fejezetben bemutatott eredmények alapján):

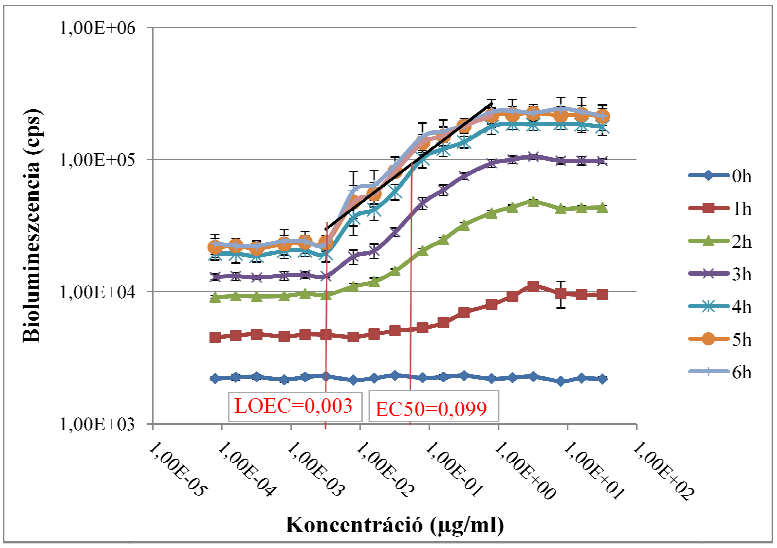
(1. tézis) A mikrotiter-lemezen végzett *Aliivibrio fischeri* teszt alkalmas az aflatoxin-B1 toxin 1 µg/ml-es koncentrációig történő detektálására ($EC50_{(10h)}$=3 µg/ml; $EC50_{(15h)}$=3,8 µg/ml), míg az akut szabványos *Aliivibrio fischeri* lumineszcencia-gátlási teszt (ISO 11348) alkalmazása esetén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

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 3.1.1 és 3.1.2 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.

3.1.3 BLYES/BLYR hormonhatás elemző tesztrendszer

A vizsgálatok során a teszt-mikroorganizmus érzékenységét ellenőriztem a ZEA toxinra. Az eredményeket a 3.3. sz. ábrán foglaltam össze.



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

A 3.3. sz. ábrán a ZEA koncentráció függvényében ábrázoltam a BLYES tesztszervezet biolumineszcencia változását. A koncentráció-válasz függvény lineáris részéből meghatároztam az EC_{50} és a 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). 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.

Méréseink alapján a ZEA a vizsgált koncentráció tartományban nem gátolja a *S. cerevisiae* BLYR tesztszervezet szaporodását.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 3.1.3. 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.

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

A vizsgált minták kémiai- és immunanalitikai eszközökkel mért AFB1 tartalmát a 3.2. sz. táblázat tartalmazza összehasonlítva az *SOS*-Chromo teszt eredményekkel.

A 3.2. 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 az 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 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.

3.2. sz. táblázat: A magyarországi területekről izolált *A. flavus* törzsek aflatoxin-B1 termelésének értékelése immunanalitikai (ELISA) és kémiai analitikai (HPLC) módszerekkel, és összehasonlítva az *SOS*-Chromo teszttel

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,	1,27
Zt64	293,2	397,7	2,01*
Zt55	2031,0	575,0	1,59*
Zt80	6228,0	2774,0	3,81*

* 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 3.2. 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.

3.3 Aflatoxin-B1 és zearalenon biológiai lebontásának vizsgálata

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

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

3.3.1 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 2.4. 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 3.3. sz. táblázatban foglaltam össze.

3.3. 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

		***SOS*-Chromo teszt**			**HPLC**	**ELISA-teszt**
		Indukciós Faktor			**Bontási %**	**Bontási %**
Faj neve	**Laboratóriumi jelzése**	**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 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.

A 3.3. 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).

3.3.2 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 kísérletek 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 3.3.1 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 2.1.2 pontban leírt módon állapítottam meg.

Az előkísérletek eredményeire alapozva, amely során az ELISA teszt eredményei nagyban korreláltak a HPLC eredményekkel (3.3.1 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 (3.4. sz. táblázat).

3.4. 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% biolumineszcencia 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 kontrollal (vak) 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.

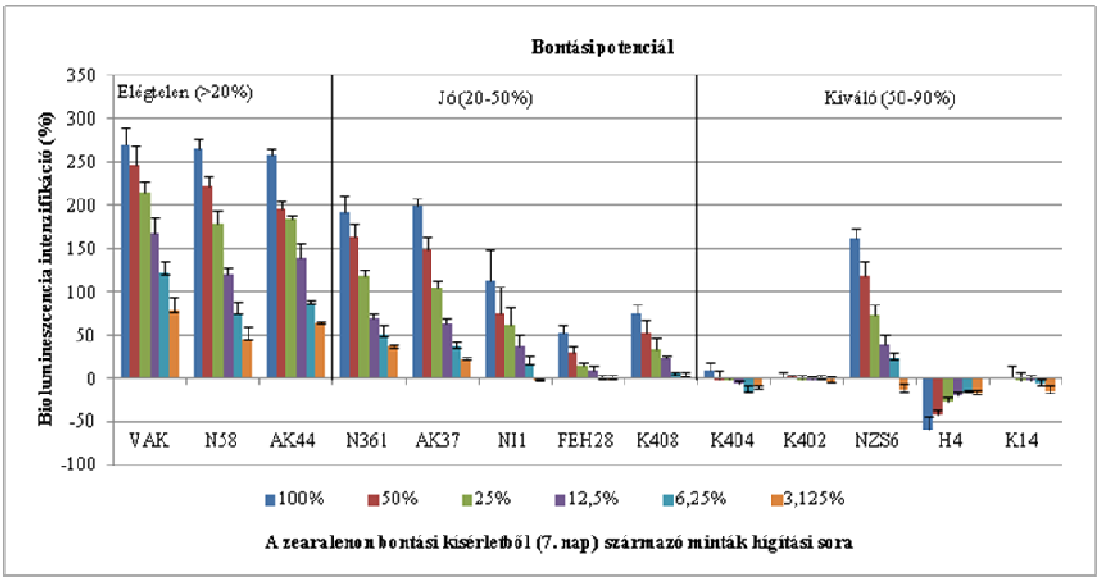
Négy kivételtől (GD2B, BRB1AB, K403C, K405) eltekintve a kiváló (>90%) bontási képességgel rendelkező törzsek nem okoztak jelentős gátlást, némely esetben pedig lumineszcencia növekedést okoztak (NI2, K402, K14, UA58, ZS1, FEH28, TN5, ZV6, DN1, KÖ5). Három törzs (GD2B, K403C, K405) szignifikánsan nagyobb 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 3.3.2. fejezetben bemutatott eredmények alapján): (5. tézis) A biodetoxifikációs eljárások értékeléséhez végzett módszerfejlesztés, illetve az 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.

3.3.3 Zearalenon biológiai lebontásának nyomon követése élesztő alapú bioriporter rendszerrel

Az értékelési rendszerben tizenkét mikroba törzs vizsgálata történt, amelynek értékelését a BLYES/BLYR élesztő alapú bioteszt segítségével végeztem, és az eredményeket párhuzamos HPLC és ELISA vizsgálatokkal hasonlítottam össze (3.4. sz. ábra). A HPLC és ELISA eredmények között szoros egyenes arányú összefüggés tapasztalható, amelyet bizonyít, hogy a Pearson-féle korrelációs érték 0,98 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. A bontási kísérletek során nem tapasztaltam a BLYR tesztszervezettel sejtnövekedést gátló hatást.

A BLYES tersztszervezettel végzett vizsgálataim alapján elmondható, hogy a hormonhatás-eredmények, a kémiai analitika valamint az ELISA teszt eredményei korrelálnak egymással. A statisztikai értékelésnél az ELISA és a 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 BLYES teszt hígításait elemezve, amelynek részleteire a 3.5. 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.



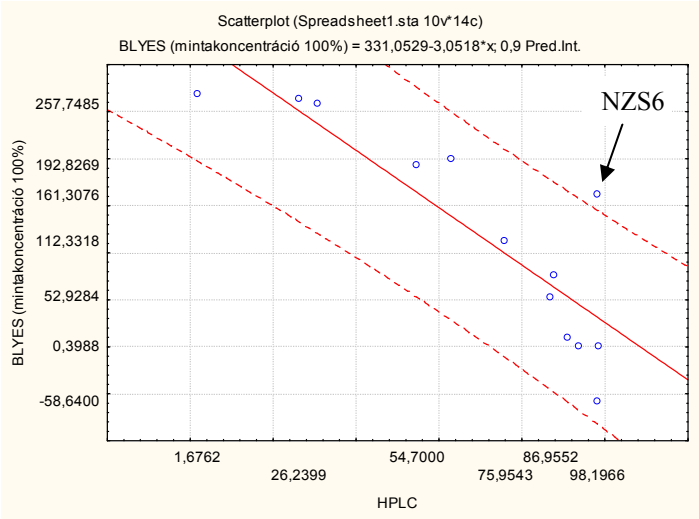
3.4. sz. ábra: A zearalenon bontási kísérletből származó minták ösztrogénhatásának elemzése BLYES teszttel

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 H4 jelzésű törzs esetében 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, melynek árnyékoló hatása miatt nem volt detektálható a lumineszcencia változás. Erős pigmentet termelő mikroba törzsek esetén a tesztrendszer nem alkalmazható, annak további módosítása szükséges. 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 3.5 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. A vizsgált mikroba törzsek közül további biodetoxifikációs célra a *S. cavourensis* K14 jelzésű törzs javasolt, amely a HPLC és ELISA tesztekben is kimagasló ZEA lebontási eredményeket mutatott, valamint nem eredményezett a bontás folyamán kimutatható káros metabolitokat; illetve a *R. pyridinivorans* K402 és K404 szintén magas bontási potenciál mellett képes volt a ZEA ösztrogén hatásának megszüntetésére a bontási folyamat végére.



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

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 3.3.3 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.

4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A szakirodalomban egyre több szerző tárgyalja az AFB1 vagy a ZEA bontására alkalmas mikroorganizmusok degradációs képességét, amelyek leginkább egy olyan biodetoxifikációs rendszer (Mycofix® Plus) kialakítását célozzák, amilyet a Biomin Ltd. már létrehozott ZEA és OTA esetében. 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, 3,5-10-15-25 órás kontaktidőkkel. 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. A kifejlesztett módszerrel meghatározásra kerültek az AFB1 esetében az EC50 értékek ($EC50_{(10h)}$=3,0 µg/ml, $EC50_{(15h)}$=3,8), 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/élelmiszer monitoringra nem alkalmazható, mivel az érzékenysége a jelenleg hatályban lévő jogszabályban meghatározott aflatoxin határérték felett van; 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 *A. 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.

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 termelése 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 *R. rhodochrous* NI2, *R. pyridinivorans* K403C és a *P. 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 (*R. erythropolis* GD2B, *R. 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 lehetnek 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 mellett 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. 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 képesek voltak 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 (*R. pyridinivorans* K408, AK37, *R. 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 *S. cavourensis* K14 és a jól bontó *R. erythropolis* NI1 jelzésű törzsek voltak.

Fenti eredmények hangsúlyozzák az biológiai hatásmérésen alapuló 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, a 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 az 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. 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.

5. A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Folyóiratcikk:

Krifaton Cs., Kriszt B., Szoboszlay S., Cserháti M., Szűcs Á., Kukolya J. (2011): Analysis of aflatoxin-B1 degrading microbes by a combined toxicity profiling method, Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 726 1-7 p.
(IF 2010: 2,938)

Krifaton C, Kukolya J, Szoboszlay S, Cserháti M, Szűcs Á, Kriszt B (2010): Adaptation of bacterial biotests for monitoring mycotoxins. WIT Transactions on Ecology and the Environment: Environmental Toxicology III., 132 143-154. p.

Krifaton Cs., Cserháti M., Prívler Z. (2011): Az aflatoxinok környezet-egészségügyi hatásai, Biokontroll 2 (4) 4-7 p.

Teljes közlemény konferencia kiadványban

Krifaton Cs., Kukolya J., Szoboszlay S., Cserháti M., Kriszt B. (2010): Mikotoxin-bontó mikrobák screenelése bakteriális biotesztesztekkel, TUDOC – Kárpát Medencei Doktoranduszok Nemzetközi Konferenciája, 2010. Május 27-28, Gödöllő, Konferencia kötet, 161–170 p.

Összes közlemény impakt faktora (IF): 2,938