

XXXI. OTDK Biológia Szekció

A ZEARALENON BIODEGRADÁCIÓJÁNAK NYOMON KÖVETÉSE ÉLESZTŐ ALAPÚ BIORIPORTER RENDSZERREL

Készítette: Risa Anita
Környezetgazdálkodási agrármérnök BSc. szak
IV. évfolyam

Belső konzulens: Krifaton Csilla
Tanszékvezető: Dr. Kriszt Balázs



Szent István Egyetem
Gödöllő
2011

Tartalomjegyzék

1.	Bevezető.....	3
2.	Célkitűzés.....	4
3.	Irodalmi áttekintés.....	5
3.1.	Szennyezőanyagok a környezetben.....	5
3.2.	Hormonháztartást zavaró anyagok.....	6
3.3.	Mikotoxinok.....	7
3.3.1.	Mikotoxin termelő gombák.....	8
3.3.2.	Zearalenon.....	9
3.4.	Mikotoxinok detoxifikálása.....	11
3.4.1.	Biodegradáció.....	11
3.5.	A mikotoxinok vizsgálati módszerei.....	14
3.5.1.	Kémiai analitika.....	14
3.5.2.	Immunanalitikai módszerek.....	15
3.6.	Toxikológia és ökotoxikológia.....	15
3.6.1.	Az ökotoxikológiai módszerek előnyei és hátrányai.....	16
3.7.	Biolumineszcencia, mint a toxicitás indikátora.....	17
3.8.	Ösztrogén kimutatására alkalmas módszerek.....	18
4.	Anyag és módszer.....	19
4.1.	Az ösztrogén hatás kimutatására alkalmazott biolumineszcens élesztő alapú bioriporter rendszer.....	19
4.2.	Előkísérletek és a teszt standardizálása.....	20
4.3.	Bontási kísérlet.....	21
4.3.1.	Inokulum előállítása.....	22
4.3.2.	Kísérleti rendszerek.....	22
4.3.3.	Statisztikai értékelés.....	23
5.	Eredmények.....	24
5.1.	A BLYES, BLYR tesztrendszer előkísérletei.....	24
5.2.	A bontási kísérletek értékelése.....	25
5.3.	A minták hormonhatásának eredményei.....	26
5.3.1.	BLYR tesztrendszer.....	26
5.3.2.	BLYES tesztrendszer.....	26
6.	Eredmények és értékelésük.....	33
7.	Összefoglalás.....	35
8.	Irodalom.....	36
9.	Köszönetnyilvánítás.....	41
10.	Függelék.....	42
10.1.	1. függelék: Alkalmazott tápoldatok.....	43
10.2.	2. függelék: A microplate lemez felépítése a hígítási sorokkal a standardizálás során.....	45
10.3.	3. függelék: A microplate lemezek felépítése a minták vizsgálata során.....	46
10.4.	4. függelék: A bontási kísérletből származó minták HPLC és BLYES teszt eredményeinek statisztikai összefüggése és a kiugró értékek.....	47
10.5.		47
10.6.	5. függelék: A kémiai analitika eredményei.....	48
10.7.	6. függelék: Az ELISA teszt eredményei.....	51
11.	Nyilatkozat.....	54

1. Bevezető

A mikotoxinok penészgombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, amelyek egyre nagyobb problémát jelentenek világszerte. Egészségkárosító hatásuknak köszönhetően mind a gazdasági állatokra, mind az emberre nézve veszélyt jelentenek. A veszélyük a szervezetre gyakorolt karcinogén, mutagén, teratogén, immunszuppresszív, citotoxikus és hormonhatásukban rejlik. Világviszonylatban az egyik legnagyobb gondot okozó mikotoxin a zearalenon, mely hormonháztartást zavaró hatása miatt reprodukciós és szaporodásbiológiai zavart okoz. Ezen hatások miatt fontos, az élelmiszerekből és az állati takarmányokban a lehetőség szerinti minél hatékonyabb kiküszöbölése.

A mikotoxinok eliminálására a fizikai eljárások mellett egyre népszerűbbek a biológiai módszerek. A kutatások egyik legígéretesebb ágát a biológiai lebontáson alapuló eljárások képezik, amelyek egyre nagyobb figyelmet kapnak. Sorra jelennek meg olyan tudományos cikkek, amelyek a mikotoxinok bontására képes mikroszervezetek izolálásáról és identifikálásáról szólnak. Már kereskedelmi forgalomban is kapható olyan enzimalapú takarmány-adalékanyag, amely képes bizonyos mikotoxinok (zearalenon, ochratoxin) bontásra. Mindezekből következik, hogy egyre nagyobb szükség van olyan alternatív vizsgálati módszerekre a hagyományos analitikai mérések mellett, amelyek a mikotoxinok monitoringjára alkalmasak, és gyorsjelzésű rendszerként képesek a mikotoxin-szintek vizsgálatára.

A hagyományos analitikai módszerek mellett, melyek konkrét szennyező vizsgálata esetén nagy pontossággal és érzékenységgel bírnak, egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a biológiai hatásmérésen alapuló módszereket, melyek az adott szennyezőanyag káros hatását egy tesztszervezet reakcióján mérik. Legtöbbször ezek a biológiai hatást mérő tesztek mutatnak rá a tényleges kockázatra, hiszen olyan folyamatokra is képesek fényt deríteni (egymással reakcióba lépő anyagok kölcsönhatásainak termékei, illetve antagonistá és szinergista hatások a természetes rendszerekben), amelyek analitikai módszerekkel már nem követhetőek, illetve olyan vegyületek hatásairól is információt adnak, amelyek jelenlétét nem is sejtjük, így analitikával nem is vizsgáljuk.

2. Célkitűzés

Munkám során célom volt egy olyan komplex vizsgálati rendszer kialakítása, amellyel megbízhatóan mérhető egy zearalenonnal terhelt rendszerben a toxin illetve annak káros ösztrogén hatásának jelenléte vagy hiánya. Ennek érdekében egy biolumineszcencia alapú, a hormon- és citotoxikus hatás mérésére alkalmas rendszert adaptáltam toxinbontási kísérletekhez. A tesztrendszer a *Saccharomyces cerevisiae* genetikailag módosított törzseit alkalmazza tesztstruktúráként. Az ösztrogénhatás mérésére alkalmas BLYES törzs genomjába humán ösztrogén receptort integráltak, amely segítségével a tesztstruktúra képes az ösztrogén anyagok detektálására. A teszt alapelve, hogy ösztrogénhatású anyag jelenlétében az ösztrogén válasz elemek hatására a plazmidon kódolt fénykibocsátásért felelős gének expresszálnak, így lumineszcencia intenzitás tapasztalható. A BLYES törzs mellett a citotoxicitás mérésére szolgáló BLYR tesztstruktúra szintén genetikailag módosított törzs, amely állandó fénykibocsátással rendelkezik, de toxikus anyag jelenlétében csökkenti a fénykibocsátását. Mindezek alapján a fénykibocsátás változásból következtethetünk az adott minta hormon-, illetve citotoxikus hatására.

A zearalenon detoxifikációjára alkalmas mikroorganizmusok kiválasztása céljából, egy meglévő szénhidrogén bontási potenciállal rendelkező törzsgyűjteményt vizsgáltam. Célkitűzéseim között szerepelt a jó bontási potenciállal rendelkező törzsek közül azok szelekciója, amelyek toxikus metabolitok nélkül képesek a zearalenon degradációjára. A bontás ideje alatt alkalmazott folyamatos screening során nem csupán a bontási folyamat végén értékeltem a detoxifikáció hatékonyságát, hanem a biodegradáció folyamatos nyomon követésével az esetlegesen fellépő kockázat detektálását is célul tűztem ki.

Kísérleteim rámutattak a mikrobiális lebontás során olyan rejtett folyamatokra, amelyek a kiindulási minta toxicitásánál nagyobb kockázatot jelentenek az ökoszisztémára, vagy akár az emberi egészségre.

3. Irodalmi áttekintés

A környezetvédelemnek, mint fogalomnak a köztudatba kerülése Rachel Carson Néma tavasz című könyvének megjelenésének idejére tehető. Carson arra próbálta ráébreszteni az emberiséget, hogy saját és globális környezetünk megóvására törekednünk kell, ugyanis ha az általunk végzett környezetszennyező tevékenységek nem szűnnek meg, vagy nem mérséklődnek, annak súlyos következményei lehetnek. E figyelmeztetés hatására egyre nagyobb mértékben épült a köztudatba a környezetvédelem fontossága, majd 1972-ben megrendezésre került az ENSZ Konferencia az emberi környezetről. A környezetvédelem azóta is mindennapi életünk részét képezi, és komoly megoldandó problémákat vet fel.

3.1. Szennyezőanyagok a környezetben

A környezetbe került, ill. ott jelenlévő toxikus anyagok a gyakorlatban nem csupán önmagukban jelentenek veszélyforrást, hanem kevert szennyezések formájában. Az együtt jelenlévő szennyezőanyagok egymás hatását felerősíthetik, ezen hatások összeadódnak, vagy éppen kiolthatják egymást. Kémiai összetételüket és így toxikus hatásukat tekintve rendkívül eltérőek ezen anyagok, ráadásul veszélyességük mértéke nagyban függ az adott szervezet kitettségétől is. A táplálékláncba kerülve ott felhalmozódhatnak, akumulálódhatnak. Éppen ezért nem elég a szennyezők kémiai vizsgálata, hanem fontos megállapítani az élő szervezetekre, így az egész ökoszisztémára gyakorolt biológiai hatásukat.

A környezetben jelenlévő szennyezők eredetük szerint két csoportra oszthatók: természetes szennyezők, amelyek természetes körülmények között jelen vannak környezetünkben, ám azok feldúsulása emberi tevékenységek következménye; illetve xenobiotikumok, vagyis természetidegen anyagok, melyek funkciós csoportjaikban különböznek a természetes anyagoktól, így természetes körülmények között nem alakulnak ki. A szennyezőanyagok lehetnek könnyen lebomlóak, nehezen lebomlóak, valamint perzisztensek is, amelyek a környezetben maradnak évekig, felhalmozódnak, akumulálódnak az élő organizmusok zsírszöveteiben.

A szennyező anyagok káros hatásukat tekintve lehetnek sejtosztódást gátló (citotoxikus) anyagok. Vannak közöttük elváltozásokat, mutációkat okozó (mutagén) anyagok, lehetnek rákkeltőek (karcinogén), fejlődési rendellenességeket okozó (teratogén), és ismeretesekek immunrendszert (immunszuppresszív) és idegrendszert károsító (neurotoxikus) szennyezők is. A környezetben lévő szennyezők közül előfordulnak hormonhatású anyagok, melyek hatásuk révén az endokrin rendszer működését zavarják.

3.2. Hormonháztartást zavaró anyagok

Manapság egyre nagyobb veszélyt jelentenek a környezetben jelenlévő potenciális egészségkárosító anyagok, többek között a hormonháztartást megzavaró anyagok (Endocrine Disrupting Chemicals, EDC). Ezeket a szennyezőket egy vagy több aromás gyűrű építi fel, melyek között klórozottak is előfordulnak (Byrne et al., 2009). Lehetnek természetes vagy szintetikus eredetűek (Burkhardt-Holm, 2010). Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization) megfogalmazása szerint olyan exogén anyagokról vagy keverékekről, melyek módosítják a hormonrendszer működését, így kedvezőtlen hatással vannak a szervezetre (WHO, 2002).

Az EDC-k hatását az élőlényekre először 1996-ban Theo Colborn írta le Ellopott jövőnk című könyvében, bár öelötte már Carson is tett említést a növényvédőszer hatásával kapcsolatban. Azóta számos publikáció jelent meg a témával kapcsolatban, amelyek rámutatnak a probléma fontosságára és rendre sorakoztatják fel a bizonyítékokat ezen szennyezők káros hatására (Burkhardt-Holm, 2010). A környezetben jelenlévő hormonháztartást zavaró kemikáliák okozta növekvő aggodalom miatt 1995-ben az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal, vagyis az EPA (U.S. Environmental Protection Agency) által szervezett találkozón definiálták először az EDC-ket, úgy mint olyan exogén ágensek, melyek akadályozzák a természetes hormonok eliminációját, szintézisét, szekrécióját, szállítódását, metabolizmusát és működését a szervezetben és felelősek a homeosztázisért, a reprodukciós, és fejlődési folyamatokért (EPA, 1996).

A hormonháztartást zavaró anyagok csoportosítása, és hatásuk a szervezetre

Az EDC-k több csoportra oszthatók (Byrne et al., 2009; Markey et al., 2003): lehetnek természetes hormonok és azok metabolitjai, mesterséges hormonok, fito- és mikoösztrogénok, hormonális mellékhatással rendelkező gyógyszerek, ipari és háztartási eredetű vegyszerek, növényvédőszer és azok metabolitjai, ipari és háztartási eljárásokból származó melléktermékek valamint fémek.

Az EDC-k veszélyessége annak köszönhető, hogy környezetünkben, élelmiszereinkben és a takarmányokban is jelen vannak. Az élő szervezetbe kerülhetnek, fertőzött levegő belégzésével, szennyezett talajjal érintkezve, szennyezett vízzel vagy táplálékon keresztül. Perzisztenciájuk és bioakkumulálódó, vagyis a táplálékláncban felhalmozódó képességük alacsony vízoldhatóságuknak és rendkívül magas zsírolékonyságuknak köszönhető (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Gátolják a szervezet anyagcsere folyamatait, hormonális reakcióit, mivel minden szerv működése endokrin

szabályozás alatt áll. Hatásuk megfigyelhető homeosztatikus és reprodukciós zavarokban, főként fejlődéskor, terhesség alatt, valamint laktációs időszakban is (Kavlock et al., 1996). Mindkét nemet veszélyeztetik, felelőssek szaporodásbiológiai, idegrendszeri, pajzsmirigy, anyagcsere és szívrendszeri zavarokért, növelik a mellrák, prosztatatarák kialakulásának kockázatát (Diamanti-Kandarakis et al., 2009), egy egyed fejlődése alatt megzavarhatják az ivar kialakulását, hatással vannak az agyi fejlődésre, befolyásolják a szervek növekedését és működését (Guillette et al., 1995).

Ezek az anyagok működésük során ösztrogén, androgén, progeszteron receptorokra valamint pajzsmirigy, növekedési és stressz hormonokra is hatnak (Burkhardt-Holm, 2010). Heterogenitásuktól eltekintve hatásuk közös (Burkhardt-Holm, 2010): utánózzák vagy gátolják a hormonok hatását, módosítják a hormonok szintézisét és metabolizációját valamint megváltoztatják a hormonreceptor szinteket.

Az EDC-k lappangási ideje különösen hosszú, ugyanis sokszor a kitettség után évekkel jelentkeznek az első tünetek, és lép fel a tényleges károsodás, ráadásul sokszor hatásuk az utódokon jelentkezik (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Az Európai Unió által kiadott lista szerint az ösztrogénhatású anyagok közül 150 szintetikus eredetű és csak 7 található meg eredetileg a természetben. Vannak köztük a természetben és az emberi szervezetben is gyorsan lebomló anyagok, de nagy számban találhatunk köztük perzisztenseket is (Burkhardt-Holm, 2010).

Az EDC-k jelen vannak peszticidekben, különböző ipari anyagokban, üzemanyagokban, sőt még gyógyszerészeti anyagokban is (Burkhardt-Holm, 2010). Manapság egyre nagyobb számban detektálják intenzív mezőgazdasági művelés alatt álló területeken is (Kolpin et al., 2002), köszönhetően a *Fusarium* nemzetség által termelt mikotoxinoknak, a zearalenonnak (Burkhardt-Holm, 2010).

3.3. Mikotoxinok

„A mikotoxinok mikroszkopikus gombák olyan szekunder anyagcseretermékei, amelyeknek relatíve kis molekulásúlyuk miatt antigén hatásuk nincs, így vakcinákkal nem alakítható ki védettség, és a magasabb rendű élőlényekre mérgező hatásúak” (Kovács, 1980). Ezen anyagok sejtmérgek, melyek vagy egy-egy sejtalkotóra vagy akár teljes sejtfunkciókra is kihatnak, így a táplálékláncba kerülve jelentős egészségromlást okozhatnak. A mikotoxinok problémájának megoldása az utóbbi évtizedben vált különösen sürgetővé.

Számos tudományterület foglalkozik a mikotoxinokkal, mint például az állathigiénia, mely az állatok egészségének védelme által közvetve az emberek környezetének és

egészségének védelmére is irányul, a növénytermesztés, az élelmiszerbiztonság és a környezetvédelem egyaránt.

Fontosabb mikotoxin csoportok és termelőik a következők (Bennett–Klich, 2003): Aflatoxinok (*Aspergillus spp.*), Citrinin (*Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*), Patulin (*Penicillium spp.*), Trichotecének (*Fusarium spp.*, *Stachybotritis spp.*), Fumonizinek (*Fusarium spp.*), Zearalenon (*Fusarium spp.*), Ochratoxin (*Penicillium spp.*), Ergot alkaloidák (*Claviceps spp.*).

3.3.1. Mikotoxin termelő gombák

Mára több mint 5000 gombafajról bizonyított az a tény, hogy gazdasági növényeket károsít (Maráz, 2001), 350 fajról mutatták ki, hogy mikotoxinogének, és ezen penészgombák több mint 400 különböző mikotoxint termelnek (Deák, 2006; Mézes–Balogh, 2010). Egy felmérés szerint a piacon lévő élelmiszeripari árucikkek körülbelül 25%-a mikotoxinnal szennyezett (http2). A hazánkban nagy arányban termesztett szántóföldi növények úgy, mint a búza és a kukorica, fokozottan érzékenyek a mikotoxinokkal szemben.

A penészgombák a környezeti tényezőkkel szemben kevésbé érzékenyek, ugyanis főként oxigénre és nedvességre van igényük. A legtöbb faj hőmérsékleti igénye 10–30°C, széles pH tartományban tudnak szaporodni. Szaporodásuk és anyagcseréjük miatt szükségük van tápanyagokra, melyeket az élelmiszerekből vonnak ki, megváltoztatva azok fizikai és kémiai tulajdonságait, így okozva jelentős minőségromlást (Deák, 2006). A takarmányokban előforduló mikroorganizmusok anyagcsere folyamataik során elsődleges anyagcseretermékeket termelnek, melyeket saját életfolyamataikhoz használnak fel. Ezek más élőlények számára nem jelentenek veszélyt; ezzel ellentétben komoly veszélyt jelentenek az általuk termelt szekunder anyagcseretermékek, a mikotoxinok. A szaporodást elsősorban az oxigén, a hőmérséklet, a megfelelő tápközeg valamint természetesen a víz befolyásolja. Ezzel szemben a toxintermelést egy vagy több környezeti tényezők hirtelen megváltozása okozza. Abban az esetben, ha a gomba számára szükséges bármely környezeti tényező megváltozik, az stressz hatást vált ki a szervezetből, melyre az toxintermeléssel válaszol (Mézes, 2009).

A mikotoxin termelő penészgombákat megjelenésük alapján Christensen és Kaufmann (1969) két csoportra osztotta. Lehetnek szántóföldi, és raktári penészgombák aszerint, hogy a növekedésükhöz mennyi vizet igényelnek. A szántóföldi penészgombák fő jellemzője a nagy nedvesséigény. Képviselői a következők: *Acremonium*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*. Második csoportba tartoznak: *Absidia*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* és a *Rhizopus* nemzetség tagjai (Kovács, 1980). Fontos azonban megjegyezni, hogy egy

mikotoxint több faj is termelhet, és egy penészgomba több toxin termeléséért is felelős lehet (Mézes, 2009).

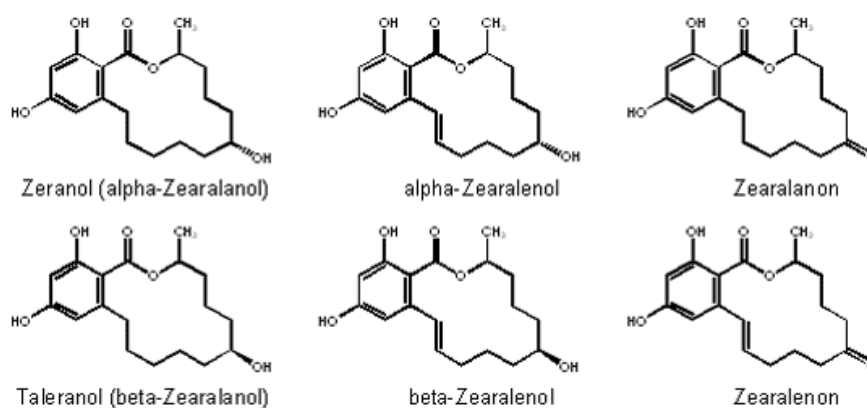
3.3.1.1. *Fusarium* nemzettség

A mérsékelt éghajlatú országokban, így Magyarországon is elsősorban a *Fusarium*-ok által megtermelt toxinok okoznak jelentős állat- és humánegészségügyi kockázatot (http3). A *Fusarium* spp. az összes mikotoxin termelő faj közül a legjelentősebb, ugyanis ez a nemzettség felelős a mikotoxinok egyharmadáért (Deák, 2006). Különböző rezolcilsav-lakton származékokat (zearalenon = ZEA és vegyületei), trichotecéneket (T-2, HT-2 toxin, dezoxinivalenol = DON, diacetoxiscirpenol = DAS), és fumonizineket (FB1-FB6) termelnek (Mátrai et al., 2003). A kártétel helye szerint a szántóföldi csoportba sorolják, de a raktárban is komoly fertőzést okozhatnak (http3). Elsősorban a gabonaféléket és az olajos magvakat fertőzik meg (Mézes, 2009). A fuzáriotoxikózis során a gabona beltartalmi értékei közül leginkább az esszenciális aminosav és keményítő veszteség a jelentős, ezzel szemben a toxikus fehérje bomlástermékek mennyisége megnő (Kovács, 1980).

3.3.2. Zearalenon

A zearalenon (ZEA), vagy más néven F-2 toxin a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fajok által termelt rezolcilsav-lakton. A ZEA-nak már több változata alakult ki, számuk meghaladja a tizenhatot (http3). Származékai többek között a természetben előforduló alfa-zearalenol, beta-zearalenol, zearalanon, 3'-hidroxizearalenon, 8'-hidroxizearalenon, 5-formilzearalenon (1. ábra) (Shier, 1980). A leggyakoribb ZEA-t termelő fajok a következők (Betina, 1989; Bennett-Klich, 2003).:

- *F. avenacum*,
- *F. equiseti*,
- *F. graminearum*,
- *F. culmorum*,
- *F. lateritium*,
- *F. crookwellense*,
- *F. semitectum*



1. ábra: A zearalenon és származékai (http4)

A ZEA – mint ahogyan a többi trichotecénvázás 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 metabolitja az alfa-zearalenol, a ZEA-nál négyszeres aktivitású (Mátrai et al., 2003), míg a béta-zearalenol (a béta az alfa sztereoizomer párja) a ZEA-val megegyező toxicitású (Mézes, 2009). Vizsgálatok kimutatták, hogy az állatfajok közül leginkább a sertés érzékeny rá, mert szemben a többi állatfajjal, ennek szervezetében a metabolizáció következtében alfa-zearalenol keletkezik, ahogyan az emberében is.

A ZEA biológiai hatásait tekintve változatos. Származékaival együtt főként szaporodásbiológiai és ivarzási problémát okoznak, mivel kémiai szerkezetükben hasonlóak a természetes ösztrogénvegyületekhez, és sokszor erősebb ösztrogénhatással bírnak azokkal szemben (Gromadzka et al., 2008). Elsősorban a méh nyálkahártya, a petefészek, a tejmirigy, a hipotalamusz, a hipofízis elülső lebenyének sejtjein található ösztrogén receptorokhoz kapcsolódnak, így tudják kifejteni a hatásaikat. A kórképét már 1927-ben megfigyelték az USA-ban sertéseken, Magyarországon a hatvanas évek óta van jelen (Cseh–Kovács, 2010). 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 termékenységekben is. (Ruzsas et al., 1979) Erre irányuló további kutatások is igazolják, hogy a ZEA csökkenti a tesztoszteron és spermium mennyiségét, és fokozza az elnőiesedést (Etienne–Dourmad, 1994). További káros biológiai hatása a ZEA-nak a vérmérgező tulajdonsága (Maaroufi et al., 1996), genotoxikus és mutagén hatása (Lioi et al., 2004), májkárosító hatása valamint immunotoxicitása (Zinedine, 2005).

Ma már törvényi úton szabályozott a takarmányok, valamint a közvetlenül emberi fogyasztásra termelt gabonafélék megengedhető mikotoxin szennyezettsége. Az Európai Unió által elfogadott takarmányokban mérhető legmagasabb ZEA koncentráció a 2006/576/EK alapján (EC, 2006):

- gabonafélék és gabonakészítmények, kivéve a kukorica melléktermékeket: 2 mg/kg
- kukorica melléktermékek: 3mg/kg

- kiegészítő és teljes értékű takarmányok malacoknak és kocaüldőknek: 0,1 mg/kg
- tenyészkocáknak és hízósertéseknek: 0,25 mg/kg
- borjaknak, tejelő teheneknek, juhoknak (beleértve a bárányokat) és kecskéknak (beleértve a gidákat): 0,5 mg/kg

Hazánkban a forgalomban lévő gabona őrleményekben a ZEA mennyisége 75-200 µg/kg, müzlikben pedig 50 µg/kg lehet. Állati eredetű termékekben kisebb koncentrációban, viszont hosszabb ideig van jelen (Kovács, 2010).

3.4. Mikotoxinok detoxifikálása

A mikotoxinok a táplálékláncba kerülve továbbra is megtartják toxicitásukat, így különösen fontossá vált azok kivonása a takarmányokból illetve élelmiszereinkből. 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 (EFSA, 2009).

Léteznek olyan takarmányadalékok, melyek a takarmányok mikotoxin-mentesítésére szolgálnak. Ezek a mikotoxin detoxifikáló anyagok gátolják a mikotoxinok felszívódását, segítik kiválasztódásukat vagy megváltoztatják azok működését. Ezeket nevezzük mikotoxin detoxifikáló anyagoknak. Működési elvük eltérő. A detoxifikáló módszerek a következők (EFSA, 2009):

- Adsorbensek: nagy molekulásúlyú anyagokról, melyek megkötődnek a mikotoxinok felületén, így csökkentik azok biológiai hozzáférhetőségét. A folyamat során nem károsodik az állat bélrendszere, és az ürülékkel távoznak. Lehetnek szilikon alapú szervetlen vagy szén-alapú szerves polimerek, tejsav baktérium vagy akár élesztő sejtfa.
- Kémiai kezeléseket is alkalmaztak zearalenon tartalom csökkentésére kevés sikerrel, ugyanis a hőkezeléses eljárások nem bizonyultak hatékonynak.
- Biotranszformáló anyagok: baktériumok, gombák vagy enzimek degradálják vagy átalakítják a mikotoxinokat egy nem vagy kevésbé toxikus metabolitra.

3.4.1. Biodegradáció

A biodegradáció a mikroorganizmusok által végzett, biológiai-kémiai történések sorozatán keresztül megvalósuló, lebontási, ill. átalakítási folyamatok (Szoboszlay–Kriszt, 2008). A biodegradációs folyamatokat két csoportra oszthatjuk. A teljes lebontás vagy mineralizáció során a kiindulási vegyületek szén-dioxidra és vízre bomlanak le. A részleges

biodegradáció esetében hiányozhat egy degradációhoz nélkülözhetetlen enzim, ezért a folyamat megreked. A képződött energiát a mikroorganizmusok felhasználják energiaforrásként. Előfordulhat kometabolizmus, mely olyan degradáció is, melynek során a szerves vegyület teljesen lebomlik, viszont a mikrobák nem hasznosítják a felszabaduló energiát. A harmadik esetben a kiindulási vegyületek átalakulnak, és stabilabb vegyületek keletkeznek. A biodegradáció során előfordulhat, hogy az átalakítást végző mikroorganizmusokban felhalmozódnak a szennyezők, és a kiindulási vegyületeknél sokkal toxikusabb metabolitok jönnek létre. A biodegradációt befolyásolja a szennyezőanyag kémiai szerkezete és hozzáférhetősége, valamint a megfelelő mikroszervezetek kiválasztása. A bioremediációs célra is alkalmazni kívánt mikroszervezeteknek faji szinten identifikált, meghatározott bontási spektrummal rendelkező, valamint közegészségügyi szempontból nem kifogásolható, törzsgyűjteményben letétbe helyezett mikroszervezetnek kell lennie.

3.4.1.1. Biodegradációra képes mikroszervezetek

Rhodococcus nemzettség: rendkívül heterogén csoport, így kiválóan alkalmasak különböző szerves vegyületek bontására. A szénhidrogénbontó képességüket katabolikus génjeinek köszönhetik, melyek lineáris plazmidokon vannak kódolva. Képesek lebontani rövid- és hosszúláncú alkánokat, heterociklikus és policiklikus aromás valamint halogénezett vegyületeket is (Larkin et al, 2006). Hatékony aromás vegyületeket bontó képességüket a különböző dioxigenázok vezérlik, melyek a gyűrű felhasításával degradálják a vegyületeket. Nitrilek bontását is nagy hatékonysággal képesek végezni köszönhetően nitriláz és nitril hidratáz enzimjeiknek (Martínková et al, 2008). Hatékonyan adaptálódnak a környezeti feltételekhez és toxikus vegyületekkel szemben is ellenállóak. (Larkin et al., 2005).

Gordonia nemzettség: alkalmazzák őket aromás szénhidrogének bontására. Nem rendelkeznek extracelluláris felületaktív enzimekkel, ám hatékonyabb bontásra képesek, mint más biotenzid termelő társaik. Exopoliszacharidokat termelnek, melyek növelik a szennyezők biológiai hozzáférhetőségét, és olajbontó szubsztrátokat továbbítanak más olajbontó mikroorganizmusok felé (Ta-Chen et al., 2007).

Streptomyces nemzettség: heterogén nemzettség, melyet a szénhidrogénbontásban is megfigyelhetünk. Gyakorlati jelentőségük az antibiotikum-termelésben, így a gyógyászatban van. Ökológiai jelentőségüket bizonyítja, hogy talajlakó baktériumokról lévén, részt vesznek a talaj mineralizálásában, valamint exoenzim termelésüknek köszönhetően képesek a pektin,

kitin, keratin, latex és más szerves molekulák bontására (Bíró, 2001). Fehérje- és szénhidrogénbontást extracelluláris enzimeik vezérlik.

Pseudomonas nemzettség: aerob Gram negatív talajmikroorganizmusok. Különösen alifás, aromás és poliaromás szénhidrogének bontását írták le. Effektív bontási képességüket genetikai tulajdonságainak köszönhetik, mivel a degradációt egy rendkívül stabil metabolikus plazmid vezérli. Ez a plazmid irányítja az összes degradációs utat az aromás vegyületek bontása során (Olsen, 1985).

Pseudoxanthomonas nemzettség: Gram negatív obligát anaerob, pálcika alakú mikrobák, melyek rendelkeznek a *Xanthomonas*-ok és a *Stenotrophomonas*-ok tulajdonságaival. Ám azoktól eltérően képesek a nitritet dinitrogén-oxidra redukálni (Thierry et al., 2004). Alkalmassak poliaromás szénhidrogének, és poliklórozott bifenilek biológiai bontására, bár a szénforrást csak korlátozottan képesek hasznosítani. Oxigenáz enzimeiknek köszönhetően néhány faj alkalmas BTEX vegyületek (Kim et al., 2008), sőt peszticidek, köztük a DDT bontására is. Köszönhetően jó alkalmazkodóképességüknek a környezeti, főként a hőmérsékleti változásokkal szemben ellenállóak (Wang et al., 2010).

3.4.1.2. *A zearalenon biodegradációja*

A ZEA biodegradációjára képes gombákról számos szakirodalom ír, amely során a zearalenon kémiai szerkezetében jelen levő lakton gyűrűk hasítása történik. Először El Sharkawy és munkatársai írták le 1989-ben a ZEA eredményes bontását, melynek során a *Clonostachys rosea* nevű mikroorganizmussal bontották fel a toxin gyűrűs rendszerét. Ugyanezt a fajt alkalmazták Takahashi-Ando és munkatársai is a ZEA mennyiségének csökkentése érdekében 2004-ben. Az említett gombából izolálták a ZEA detoxifikációjáért felelős laktonohidroláz enzim génjét, *zhd101*-et, amelyet *Escherichia coli* és *Saccharomyces cerevisiae* mikroszervezetekbe transzformáltak, így előállítva ZEA bontásra képes genetikailag módosított szervezeteket; ezen kívül a *zhd101* gént GM rizsbe ültetve is értékelték ZEA detoxifikáló hatékonyságát. Az *E. coli* által végzett degradáció hatékonynak bizonyult, míg a *S. cerevisiae* kisebb aktivitást mutatott. Érdekes módon a GM rizzsel beállított kísérletek során is jelentős toxinmennyiség csökkenést mutattak ki. További mikroszervezetről is bizonyított ZEA bontó képessége. A *Trichosporon mycotoxinivorans* élesztőgombafaj leírása után bizonyították annak ZEA és ochratoxin bontó képességét is (Vekiru et al., 2010), valamint, hogy a biodegradációs végtermék már nem rendelkezik ösztrogénhatással (Molnar et al., 2004).

Számos természetben jelenlevő mikroorganizmus rendelkezik mikotoxin bontó képességgel. Szakirodalmi adatok alapján a *Rhodococcus* és *Pseudomonas* nemzetség tagjai kiemelkedő toxinbontási képességgel bírnak (Kukolya et al., 2011). Ezen felül a *Streptomyces griseus*, *S. rutgersensis* fajról is bizonyították már toxinbontó tulajdonságukat (El-Sharkawy, 1987).

3.5. A mikotoxinok vizsgálati módszerei

A mikotoxinok mennyiségi mérése különösen nehéz. Az erre használt módszerek éppen ezért drágák, ráadásul időigényesek is. A mikotoxinok kimutatására és mennyiségi meghatározásukra sokféle módszert dolgoztak ki, köszönhetően kémiai szerkezetük sokféleségének.

3.5.1. Kémiai analitika

A toxin elválasztására elsősorban kromatográfias módszereket használnak. A kromatográfia a kémiai analitika leggyakrabban alkalmazott módszere, mely a különböző alkotók elválasztásán alapul. A módszer lényege, hogy a mintát egy ún. mozgófázisba juttatjuk. A rendszerben található még egy fázis is, az ún. állófázis, mely a kromatográfias oszlopon kötött szemcsés hordozón található. A minta áthaladva az oszlopon kapcsolatba kerül az állófázissal, mely oldhatóságától függően hosszabb-rövidebb idő alatt kerül az oszlop végén található detektorba. Tehát a minta komponensei eltérő oldódási sebességük következtében válnak szét (Kristóf, 2000). Számos kromatográfias eljárást alkalmaznak (vékonyréteg kromatográfia, gázkromatográfia-tömeg spektrometria, magasnyomású-folyadék-kromatográfia) (Mézes, 2009). A magasnyomású-folyadék-kromatográfia (HPLC = High-Performance Liquid Chromatography): a legszélesebb körben alkalmazott kémiai analitikai módszer pontosságának és megbízhatóságának köszönhetően. A mozgófázis folyadék, mely két részre oszlik, egy mérő valamint egy referencia ágra. A mérés során a főlösleges 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 zearalenon 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 kromatográfias elválasztást alkalmaz kiegészítve a további szelekciót lehetővé tevő

kettő tömeg spektrométerrel (Búza – M. Schill, 2010). Az állati takarmányokban megtalálható zearalenon HPLC-vel történő vizsgálatának elfogadott szabványa a pr EN 15792:2009 (EFSA, 2009). Érzékenyebb a többi kromatográfias módszerrel szemben. Hátrányaként említhető drágasága, időigényessége valamint, hogy megfelelő szaktudást igényel.

3.5.2. Immunanalitikai módszerek

Széles körben alkalmazott módszer az 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. A toxin egy fehérjéhez, mint vivőanyaghoz kapcsolódik, ami antitestek termelését váltja ki, melyek pedig sikeresen felismerik az adott toxint (Gromadzka et al., 2008). Kevésbé pontos, mint a HPLC, viszont előnye, hogy olcsóbb, gyorsabb és egyszerűbben alkalmazható (http2).

3.6. Toxikológia és ökotoxikológia

Az emberi felhasználásból a környezetbe került vegyi anyagok illetve a természetes anyagok feldúsulása különös veszélyt jelent az emberekre, állatokra így az egész ökoszisztémára nézve is. Ezen anyagok élő szervezetekre gyakorolt hatásait vizsgáló és az élőlények válaszreakcióival foglalkozó tudományág a toxikológia. A toxikológia mérgekkel, és azok hatásmechanizmusával foglalkozik (http5). „A toxicitás tehát egy anyag káros hatása egy biológiai szervezetre” (Gruiz et al., 2001).

Az ökotoxikológia biológiai módszerekkel vizsgált környezetbe kerülő anyagok a környezet élőlényeire gyakorolt hatását tanulmányozza egyed feletti biológiai szerveződési szinten (Láng, 2002). Az ökotoxikológia tehát, különböző szennyezőanyagokat, illetve azok ökológiai rendszerekre gyakorolt hatását vizsgálja (Calow, 1993). Az ökotoxikológiai módszerek alkalmasak lehetnek egyed és populáció, társulás és ökoszisztéma szintjén történő vizsgálatokra. Ismert és ismeretlen szennyezőanyagok környezeti hatásait is megismerhetjük a tesztorganizmus válaszreakcióiból. Egy egyed vizsgálata során annak élettani változásait vizsgálhatjuk, másik esetben pedig az egész populációban bekövetkező változásokra (szaporodás, egyedsűrűség) enged következtetni. A társulásban a fajsza m változást és a fajok közötti kapcsolatot követhetjük nyomon, valamint alkalmas az egész ökoszisztémára kiterjedő anyag- és energiaforgalom vizsgálatára is (http6).

A toxikológiai vizsgálatok tervezése során elsődleges szempont a tesztorganizmus kiválasztása, mivel azok reakciói alapján lehet következtetni a hatásokra, ezért ismernünk kell

azok érzékenységét. Legalkalmasabbnak a legérzékenyebb szervezetek tekinthetők, mert azok engednek következtetni az egész ökoszisztéma érzékenységére is. Fontos szempont, hogy a választott tesztszervezet laboratóriumi körülmények között fenntartható legyen (Gruiz et al., 2001). A módszer és a mikroba kiválasztásakor tehát elsősorban a vizsgálati célt, valamint a vizsgálandó szennyezőanyagot és annak koncentrációját kell figyelembe venni ([http6](http://6)).

Az biológiai hatásmérésen alapuló tesztek lehetnek akut, néhány óra alatt lezajló, illetve krónikus, a tesztszervezet egész élettartama vagy reprodukciós ciklusa alatt zajló tesztek. Ezek a módszerek különböző toxicitási dózisokat és/vagy koncentrációkat mérnek, különböző végpontokat vizsgálnak. A dózis a toxikológiai által alkalmazott azt a konkrét anyagmennyiséget jelöli, melyet egy organizmus különböző expozíciós útvonalakon felvesz. Ezzel szemben az ökotoxikológiában dózis helyett környezeti koncentrációt alkalmazunk, mivel a környezetben jelenlevő szennyezés során nem tudjuk, hogy mely anyagok pontosan milyen arányban, mekkora mennyiségben vannak jelen, csak az általuk kiváltott biológiai hatás a vizsgálható. A kapott eredmények függvényében rajzolhatjuk fel a szigmoid vagy S-alakú koncentráció-válasz görbét, mely megmutatja a növekvő koncentráció által kiváltott hatást (Gruiz et al., 2001).

3.6.1. Az ökotoxikológiai módszerek előnyei és hátrányai

Az ökotoxikológiai módszerek 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 ökotoxikológiai és kémiai-analitikai vizsgálatok együttesen alkalmasak annak a megállapítására, hogy mekkora kockázattal, milyen változás bekövetkeztével és milyen hatással jár az élő szervezetekre ezen szennyezők felszabadulása. Az ökotoxikológiai és kémiai analitikai eredmények a következő módon térhetnek el egymástól:

- Az analitikai eredmények nagy szennyezőanyag koncentrációt mutatnak, míg az ökotoxikológiai hatás kicsi. Ennek oka lehet, hogy a vegyi anyagok kötött állapotban vannak, kioldásuk biológiai folyamatokkal nem lehetséges. Az ilyen eset vezet a kémiai időzített bomba lehetőségéhez. Ha egy külső környezeti hatás megváltoztatja valamelyik paramétert, akkor a szennyezőanyag hozzáférhetővé válik az élőlények számára, így komoly környezeti veszélyforrássá válhat.

- Előfordulhat, hogy a kémiai analitikai eredmények nem támasztják alá a tapasztalt ökotoxikus hatást, ugyanis olyan új ismeretlen anyag okozza a toxikus hatást, amely jelenlétét nem sejtjük, így analitikai módszerekkel nem is vizsgáljuk. Továbbá a természetben

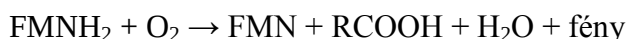
tapasztható antagonista/szinergista hatások is okozhatnak olyan toxikus körülményeket, amelyek analitikai módszerekkel nem elemezhetőek. (http6).

Az ökotoxikológiai módszerek számos előnnyel bírnak: gyorsak, pontosak, jól reprodukálhatók és a kémiai analitikához viszonyítva olcsóbbak is. Mindezek mellett a kísérletek nem vetnek fel etikai problémát, mert a tesztszervezetek alacsony szerveződési szinteken lévő élőlények. Az ökotoxikológiai módszerek 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). Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a négy alapvető szempont, melyet az ökotoxikológiai módszerektől elvárhatunk a reprodukálhatóság, az érzékenység, a megbízhatóság és a környezeti realizmus (Gruiz et al., 2001).

3.7. Biolumineszcencia, mint a toxicitás indikátora

A biolumineszcencia élő szervezetek általi fénykibocsátás, melyet enzimek katalizálnak. Fénykibocsátásra képes élő szervezetek 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). A biolumineszcenciához szükséges az oxigén, illetve a folyamatban az elsődleges elektron donor a NADH. A fénykibocsátást a lumineszcencia rendszer vezérli, melynek meghatározó *lux* génjeit izolálták például *Vibrio* és *Photobacterium*, valamint a szárazföldi *Xenorhabdus* fajokból. A biolumineszcens baktériumok a *luxCDABE* operont tartalmazzák, mely egy heterodimer luciferáz enzimet (*luxAB*), valamint annak szubsztrátját, egy hosszú szénláncú zsíraldehidet előállító enzimkomplexet (*luxCDE*) kódol. A luciferáz a zsíraldehidet és a redukált flavin mononukleotidot (FMNH₂) oxidálja, mely reakció során az energia kékeszöld, 490 nm körüli hullámhosszú fény formájában szabadul fel.



A luciferáz és a szubsztrátok keveredése gyorsan zajlik le. Ezt követően az enzim keresztül megy egy körfolyamaton, mely alatt a fénykibocsátás eléri a maximumát. Ha a FMNH₂ ellátása a sejtben folyamatos, akkor a fény állandó szinten marad. A bakteriális *lux* kazetta (*luxCDABE*) 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 belüli változásokra utalva következik be a fénykibocsátás. Tehát

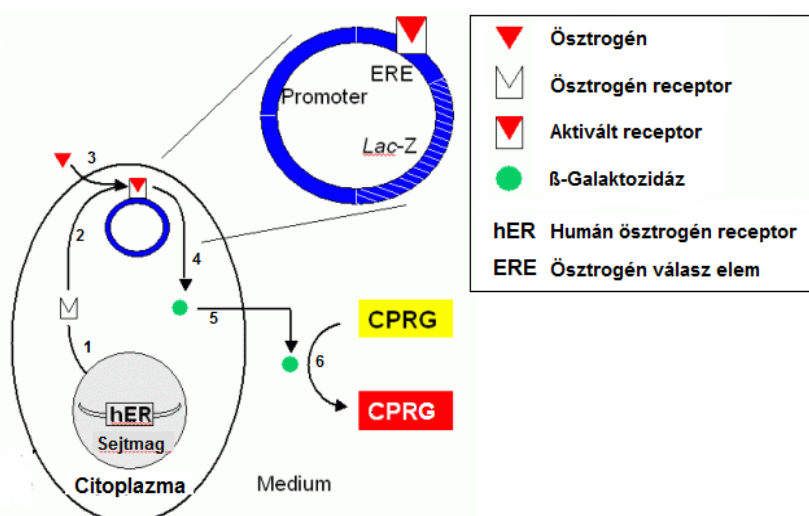
az említett szervezetekből izolált lux gének alkalmazásával vizsgált biolumineszcencia egy gyors, megbízható és érzékeny indikátora lehet különféle szennyezőanyagoknak (Meighen, 1993).

3.8. Ösztrogén kimutatására alkalmas módszerek

Az ösztrogén hatás mérésére számos *in vivo* és *in vitro* módszer áll a rendelkezésre, melyek magas érzékenységgel bírnak, így alkalmasak a receptorkapcsolt agonista és antagonisták hatásának mérésére. *In vitro* kategóriában a következő tesztek léteznek: ligandumkötő módszer, sejtszaporodás vizsgálat, utólagos sejtfelhalmozódás vizsgálata, fehérjeátírás illetve enzimaktivitás indukálása valamint rekombináns receptor/riporter gén vizsgálat, mely speciális endokrin receptorok által keltett biológiai folyamatok előidézésének illetve elnyomásának vizsgálata.

Széles körben alkalmazott módszer a YES (Yeast Estrogen Screen) teszt, mely kiválóan alkalmas különböző anyagok ösztrogénhatásának kimutatására.

Az *Saccharomyces cerevisiae* élesztő DNS-ébe egy humán ösztrogén receptort integráltak, illetve a sejt plazmidon kódolt ösztrogén válasz elemeket tartalmaz, mely szabályozza a *lacZ* gén átíródásának folyamatát. A receptor és az ösztrogén válasz elem kapcsolódását követően az átíródásért felelős faktorokkal szabályozzák a *lacZ* gén átíródását. Annak érdekében, hogy a receptorok aktivitása mérhetővé váljon, szükség van egy szubsztrát, a vörös színű klorofenol- β -D-galaktopiranozid (CPRG) hozzáadásra, mely indukál egy enzimatisz terméket, a színreakciót előidéző β -galaktozidázt. Ez a sárgából vörösbe váltó kolorimetriás reakció mérhető 540 nm-en (2. ábra). A reakció 3-5 napos inkubáció alatt zajlik le, így igencsak lassú tesztről van szó. A folyamatot bonyolítja az említett szubsztrát hozzáadása is (Routledge–Sumpter, 1995).



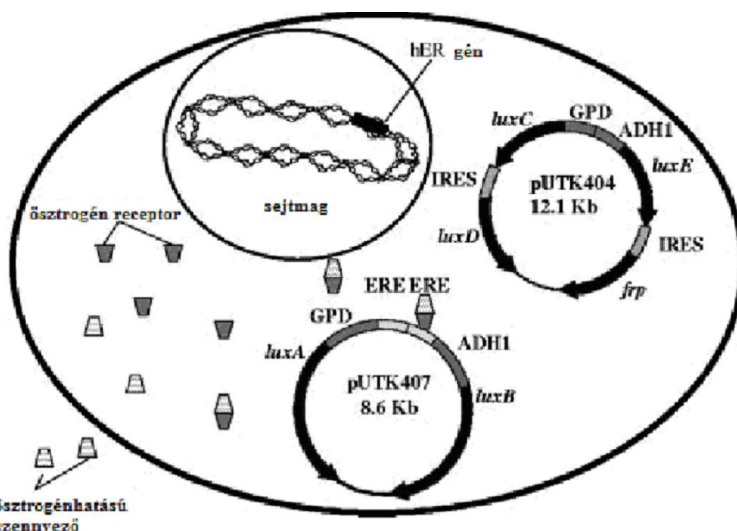
2. ábra: A YES-teszt működési elve (Routledge–Sumpter, 1995)

4. Anyag és módszer

4.1. Az ösztrogén hatás kimutatására alkalmazott biolumineszcens élesztő alapú bioripporter rendszer

A módszer a *Saccharomyces cerevisiae* nevű élesztőtörzs genetikailag módosított változatát használja tesztstruktúráként a hormonhatású anyagok kimutatására, hasonlóan a YES teszthez, ami eredeti állapotban nem képes biolumineszcenciára, de a *lux* génkazetta sejtbe inszertálásával létrehozták a biolumineszcencia alapú BLYES tesztet (Bioluminescent Yeast Estrogen Screen). A BLYES teszt esetében humán ösztrogén receptor génjét (hER- α) integráltak a genomba. Emellett a folyamatban két plazmid játszik szerepet, a pUTK407 és a pUTK404, amelyek tartalmazzák a *Photobacterium 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 *luxA* és *luxB* gént; ezzel együtt a másik plazmid (pUTK404) tartalmazza az aldehid szintéziséért felelős *luxC*, *-D*, *-E* és a FMN redukcióért felelős *frp* géneket (Gupta et al., 2003).

Mindkét plazmidon divergens (szétágazó) promóterek (GPD és ADH1) találhatóak, így az átírás egyszerre kétirányú folyamatban játszódik le. A pUTK407 promótereinek közé beillesztettek tandem (egymás után ismétlődő) ösztrogén válasz elemeket, amelyek elindítják a plazmid átíródását, és egyszerre expresszálják a *luxA* és *luxB* gént. Ezzel együtt a másik plazmidra (pUTK404) egy közbenső riboszóma belépési hely (IRES) lett inszertálva, amely az eukarióta szervezeteken az összetett gének átíródásához szükséges. Így lehetséges a plazmidon a *luxC*, *-D*, valamint a *luxE* és az *frp* gének együttes átírása (3. ábra).



3. ábra: A BLYES-teszt működési sémája (Sanseverino et al., 2005)

A BLYES törzzsel egyidőben alkalmaztam egy konstitutív kontroll törzset, amely a citotoxicitás mérésére alkalmas *Saccharomyces cerevisiae* BLYR törzs (Sanseverino et al., 2008; [http7](http://7)) volt. A BLYR törzs esetében a biolumineszcenciáért felelős gének átíródása állandó, viszont a sejt életfeltételeire károsan ható anyagok következtében lumineszcencia gátlás tapasztalható (Sanseverino et al., 2008).

A hormonhatás és a citotoxikus hatás mérésére alkalmas bioriporiter rendszerrel már 3-5 órás inkubációs idő elteltével is megbízható információt kapunk a vizsgált mintáról. A BLYES, BLYR rendszer esetében szubsztrát hozzáadására nincs szükség. (Sanseverino, 2005, Sanseverino, 2008).

4.2. Előkísérletek és a teszt standardizálása

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 (1. függelék). Minden összetevőt autoklávban steriliztem ($121^{\circ}C$, 1,2 bar) a vitamin oldat és a réz-szulfát oldat kivételével, amelyeket pedig $0,2\ \mu m$ pórusátmérőjű membránszűrőn szűrtem át. Az összeállítást lamináris boxban, steril eszközökkel végeztem a befertőződés elkerülése végett. Miután a tápoldat elkészült, a $-80^{\circ}C$ -on tárolt BLYES (1. kép) és BLYR (2. kép) inokulumot 250 ml-es Erlenmeyer lombikban szaporítottam 30 ml tápoldatban, majd termosztátban rázattam ($30^{\circ}C$, 200 rpm). A törzssuszpenziót egy éjszakán keresztül szaporítottam, majd sejtsűrűségét $600\ nm$ -en (OD_{600}) 1-re állítottam be (Sanseverino, 2008).



1. kép: A BLYES táptalajon



2. kép: A BLYR táptalajon

kontroll beállítása történt. A lemezeken elkészítettem a $17-\beta$ -ösztadiol és a ZEA hígítási sorát. Hígító oldatként metanolt használtam. A kiindulási koncentráció Sanseverino és munkatársai leírását követve az ösztadiol esetében $1E-05\ mol/dm^3$ volt és $2,5E-11\ mol/dm^3$ végső koncentrációig jutottam el. A ZEA hígítási sora $1E-03\ mol/dm^3$ -ről indult és $2,5E-09\ mol/dm^3$ -re hígítottam (2. függelék).

Két negatív kontroll használata is szükséges volt: a hígításhoz használt metanol és a tesztstruktúrát tartalmazó kontroll, valamint magát a tesztstruktúrát tartalmazó kontroll.

A minták és kontrollok kiadagolása ($20\ \mu l$ /microwell) után a beállított sejtsűrűségű tesztstruktúrát $200\ \mu l$ -ét adagoltam a microplate megfelelő részeibe és a microlemezt $30^{\circ}C$ -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 értékeim 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 tesztrendszer értékelése során meghatároztam a pozitív kontroll EC_{50} értékét, amely az 50%-os lumineszcencia változást okozó hatásos koncentráció értéket fejezi ki. 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 csökkenését eredményező toxicitási értéket.

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

4.3. Bontási kísérlet

Vizsgálataim során szénhidrogénnel szennyezett területekről izolált, már meglévő törzsgyűjteménybe tartozó mikroszervezetekkel dolgoztam, amelyek előzetesen igazolt mikotoxin bontó képességgel rendelkeznek. Ezen mikroszervezeteket bontási kísérletbe állítottam, a bontási rendszerekből származó felülszó mintákat pedig egy komplex vizsgálati rendszerrel vizsgáltam, amely magába foglalta a biológiai (BLYES, BLZR), kémiai analitikai (HPLC), és immunanalitikai (ELISA) módszereket.

A kísérletekhez a ZEA toxint a Fermentek Kft-től (Izrael) szereztem be és acetonnal oldottam. Törzsolatot készítettem 1000 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban, amelyet a különböző vizsgálati irányokhoz használtam fel.

A bontási kísérletbe vont mikroszervezetek

- *Rhodococcus erythropolis* NI1
- *Rhodococcus pyridinivorans* AK37
- *Rhodococcus pyridinivorans* K402
- *Rhodococcus pyridinivorans* K404
- *Rhodococcus pyridinivorans* K408
- *Rhodococcus ruber* N361
- *Rhodococcus globerulus* N58



3. kép: A bontási rendszerek a termosztátban

- *Rhodococcus aetherivorans* AK44
- *Streptomyces cavourensis* K14
- *Pseudoxanthomonas kalamensis* H4
- *Pseudomonas pseudoalcaligenes* FEH28
- *Gordonia paraffinivorans* NZS6



4. kép: Mintavételezés

4.3.1. Inokulum előállítása

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

4.3.2. Kísérleti rendszerek

A biodegradációs kísérletek 50 ml tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikban (300 ml) folytak, 3 párhuzamos rendszer beállításával (3. kép). A bontási kísérletek közege $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ZEA-val kontaminált LB tápoldat (45 ml) volt, amelyet 5 ml inokulummal oltottam be. A bontás során alkalmaztam egy mikrobamentes kontrollt (vak), amely szintén $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ZEA-val kontaminált 50 ml LB tápoldatot tartalmazott.

A kísérleti rendszereket 7 napon keresztül inkubáltam (28°C , 170 rpm), majd a párhuzamos bontási rendszereket mintáztam (4. kép). A mintákat lecentrifugáltam (15000 rpm, 4°C , 20 min.), a felülúszót dekantáltam és a pellettől külön tároltam -20°C -on a további vizsgálatokig. A felülúszót és pelletet egy 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 pedig biológiai hatáselemzés alá vontam, amely során a két biolumineszcens élesztő alapú biorporter tesztorganizmet, a BLYES (hormonhatást vizsgáló) és a BLYR (citotoxikus hatást vizsgáló) tesztorganizmust alkalmaztam.

4.3.2.1. HPLC

A kémiai analitikai tesztelést a Wessling Hungary Kft. akkreditált laboratóriuma végezte. A mért koncentrációt HPLC-FLD módszerrel, vagyis fluoreszcens detektorral

felszerelt folyadék kromatográffal határozták meg. A metanol-víz 1:1-es keverékéből álló hígítás után a minta 50 µl-e lett a HPLC-FLD rendszerbe injektálva. A szétválasztás a C18-as oszlopon (Vydec Denali, 4.6x150 mm; 5 µm) izokratikus körülmények között történt. Ehhez 45:55 arányú víz-acetonitril oldatot használtak. A ZEA-t 274 nm (extinkció) és 440 nm (emisszió) hullámhosszon detektálták.

4.3.2.2. ELISA tesztek

A toxinkoncentrációk meghatározását a Soft Flow Hungary Kft. végezte ELISA Kittel, Toxiwatch rendszerben. A vizsgálatok a gyártó útmutatásai szerint folytak. A Toxiwatch ELISA Kit metanol (7,5%) alapú toxin extrakciós módszert használ, ezért a standard sornak is tartalmaznia kellett metanolt. Mivel a bakteriális sejtfelülűszo mátrixa LB médium, amely nem tartalmaz metanolt, így metanolt nem tartalmazó standard pontokat is alkalmaztak. A mintákat három párhuzamos rendszerben vizsgálták.

4.3.2.3. A bontási kísérletek biológiai hatáselemzése

A tesztsszervezetek előkészítése a 3.2. pontban leírtaknak megfelelően történt. A vizsgálandó mintákból 1:2 hígítási sort készítettem (3. függelék), majd 20 µl-t adagoltam a microplate megfelelő részeibe. A vizsgálatok során pozitív kontrollként a bontási kísérletből származó pozitív kontrollt (VAK) oldatot alkalmaztam, illetve az tesztet a 3.2. pontban ismertetett módon folytattam.

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

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

ahol a K = a teszt során alkalmazott negatív kontrol biolumineszcencia értékét, az M = pedig a minta fénykibocsátási értékét jelenti.

4.3.3. Statisztikai értékelés

Munkám során a statisztikai értékelést STATISTICA 7 (StatSoft Hungary Kft.), PAST (Hammer et al., 2001) és Microsoft EXCEL (Microsoft Inc., 135 Redmond, USA) szoftverrel végeztem.

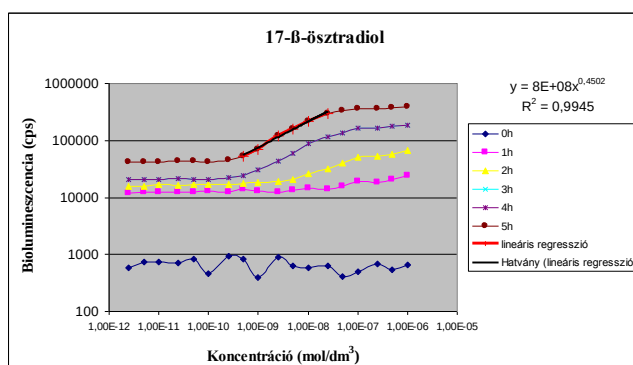
5. Eredmények

5.1. A BLYES, BLYR teszrendszer előkísérletei

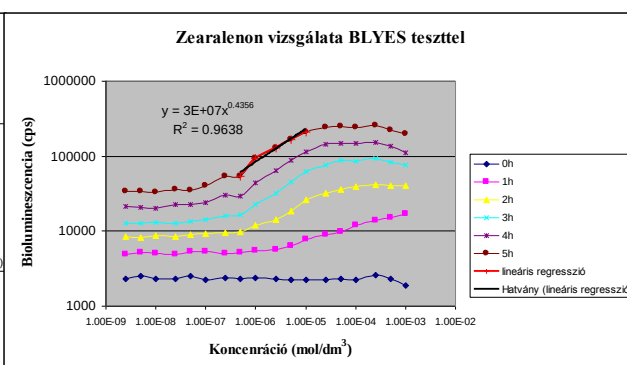
A biológiai hatáselemzés kivitelezésekor a vizsgálatok első részeként a tesztrendszer működését ellenőriztem. Szakirodalmi adatok alapján a 17- β -ösztradiol toxicitása $EC_{50}=6,3E-10 \text{ mol/dm}^3$, a ZEA EC_{50} értéke pedig $1,90E-06 \text{ mol/dm}^3$ (Sanseverino et al., 2008).

A 17- β -ösztradiol mérése során saját eredményeim az 4. ábrán látható lefutási görbét adták, illetve az 5 órás inkubációs időt figyelembe véve $EC_{50}=7,63E-09 \text{ mol/dm}^3$ értéket kaptam.

A ZEA fénykibocsátási értékei alapján az 5. ábrán látható görbét kaptam, mely lineárisa alapján az $EC_{50} = 3,09E-06 \text{ mol/dm}^3$ értéket határoztam meg.



4. ábra: A 17- β -ösztradiol ZEA hatására mutatott biolumineszcencia értékei



5. ábra: A BLYES tesztrendszer ZEA hatására mutatott biolumineszcencia értékei a standardizálás során

A 17- β -ösztradiol és zearalenon esetében is a szakirodalmi adatokhoz képest saját eredményeim alapján az 50%-os lumineszcencia változáshoz magasabb koncentrációjú minta szükséges. A szakirodalomhoz képest tapasztalt minimális eltérést okozhatja az alkalmazott hígító oldat; miszerint a szakirodalom alapján metanolban oldották a tesztelendő anyagot, amivel ellentétben, saját kísérleteimben acetont alkalmaztam. Mindezek mellett a plazmidon kódolt tandem ösztrogén válasz elemek is okozhatnak eltérést, hiszen ezek felelősek a biolumineszcencia szabályozásáért és számuk plazmidvesztés esetén csökkenhet.

A ZEA BLYES tesztrendszerre kifejtett hatásos koncentráció értéket alapul véve az $0,99 \mu\text{g/ml}$ koncentrációjú oldatnak felel meg. Ebből kiindulva a bontási kísérletek kiindulási koncentrációját az élesztő érzékenységéhez igazítva $1 \mu\text{g/ml}$ koncentrációra állítottam be.

Mindezek mellett a BLYES tesztrendszer 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 .

5.2. A bontási kísérletek értékelése

A kísérleteim során a vizsgálni kívánt mikroszervezetek esetében a bontási potenciált hasonlítottam össze a mikroszervezetek azon képességével, hogy milyen mértékben képesek a káros biológiai hatás megszüntetésére. Az analitikai eredmények alapján a mikroszervezetek bontási potenciáljuk szempontjából három csoportra oszthatók (1. táblázat):

- I. kiváló (>90%-os) bontási potenciállal rendelkező törzsek
- II. jó (>50%-os) bontási potenciállal rendelkező törzsek
- III. elégtelen (<50%-os) bontási potenciállal rendelkező törzsek

		HPLC	ELISA
		Átlagos bontási potenciál (%)	Átlagos bontási potenciál (%)
I.	<i>S. cavourensis</i> K14	98.46 ± 0.00	92.99 ± 1.75
	<i>P. kalamensis</i> H4	98.20 ± 0.00	97.70 ± 0.00
	<i>G. paraffinivorans</i> NZS6	98.20 ± 0.00	78.89 ± 4.80
	<i>R. pyridinivorans</i> K402	89.83 ± 4.31	93.02 ± 0.76
	<i>R. pyridinivorans</i> K404	85.52 ± 0.53	93.00 ± 0.36
II.	<i>R. pyridinivorans</i> K408	87.24 ± 2.83	85.39 ± 1.02
	<i>P. pseudoalcaligenes</i> FEH28	86.96 ± 0.74	82.69 ± 1.14
	<i>R. erythropolis</i> NI1	75.95 ± 1.00	70.93 ± 2.56
	<i>R. pyridinivorans</i> AK37	61.14 ± 2.77	64.67 ± 1.77
III.	<i>R. ruber</i> N361	27.64 ± 3.46	54.60 ± 3.33
	<i>R. aetherivorans</i> AK44	27.12 ± 2.24	42.61 ± 4.10
	<i>R. globerulus</i> N58	26.24 ± 20.93	19.92 ± 15.87

1. táblázat: A zearalenon bontási kísérletbe vont mikrobatörzsek mikotoxin-bontási potenciálja kémiai analitikai (HPLC) és immunanalitikai (ELISA) mérésekkel

Öt törzs esetében tapasztaltam kiváló ZEA bontást. A *Streptomyces cavourensis* K14 bizonyult a leghatékonyabb törzsnek, ugyanis közel 100%-os degradációt végzett. A *Pseudoxanthomonas kalamensis* H4 és a *Gordonia paraffinivorans* NZS6 magas, 98%-os degradációs képességükkel a vizsgált törzsek közül jelentősen kiemelkedtek. A *Rhodococcus pyridinivorans* K402 és a *Rhodococcus pyridinivorans* K404 90%-hoz közeli bontást mutattak, ezért sorolhatók még a kiváló bontási képességgel rendelkező törzsek közé.

A vizsgált törzsek nagy százalékban eredményesnek bizonyultak, így a következő négy törzs hatékony, több mint 50%-os ZEA biodegradációs képességével jól bontó mikrobáknak mondhatók. Ezek közül is kiemelkedőek voltak a *Rhodococcus pyridinivorans* K408 és *Pseudomonas pseudoalcaligenes* FEH28 több mint 80%-os ZEA bontási képességgel. A *Rhodococcus erythropolis* NI1 jelzésű törzs az 1 µg/ml ZEA több mint 70%-át volt képes eliminálni, míg a *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 több mint 60%-át bontotta a toxinnak. A harmadik csoportba tartozó mikroszervezetek a toxinnak csak jóval kevesebb, mint a felét degradálták. A *Rhodococcus aetherivorans* AK44 és a *Rhodococcus ruber* N361 20% feletti bontásával még képes volt a ZEA szerkezetének megbontására, de a *Rhodococcus globerulus* N58 már egyáltalán nem alkalmas ZEA bontásra.

A HPLC és ELISA eredmények között szoros egyenes arányú összefüggés tapasztalható. A statisztikai értékelésnél Spearman–féle rangkorrelációt alkalmaztam, amely a lineáris korrelációs együttható speciális esetének tekinthető. A módszer a kapcsolat szorosságának mérésére a két változó rangszámainak különbségét használjuk fel. Amennyiben szoros kapcsolat fedezhető fel a változók között, úgy az együttható nagyobb, mint 0,6. Esetemben a Spearman–féle rangkorreláció a HPLC és ELISA eredmények tekintetében 0,86 volt, tehát két módszer eredményei korrelálnak egymással. Az eredmények sorában egyetlen esetben volt tapasztalható nagyobb eltérés. Az NZS6 jelzésű törzs esetében 98,2% bontási képességet tapasztaltam, míg az ELISA eredmények alapján ez az érték 78,89% volt. Ennek az ellentétnek a feloldására magyarázatot adhat, a ZEA és annak metabolitjai között lejátszódó keresztreakciók az ELISA mérés közben. A tesztben alkalmazott 201072-88 monoklonális antitest szakirodalmi adatok alapján a következő keresztreakciókat mutatja: zearalenon (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 ezen vegyületeket is tartalmazza.

5.3. A minták hormonhatásának eredményei

A biodegradáció során tapasztalt káros biológiai hatás mérése a BLYES/BLYR-teszttel történt. A kontroll és a párhuzamos mérési eredmények a protokollban leírtaknak megfelelő eredményeket adtak.

5.3.1. BLYR tesztstruktúra

A bontási kísérletek 7. napjára nem tapasztaltam a BLYR tesztstruktúrával semmilyen maradék citotoxikus hatást, amely eredményeket extrapolálva magasabb szerveződési szintekre, azt feltételezhetjük, hogy nincs káros sejtnövekedést gátló hatás. Mindezek mellett, ezen eredmények azt is jelentik, hogy a tesztstruktúra növekedésgátlásának vizsgálatára alkalmazott kontroll esetében a *S. cerevisiae* tesztstruktúrára a minták nem fejtenek ki gátló hatást, tehát a hormonhatás vizsgálatára alkalmazott BLYES törzs eredményei megbízhatóan fogják a hormonhatást jelezni.

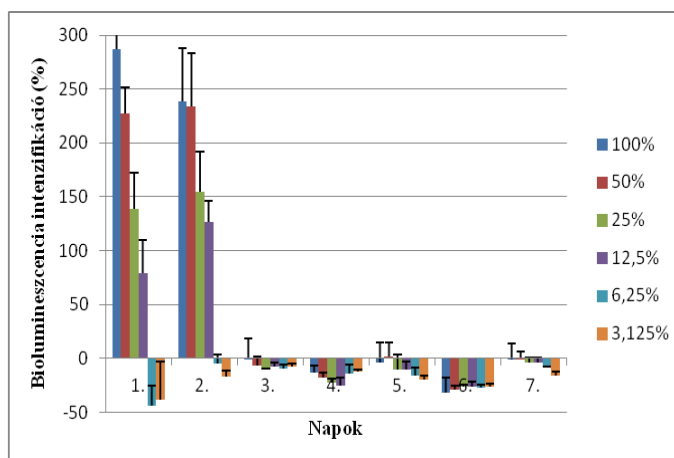
5.3.2. BLYES tesztstruktúra

A bontási kísérletből származó mintáimat 7 napon keresztül vettem alá biológiai hatáselemzésnek. A minták hormonhatását a bontás során alkalmazott kontrollhoz (VAK) viszonyítottam, ugyanis bontó mikroorganizmusok hiányában hormonhatása a bontás ideje alatt állandó maradt.

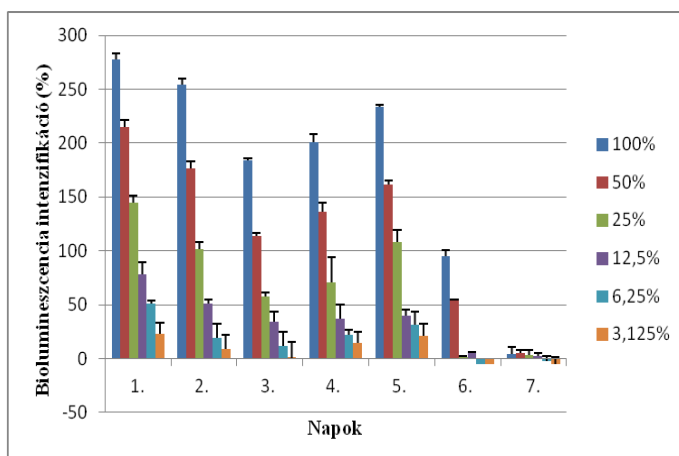
5.3.2.1. A bontási kísérlet során tapasztalt hormonhatás részletező értékelése a mikroszervezetek bontási potenciálja alapján

I. Kiváló bontási potenciállal rendelkező törzsek

A hormonhatás elemzés alapján is a legeredményesebb törzsnek a K14 bizonyult, mely a bontás végére egyáltalán nem mutatott hormonhatást. Hatékonysága jól látható a 6. ábrán, amely tisztán mutatja, hogy a mintában csak az első két nap során tapasztaltam tényleges hormonhatást, a harmadik napra a törzs már megszüntette ZEA káros biológiai hatását.

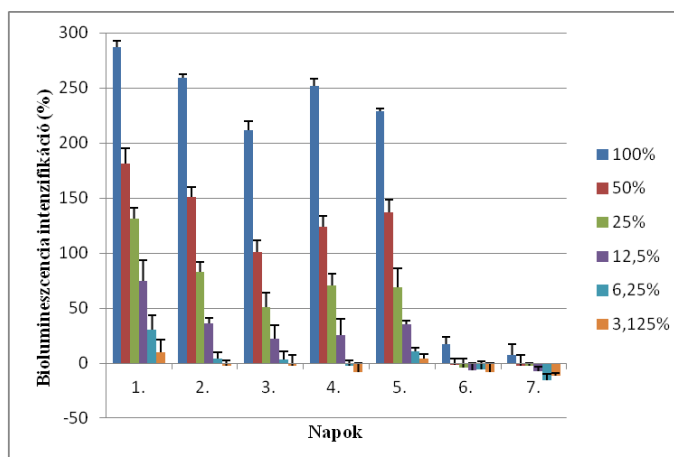


6. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *Streptomyces cavourensis* K14 ZEA metabolizációja során

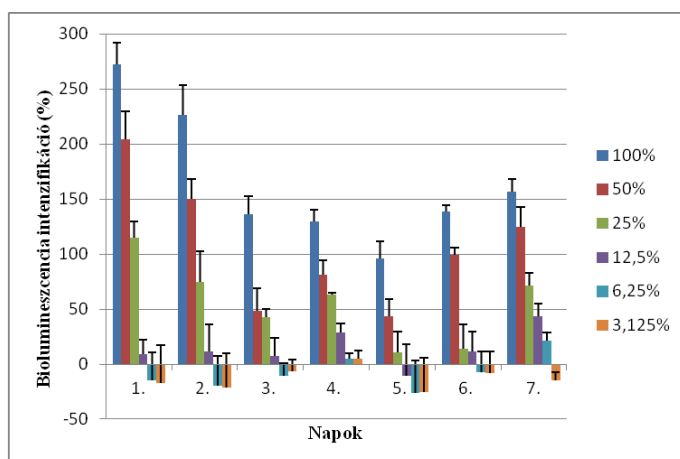


7. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus pyridinivorans* K402 ZEA metabolizációja során

A negyedik, ötödik napon kismértékű emelkedést mutatott, végül az utolsó két napra a minták hormonhatása nagymértékben lecsökkent.



8. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus pyridinivorans* K404 ZEA metabolizációja során



9. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás az *Gordonia paraffinivorans* NZS6 ZEA metabolizációja során

A HPLC eredmények alapján kialakított 1. táblázat szerint a *G. paraffinivorans* NZS6 jelzésű törzs kiváló bontási potenciállal rendelkezik, ugyanakkor a biológiai hatásmérés eredményei alapján nem szüntette meg a hormonhatást. A 9. ábrán jól látható,

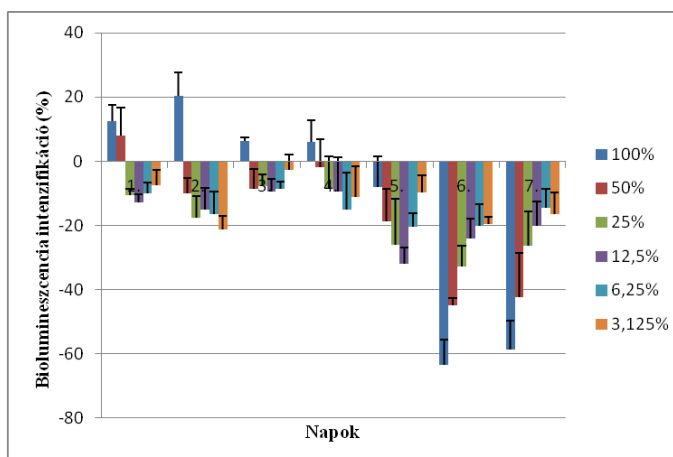
hogy a toxin bontása megindult, ami egészen a kísérlet közepéig tartott,

amikor az 5. naptól a hormonhatás újra emelkedni kezdett, mely valószínűsíthetően a hormonhatású metabolitok termelésével magyarázható.

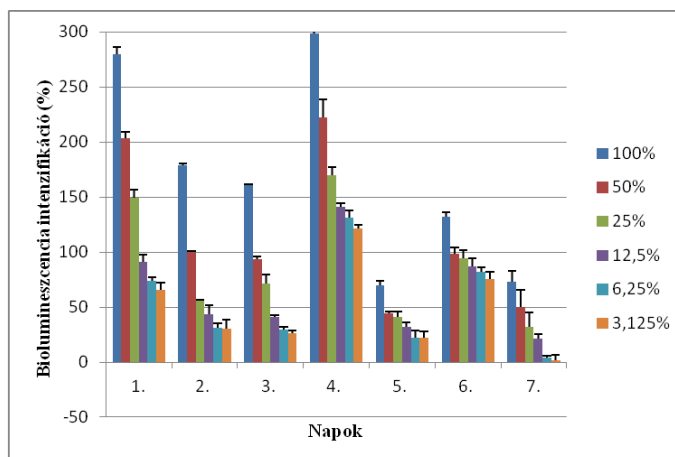
A *Pseudoxanthomonas kalamensis* H4 jelzésű törzset a kiválóan bontó törzsek közé soroltam az analitikai eredmények szerint, viszont a biológiai hatásmérés alapján ezt nem állíthatom teljes bizonyossággal, mivel a 10. ábrán látható, hogy lumineszcencia gátlás következett be, ami alapján egy citotoxikus hatás lenne feltételezhető. A BLYR tesztsszervezettel viszont nem volt kimutatható ilyen hatás. Ebben az esetben a mikroszervezet anyagcseretermékei olyan sötét színű mintát eredményeztek, amelyben nem volt detektálható a lumineszcencia változás, így egy fizikai hatásról, tulajdonképpen árnyékolásról beszélhetünk, és a tapasztalt különbség nem biológiai folyamatok eredménye.

II. Jó bontási potenciállal rendelkező törzsek

A *R. pyridinivorans* K408 esetében számottevő bontás látható a 11. ábrán. Az első három nap



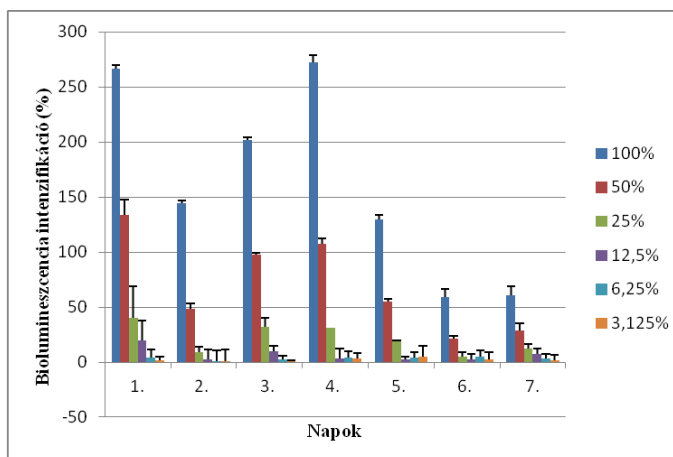
10. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Pseudoxanthomonas kalamensis* H4 ZEA metabolizációja során



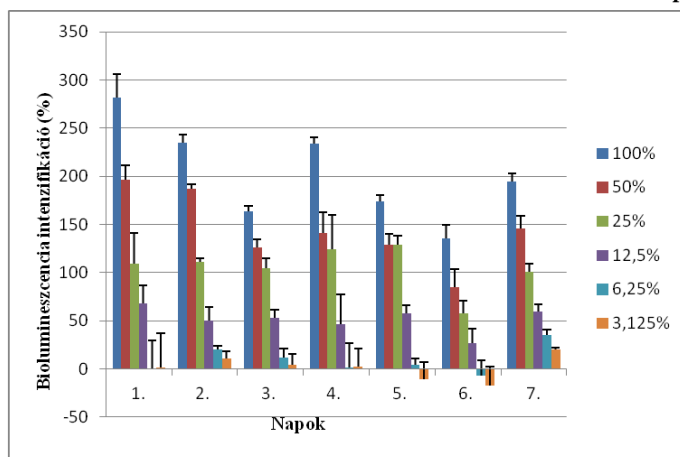
11. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Rhodococcus pyridinivorans* K408 ZEA metabolizációja során

folyamán a minták hormonhatása csökkent, majd a 4. napon 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. pyridinivorans* K402 és a *R. pyridinivorans* K404.

A *P. pseudocaligenes* FEH28, *R. erythropolis* NI1 és a *R. pyridinivorans* AK37 törzsek esetében is jól látszik a 12., a 13., és a 14. ábrán, hogy a kezdeti értékekhez képest történt bizonyos mértékű toxinbontás, ám nem szüntették meg a teljes hormonhatást. A

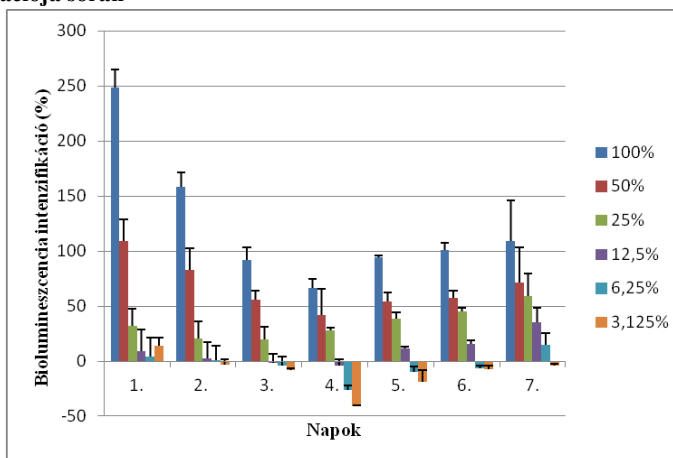


12. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás a *Pseudomonas pseudocaligenes* FEH28 ZEA metabolizációja során



13. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás az *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 ZEA metabolizációja során

Ezzel szemben érdekes megfigyelni, hogy az NI1 által végzett bontás során ilyen kiugró értékről nem beszélhetünk, ugyanis esetében folyamatos hormonhatás csökkenést, majd a vége felé pedig stagnálást figyelhetünk meg.

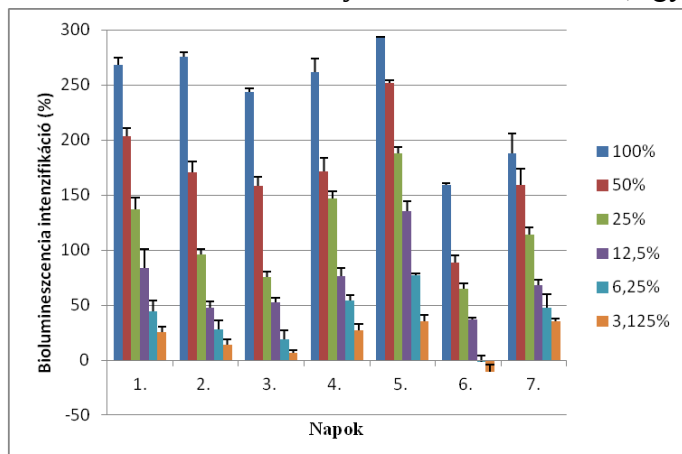


14. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás az *Rhodococcus erythropolis* NI1 ZEA metabolizációja során

III. Elégtelen bontási potenciállal rendelkező törzsek

Az analitikai eredményekkel egyetemben a BLYES teszt alapján is három törzs a *R. ruber* N361, *R. aetherivorans* AK44 és a *R. gluberulus* N58 bizonyult a legkevésbé alkalmasnak a ZEA bontására.

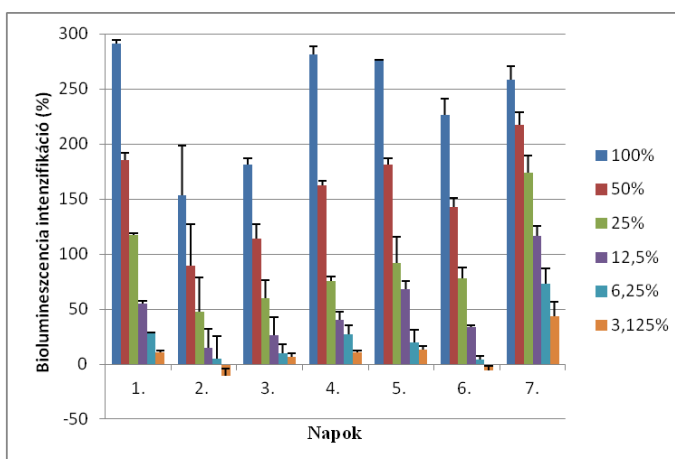
A *R. ruber* N361 valamelyest bontotta a ZEA-t, így csökkent a minta hormonhatása, viszont



15. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás az *Rhodococcus ruber* N361 ZEA metabolizációja során

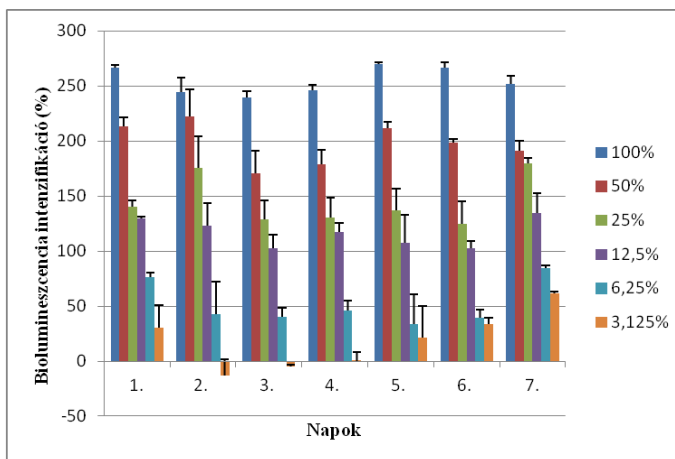
az általa végzett bontás kismértékű volt, mely jól látható a 15. ábrán. A fenti példák többségéhez híven ebben az esetben is volt hormonhatás növekedés az 5. napon, mely ráadásul a kezdeti értékhez képest is magasabb volt. A hormonhatás csökkenése végül a 6. napon következett be.

A *R. gluberulus* N58 jelzésű törzset mutató 16. ábrán jelentős hormonhatás ingadozást figyelhetünk meg. Már a 2. naptól kezdve bekövetkezett egy hormonhatás csökkenés, viszont a 4. napon mért biolumineszcencia intenzifikáció elérte az 1. napon mért értéket. Ezt a megemelkedett hormonhatást a törzs már nem tudta megszüntetni a bontási kísérlet végére, így hatékonysága elégtelennek bizonyult.



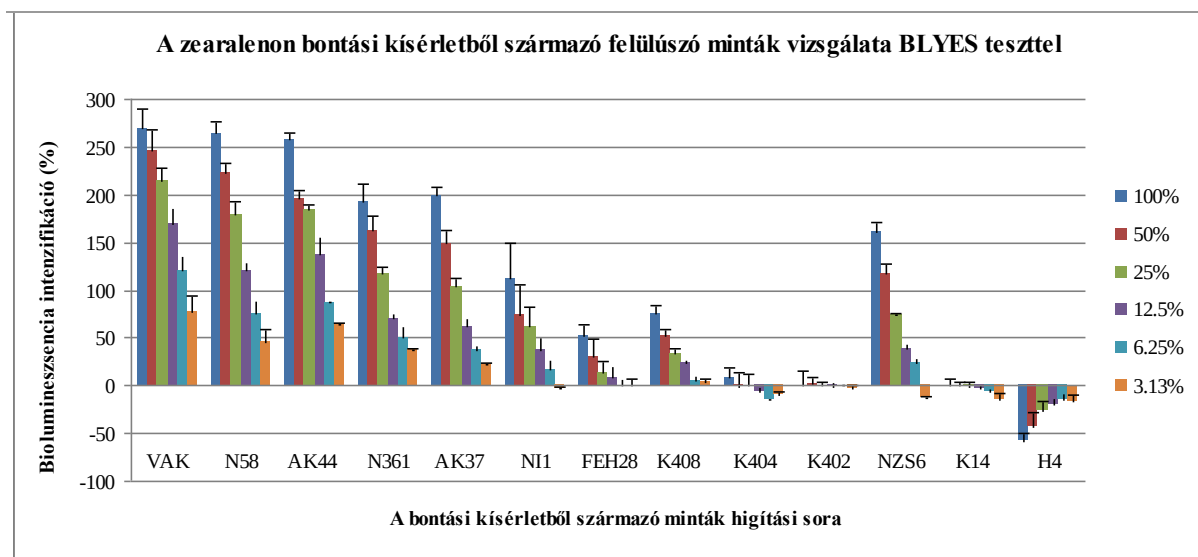
16. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás az *Rhodococcus gluberulus* N58 ZEA metabolizációja során

A *R. aetherivorans* AK44 törzset mutató 17. ábrán megfigyelhetjük, hogy a bontás összes napján a minták stagnáló hormonhatást mutattak, és a kontrollként szolgáló VAK-hoz viszonyítva nem különböztek jelentősen.



17. ábra: A BLYES teszt során mért hormonhatás-változás az *Rhodococcus aetherivorans* AK44 ZEA metabolizációja során

A hormonhatást tekintve tehát érdekes eredményeket kaptam a ZEA bontás során, amelynek a végpontban mért értékeit a 18. ábra foglalja össze. A grafikon a BLYES teszt-szervezettel tapasztalt lumineszcencia intenzitási értékeket mutatja a bontási kísérlet 7. napján, ahol a három párhuzamos minták közötti szórást Y hibaszávokkal jelöltem. Minél nagyobb lumineszcencia intenzitást mutat adott bontótörzs esetében kapott felülűszó minta, annál inkább kifejezett a minta hormonhatása.



18. ábra: A zearalenon bontási kísérletből származó felülűszó minták ösztrogénhatásának elemzése BLYES tesztel

Vizsgálataim alapján elmondható, hogy a hormonhatás-eredmények, kémiai analitika valamint ELISA eredmények korrelálnak egymással. A statisztikai értékelésnél a Spearman-féle rangkorrelációs együttható minden -0,8 és -0,97 között volt, tehát igen szoros fordított arányú összefüggés tapasztalható BLYES teszt valamint az analitikai tesztek között. Mindezek alapján a mikroszervezeteknél a kisebb degradációs képesség a teszt-szervezetnél magasabb lumineszcencia értékkel jár, tehát kifejezettebb hormonhatás tapasztalható.

A bontótörzsek részletes értékelése alapján megállapíthatjuk, hogy az elégtelen bontási képességgel rendelkező törzsek (N58, AK44) bontási folyamatából származó felülűszó minták hormonhatása közelít a bontási kísérletből származó mikrobamentes kontroll (vak) hormonhatásához.

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

A kiváló bontási képességgel rendelkező törzsek hormonhatása nem kimutatható, egy kivételtől eltekintve, melyet már fentebb említettem. Az NZS6 jelzésű törzs a kémiai analitika alapján kiemelkedő 98,2%-os bontási potenciállal jellemezhető. Ennek ellenére az ELISA

eredmények csupán 78,89% ZEA csökkenést jeleztek (aminek magyarázatára már korábban kitértem), illetve a hormonhatás esetében is inkább a jó bontási potenciállal rendelkező bontótörzsekhez sorolható, mint a kiváló bontóképességgel rendelkezőkhöz. Azt, hogy a 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. Az 4. függelékben található ábrán egyértelműen látszik egy kiugró érték, ami az NZS6 jelzésű mintának felel meg. Mindezek alapján és a tapasztalt hormonhatás tekintetében, 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.

Érdekes megemlíteni a *Pseudoxanthomonas kalamensis* H4 jelzésű törzset, amely a HPLC és ELISA eredmények alapján is kiváló, több mint 87%-os bontási képességgel jellemezhető. Ezen minta esetében a hormonhatás-vizsgálat viszont nem adott értékelhető eredményt a korábban említett tapasztalt színreakció miatt a törzs metabolizmusa során (lásd 4.3.2.1. fejezet). Ilyen esetben nem jelenthető ki teljes bizonyossággal a hormonhatás hiánya, így más hormonhatás vizsgálatra alkalmas tesztek alkalmazása javasolt.

6. Eredmények és értékelésük

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

Ezt a biológiai hatáselemző rendszert adaptáltam toxinbontási kísérletekhez. A szakirodalomban számos zearalenon biodegradációjára alkalmas mikroorganizmust jegyeztek le, ám kevés esetben bizonyított a hormonhatás megszűnése is. Gombák esetében már létezik a Biomin által kifejlesztett biodetoxifikáló rendszer, amely gyakorlati alkalmazásban is hatásosnak bizonyult a ZEA biológiai hatástalanítása céljából.

Munkám során célom volt egy olyan bakteriális biodegradáción alapuló toxinmentesítési eljárás kezdeti lépéseinek kifejlesztése, amely a hormonhatás megszűnésével jár. Ennek érdekében egy olyan screening eljárást fejlesztettem ki, amellyel akár több száz egyedből álló törzsgyűjtemények biodegradációs eljárásokban történő vizsgálata valósítható meg.

Vizsgálataim során olyan komplex vizsgálati rendszerrel dolgoztam, amely 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. 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 és teljesen megszüntette a hormonhatást. 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 káros biológiai hatásának megszüntetésére.

Kísérleteim igazolták azt a tényt, hogy az analitikai eredmények önmagukban félrevezetőek lehetnek, 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 csupán 76%-os toxindegradációt 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 az ELISA teszt mellett e törzs tekintetében tapasztaltam jelentős maradék hormonhatást is, amely a káros köztitermékek jelenlétét igazolja.

Hormonhatású metabolitok termeléséről nemcsak az NZS6 esetében beszélhetünk. A bontási kísérletben résztvevő törzsek közül is néhány esetben megfigyelhető hormonhatás emelkedés a bontás során (K402, K404, K408, FEH28, AK37). Ám az NZS6-tal szemben ezek a törzsek 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 a két törzset, amelyek vizsgálata során ilyen jellegű hirtelen megnövekedett hormonhatást nem figyelhetünk meg, így a kockázatértékelési szempontból a legalkalmasabbnak mondhatók detoxifikációs célra. Ezek a kiválóan bontó K14 és a jól bontó NI1 jelzésű törzsek voltak.

Összefoglalva tehát vizsgálataim rámutattak, hogy kiváló toxinbontás mellett is tapasztalható maradék hormonhatás. Ráadásul az ilyen jellegű folyamatos screeningek mutatnak rá egyedül a bontási folyamat alatt váratlanul fellépő kockázatokra. Ezek természetes környezetben veszélyt jelentenek, melyekkel minden esetben számolnunk kell.

Mindezen megfigyelések hangsúlyozzák az ilyen és ehhez hasonló toxikológiai/ökotoxikológiai tesztek fontosságát a biodegradációs eljárások értékelése során.

Az alkalmazott biológiai hatáselemző rendszer a biodegradációs célra alkalmazható törzsgyűjtemények vizsgálata mellett, akár alkalmazható genetikai módszerekkel javított mikroszervezetek screening vizsgálata céljából. A módszerrel egyszerűen vizsgálható egy UV mutagenézissel kialakított könyvtár, és kiválaszthatóak a megnövekedett bontási képességgel rendelkező egyedek. Mindemellett a módszer a metabolizmus kutatás területén is eredményes eszköznek bizonyulhat, hiszen egy transzpozon mutagenézis könyvtár kialakítása után kiválaszthatóak a nullmutánsok, amelyek segítségével és további vizsgálatokkal beazonosíthatók a ZEA bontásért felelős génszakaszok.

7. Összefoglalás

A zearalenon a *Fusarium* nemzetség fajai által termelt másodlagos anyagcseretermék, amely erős ösztrogénhatásának köszönhetően szaporodásbiológiai és ivarzási problémákat okoz. A mikotoxinok detoxifikálásának egyik perspektivikus ágát képezik a biotranszformációs módszerek, amelyek során mikroszervezetek vagy enzimek segítségével történik a toxin lebontása. A biotranszformációs módszerek biológiai hatáselemzése növekvő jelentőséggel bír, amióta az Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság (EFSA) 2010-es közleményében felhívta a figyelmet arra, hogy a takarmányok mikotoxin-szennyezettségének csökkentésére irányuló eljárások során nemcsak a mikotoxinok, hanem az eljárás során esetlegesen keletkező metabolitok, bomlási termékek biológiai hatását is vizsgálni kell.

A ZEA biodegradációján alapuló vizsgálataim célja olyan mikroorganizmusok kiválasztása volt, amelyek nagy hatásfokkal képesek a ZEA bontására káros biológiai hatást mutató termékek nélkül. Munkám során egy biolumineszcencián alapuló bioripporter rendszert adaptáltam ZEA bontási kísérletekhez. A biológiai hatás vizsgálatára a *Saccharomyces cerevisiae* BLYES törzset alkalmaztam, amely megváltoztatott génszerkezetéből adódóan biolumineszcencia intenzitást mutat hormonhatású anyag észlelése esetén. Ezt kiegészítve a citotoxicitás mérésére konstitutív kontrollként használtam fel ugyanezen módosított élesztőfaj BLYR törzsét, amely toxicitást tapasztalva fénykibocsátás gátlást mutat. A biodegradáció teljes folyamata alatt biológiai hatáselemzéssel követtem nyomon a mintákban bekövetkező hormon- és citotoxikus hatás változását, illetve a biodegradációs eljárás végén eredményeimet kémiai analitikai (HPLC) és immunanalitikai (ELISA) tesztekkel is igazoltam.

Az alkalmazott komplex értékelési rendszerrel sikerült kiválasztanom a legmegfelelőbb mikroszervezeteket, amelyek maradék ösztrogén és citotoxikus hatás nélkül képesek a ZEA bontására. A legígéretesebb törzsek a *Rhodococcus* és a *Streptomyces* nemzetséghez tartoztak. Mindezek mellett vizsgálataim rávilágítottak, hogy nagyarányú toxinbontás mellett is tapasztalható maradék hormonhatás, amely hangsúlyozza az ilyen és ehhez hasonló biotesztek fontosságát a biodegradációs eljárások során. A kialakított komplex vizsgálati rendszerrel akár több száz mikrobából álló törzsgyűjtemény esetén kiválaszthatóak a legkiemelkedőbb bontási potenciált mutató biztonságos törzsek. Ezen felül a módszer új lehetőséget nyit a metabolizmus kutatás területén, hiszen egy kialakított mutagenézis könyvtár screenelése könnyedén kivitelezhető a biodegradációs eljáráshoz adaptált élesztő alapú rendszerrel.

8. Irodalom

- BENNETT, J. W., KLICH, M. (2003): Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16:497-516. p.
- BETINA, V. (1989): Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, 437 p.
- BÍRÓ S. (2001): Prokarióták. In: Pesti M. (szerk.) (2001): Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 308 p., 67-116. p.
- BURKHARDT-HOLM, P. (2010): Endocrine disruptors and water quality: A state-of-the-art Review, *Water Resources Development*, 26(3): 477- 493. p.
- BÚZA L., M. SCHILL J. (2010): A mikotoxinok vizsgálati módszerei, eredményei, előfordulásuk a hazai takarmányokban. In: Kovács M. (szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Agroinform Kiadó, Budapest, 156 p., 13-19. p.
- BYRNE, C., DIVEKAR, S. D., STORCHAN, G. B., PARODI, D. A., MARTIN, M. B. (2009): Cadmium – a metallohormone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3):266-271. p.
- CALOW, P. (eds.) (1993): *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Science Ltd., 487 p.
- CHRISTENSEN, C. M. – KAUFMANN, H. H. (1969): Grain storage. The role of fungi in quality loss. Univ. Minnesota Press, Minneapolis, USA 159 p.
- CSEH S., KOVÁCS M. (2010): Mikotoxinok reprodukcióra kifejtett hatásai. In: Kovács M. (szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Agroinform Kiadó, Budapest, 156 p., 73-83. p.
- DEÁK T. (szerk.) (2006): Élelmiszer-mikrobiológia. Mezőgazda kiadó, Budapest, 382 p.
- DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J-P., GIUDICE, L. C., HAUSER R., PRINS, G. S., SOTO, A. M., ZOELLER, R. T., GORE, A. C. (2009): Endocrine-Disrupting Chemicals, An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30(4):293-342. p.
- EFSA: 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, 1-192. p.
- EL-SHARKAWY, S. H. (1989): Microbial transformation of zearalenone, III. Formation of zearalenone-2-4-O- β -diglucoside. *Acta Pharm. Jugosl.* 39:303-310. 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.
- 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.

- 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.
- GUILLETTE, L. J., JR., CRAIN, D. A., ROONEY, A. A., PICKFORD, D. B. (1995): Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 103(7):157-164. p.
- GUPTA, R. K., PATTERSON, S. S., RIPP, S., SIMPSON, M. L., SAYLER, G. S. (2003): Expression of the *Photobacterium luminescens* lux genes (luxA, B, C, D, and E) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 4: 305-313 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 pp.
- KAVLOCK, R. J., DASTON, G. P., DEROSA, C., FENNER-CRISP, P., GRAY, L. E., KAATTARI, S., LUCIER, G., LUSTER, M., MAC, M. J., MACZKA, C., MILLER, R., MOORE, J., ROLLAND, R., SCOTT, G., SHEEHAN, D. M., SINKS, T., TILSON, H. A. (1996): Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U. S. EPA-sponsored Workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104(4):715-740. p.
- KIM, J. M., LE, N. T., CHUNG, B. S., PARK, J. H., B, J-W., MADSEN, E. L., JEON, C. O. (2008): Influence of Soil Components on the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-Xylenes by the Newly Isolated Bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23):7313-7320. p.
- KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S., BARBER, L. B., BUXTON, H. T. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36(6):1202-1211. p.
- KOVÁCS F. (szerk.) (1980): *Állathigiénia*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 603 p.
- KOVÁCS M. (2010): A mikotoxinok humán-egészségügyi vonatkozásai. In: Kovács M. (szerk.) (2010): *Aktualitások a mikotoxin kutatásban*, Agroinform Kiadó, Budapest, 156 p., 85-102. p.
- KRISTÓF J. (szerk.) (2000): *Kémiai analízis II. (Nagyműszeres analízis)*. Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém, 192 p.
- LARKIN, M. J., KULAKOV, L. A., ALLEN, C. CR. (2005): Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3):282-290. p.
- LARKIN, M. J., KULAKOV, L. A., ALLEN, C. CR. (2006): Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology and genetic adaptation. *Adv Appl Microbiol*, 59:1-29. p.
- LÁNG I. (2002): *Környezetvédelmi lexikon I.-II.*, Akadémiai kiadó, Budapest, 664 p., 588 p.
- LIOI, M. B., SANTORO, A., BARBIERI, R., SALZANO, S., URSINI, M. V. (2004): Ochratoxin and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell deaths induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research*. 557:19-27. 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.
- MARÁZ A. (2001): Eukarióta mikroorganizmusok. In: Pesti M. (szerk.) (2001): Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 308 p., 117-163. p.
- MARKEY, C. M., RUBIN, B. S., SOTO, A. M., SONNENSCHN, C. (2003): Endocrine Disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83(1–5):235-244. p.
- MARTÍNKOVÁ, L., UHNÁKOVÁ, B., PÁTEK, M., NESVERA, J., KREN, V. (2008): Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35:162-177. p.
- MÁTRAI T., RAFAI P., SZIGETI G: A takarmányok penészgombás fertőzöttségének állat-egészségügyi jelentősége. In: Rafai P. (szerk.) (2003): Állathigiénia. Agroiinform Kiadó, Budapest, 343 p., 208-229. p.
- MEIGHEN, E. A. (1993): Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J.* 7:1016-1022. p.
- MÉZES M. (szerk.) (2009): Takarmánytoxikológia, Egyetemi Jegyzet, Gödöllő, 99 p.
- MÉZES M., BALOGH K. (2010): Mikotoxinok hatása a szervezet lipidperoxidációs folyamataira és antioxidáns rendszerére. In: Kovács M. (szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Agroiinform Kiadó, Budapest, 156 p., 59-71. p.
- MOLNAR O., SCHATZMAYR, G., FUCHS, E., PRILLINGER, H. (2004): *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. Nov., A New Yeast Species Useful in Biological Detoxification of Various Mycotoxins. *System. Appl. Microbiol.*, 27:661-671. p.
- OLSEN, R. H., ARBOR, A. (1985): *Pseudomonas* degradation of hydrocarbons. United States Patent, 4508824, 1-6. p.
- ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P. (1995): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (1996) 15(3): 241-248 p.
- RUZSAS C., BIRO-GOSZTONYI M., WOLLER 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*, 30:335-345. p.
- SANSEVERINO, J., ELDRIDGE, M. L., LAYTON, A. C., EASTER, J. P., YARBROUGH, J., SCHULTZ, T. W., SAYLER, G. S. (2008): Screening of potentially Hormonally Active Chemicals using Bioluminescent Yeast Bioreporters. *Toxicological Sciences*, Oxford University Press, 1-56 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.

- SZEITZNÉ SZABÓ M. (2010): A mikotoxinok ellenőrzésére vonatkozó jogi háttér, az EU élelmiszerekre és takarmányokra vonatkozó gyors veszélyjelző (RASFF) rendszerébe érkező bejelentések értékelése. In: Kovács M. (szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Agroinform Kiadó, Budapest, 156 p., 103-118. p.
- SZOBOSZLAY S., KRISZT B. (szerk.) (2010): Környezeti elemek védelme, Egyetemi Jegyzet, Gödöllő, 130 p.
- TA-CHEN, L., CHANG, J-S., YOUNG, C-C. (2007): Exopolisaccharydes produced by *Gordonia alkanivorans* enhance bacterial degradation activity for diesel. *Biotechnol Lett*, 30:1201-1206. 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.
- THIERRY, S., MACARIE, H., IIZUKA, T., GEIBDÖRFER, W., ASSIH, E. A., SPANEVELLO, M., VERHE, F., THOMAS, P., FUDOU, R., MONROY, O., LABAT, M., OUATTARA, A. S. (2004): *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6):2245-2255. p.
- 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*, 10.11258/AEM.01438-9, 1-23. p.
- WANG, G., ZHANG, J., WANG, L., LIANG, B., CHEN, K., LI, S., JIANG, J. (2010): Co-Metabolism of DDT by the Newly Isolated Bacterium, *Pseudoxanthomonas* sp. Wax. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:431-438. p.
- YOUNG, W. F., WHITEHOUSE, P., JOHNSON, I., SOROKIN, N. (2004): Proposed Predicted-No-Effect-Concentration (Pnecs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters. R&D Technical Report P2-T04/1
- ZINEDINE, A., SORIANO, J. M., MOLTÓ, 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.inventor.hu/ceco/kock/konyv/kbzt.pdf>,
Damjanovich I.: Környezetbiztonság, letöltés ideje: 2011.07.29.
- http2. <http://www.impextraco.com/upload/Art%20Feedmix%20Elitox%20april%202003.pdf>, Eijk, C. van der
(2003): New technologies improve mycotoxin elimination, *Feed mix*, 11(1): 8-10. p., letöltés ideje:
2011.07.29.
- http3: <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.

- http4: 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.
- http5: <http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/kiadvanyok/karmkezikk2/2-14.htm> Kármentesítési kézikönyv 2., letöltés ideje: 2011.07.20.
- http6: <http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/kiadvanyok/karmkezikk3/3-09.htm>, Gruiz K., Dura Gy.: Ökotoxikológiai vizsgálatok és a környezeti kockázat felmérése, Kármentesítési kézikönyv 3., letöltés ideje: 2011.07.19.
- http7: <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.

9. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom konzulensemnek, *Krifaton Csillának*, aki értékes tanácsaival, végtelen türelmével és meg nem szűnő, gondos figyelmével követte végig és segítette munkámat.

Továbbá szeretném megköszönni *Cserhádi Mátyásnak*, hogy segítséget nyújtott a Wessling Hungary Kft-vel, és a Soft Flow Hungary Kft-vel való kapcsolattartásban.

Köszönettel tartozom *Dr. Szoboszlai Sándor* tanár úrnak, hogy értékes javaslataival emelte dolgozatom színvonalát, valamint a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék vezetőjének, *Dr. Kriszt Balázs* tanár úrnak, hogy lehetőséget nyújtott a tanszéki munkára.

Végül, de nem utolsó sorban köszönet illeti a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék és a Regionális Egyetemi Tudásközpont további munkatársait, közöttük *Dr. Kukolya Józsefet*, *Baka Erzsébetet* és *Dr. Táncsics Andrást*, akik mind gyakorlati, mind elméleti tanácsokkal láttak el laborban végzett munkám során.

Ezt a munkát az Baross Gábor Program-2009. (REG_KM_KFI_09) és a NKTH TECH_08-A3/2-2008-0385 (OM-00234/2008) MYCOSTOP támogatta. Köszönetemet fejezem ki J. Sanseverinonak és G. Saylernek a BLYES és BLYR tesztszervezetekért (The University of Tennessee, Knoxville, Tennessee).

10. Függelék

10.1. 1. függelék: Alkalmazott tápoldatok

YMM (leu-, ura-): leucén- és uracil szelektív alapmédium

•	KH ₂ PO ₄	13,61 g
•	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
•	KOH (lemez)	4,2 g
•	MgSO ₄	0,2 g
•	Fe ₂ SO ₄ oldat (40 mg/50 ml víz)	1 ml
•	L-hisztidin	50 mg
•	Adenin	50 mg
•	L-arginin-HCl	20 mg
•	L-metionin	20 mg
•	L-tirozin	30 mg
•	L-izoleucin	30 mg
•	L-lizin-HCl	30 mg
•	L-fenilalanin	25 mg
•	L-glutánsav	100 mg
•	L-valin	150 mg
•	L-szerin	375 mg

1 liter desztillált vízben oldottuk a fenti anyagokat, majd autoklávban sterilizáltuk.
Tárolása szobahőmérsékleten történt.

Growth Medium

1 literhez szükséges mennyiség:

•	YMM alaplátmédium	854,5 ml
•	Vitamin oldat	10 ml
•	Glükóz oldat	100 ml
•	L-aszparaginsav oldat	25 ml
•	L-treonin oldat	8 ml
•	Réz-szulfát oldat	2,5 ml

Összetevők:

1. Vitamin oldat:

•	Tiamin	20 mg
•	Piridoxin	20 mg
•	Pantoténsav	20 mg
•	Inozitol	100 mg
•	Biotin oldat (2 mg/100 ml)	50 ml

500 ml desztillált vízben oldottuk fel, majd 0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn átszűrve sterilizáltuk. 4°C-on tároltuk.

2. D-glükóz oldat:

20%-os glükóz oldatot készítettünk, majd autoklávban 10 percig sterilizáltuk. Szobahőmérsékleten tároltuk.

3. L-aszparaginsav oldat:

4 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk desztillált vízben oldva. Sterilizálás után szobahőmérsékleten tároltuk.

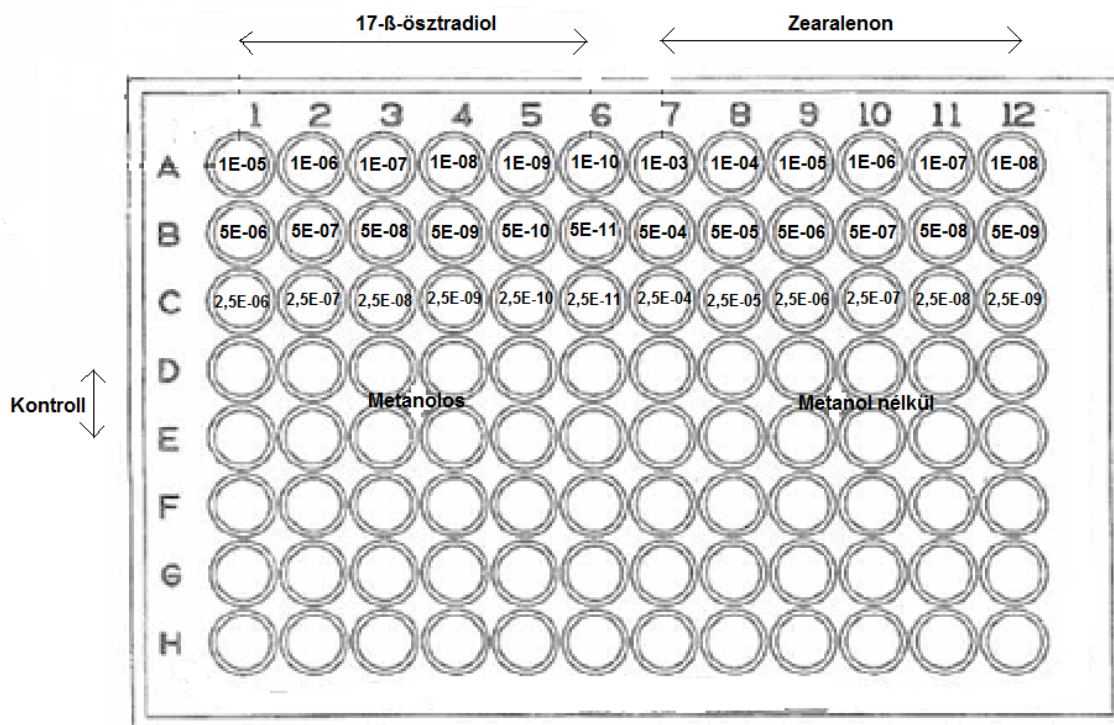
4. L-treonin oldat:

Desztillált vízben oldva mg/ml-es oldatot állítottunk össze. Sterilizálás után, szintén szobahőmérsékleten tároltuk.

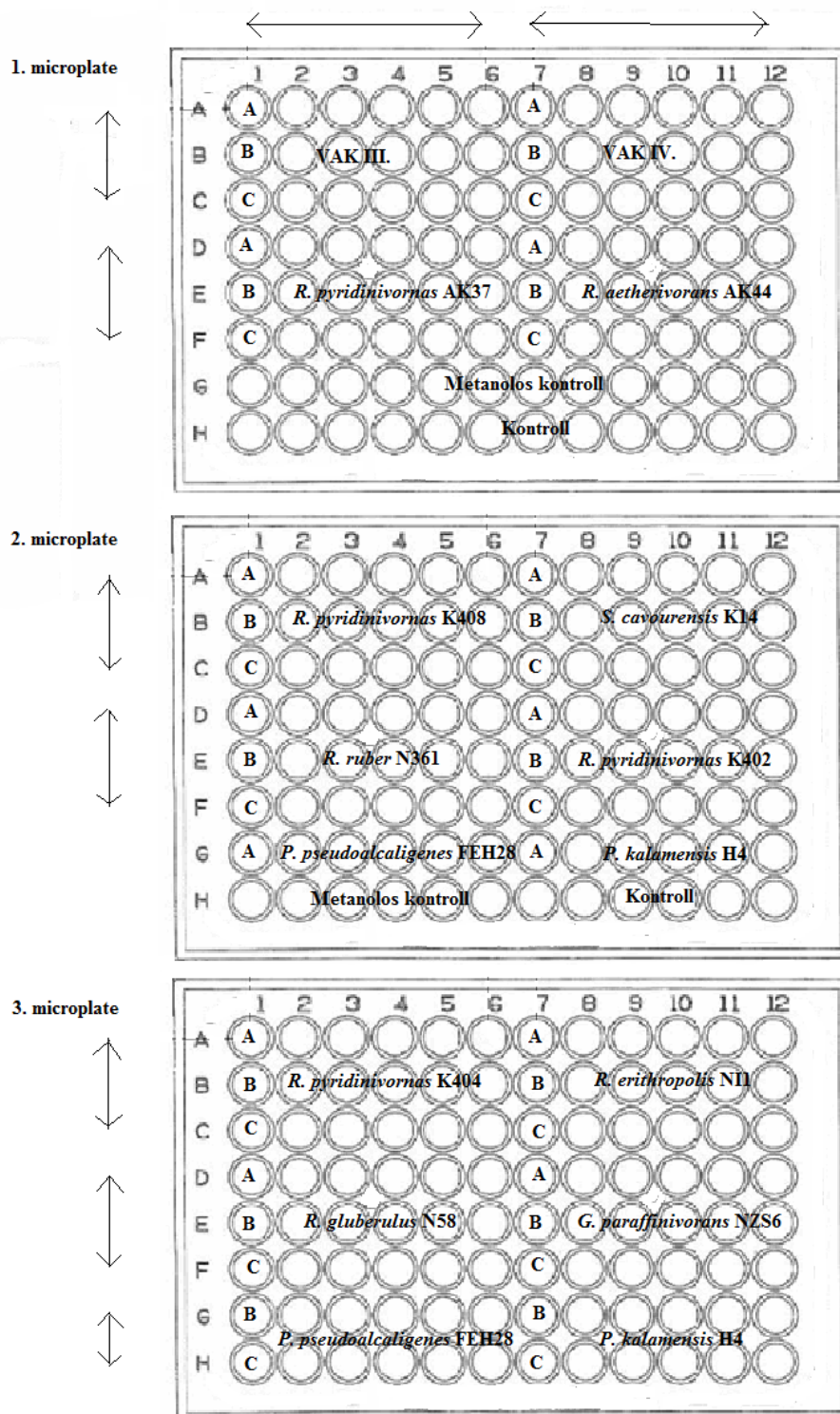
5. Réz-szulfát oldat:

20 mM-os oldatot készítettünk desztillált vízben oldva. 0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn átszűrtek, és szobahőmérsékleten tároltuk.

10.2. 2. függelék: A microplate lemez felépítése a hígítási sorokkal a standardizálás során



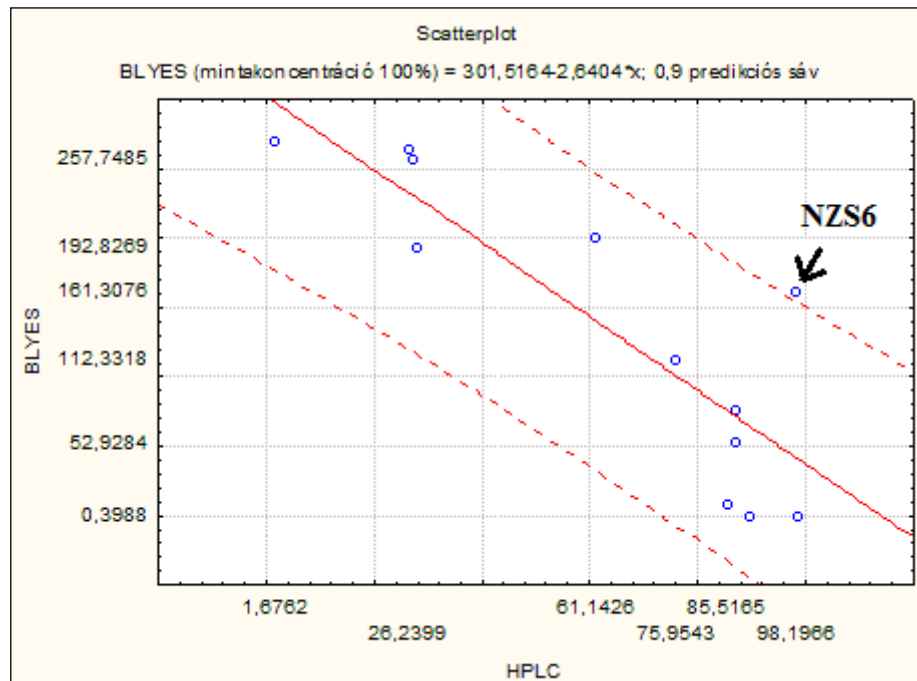
10.3. 3. függelék: A microplate lemezek felépítése a minták vizsgálata során



10.4. 4. függelék: A bontási kísérletből származó minták HPLC és BLYES teszt eredményeinek statisztikai összefüggése és a kiugró értékek

10.5.

10.6.



5. függelék: A kémiai analitika eredményei



WESSLING Hungary Kft.
H-1047 Budapest, Fóti út 56.
H-1325 Budapest, Újpest Pf. 211
Tel. +36 (1) 272 2100 · Fax: +36 (1) 435-0100
info@wessling.hu · www.wessling.hu

F2 (Zearalenon)

Minta jellege: Egyéb folyadék minta

AOAC 985.18.:1988 (1)

Minta jele	Zearalenon (F2 toxin) ¹ µg/l
N361 A II.	480
N361 B II.	427
N361 C II.	452
K402 A II.	26
K402 B II.	77
K402 C II.	88
K404 A II.	95
K404 B II.	90
K404 C II.	87
VAK A II.	626
VAK C II.	294

2011. június 10.

Dési Eszter
Laboratóriumvezető

F2 (Zearalenon)

Minta jellege: Egyéb folyadék minta

AOAC 985.18.:1988 (1)

Minta jele	Zearalenon (F2 toxin) ¹ µg/l
1. VAK A 7 III.	551
2. VAK B 7 III.	558
3. VAK C 7 III.	570
4. H4 A 7 III.	<10
5. H4 B 7 III.	<10
6. H4 C 7 III.	<10
7. FEH 28 A 7 III.	67
8. FEH 28 B 7 III.	77
9. FEH 28 C 7 III.	73
10. NZS 6 A 7 III.	<10
11. NZS 6 B 7 III.	<10
12. NZS 6 C 7 III.	<10
13. N 58 A 7 III.	248
14. N 58 B 7 III.	462
15. N 58 C 7 III.	517
16. NI 1 A 7 III.	131
17. NI 1 B 7 III.	128
18. NI 1 C 7 III.	141
19. VAK A 7 IV.	582
20. VAK B 7 IV.	603

Minta jele	Zearalenon (F2 toxin) ¹ µg/l
21. VAK C 7 IV.	758
22. AK 44 A 7 IV.	458
23. AK 44 B 7 IV.	466
24. AK 44 C 7 IV.	492
25. AK 37 A 7 IV.	251
26. AK 37 B 7 IV.	274
27. AK 37 C 7 IV.	230
28. K 14 A 7 IV.	<10
29. K 14 B 7 IV.	<10
30. K 14 C 7 IV.	<10
31. K 408 A 7 IV.	102
32. K 408 B 7 IV.	58
33. K 408 C 7 IV.	88

2011. július 21.


Dési Eszter
Laboratóriumvezető 

10.7. 6. függelék: Az ELISA teszt eredményei

Soft Flow Biotechnology Ltd. _ H-2100, Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4., Hungary
tel.: +36 28 526-160 _ fax.: +36 28 526-191 _ e-mail: biotechnology@softflow.com



Melléklet

Zearalenon (F2) kvantitatív meghatározása bakteriális felolúsó mintákból ELISA tesztel
Soft Fow Biotechnology Kft.

Minta jele	koncentráció
	[µg/kg]
VAK A II. 7	1022
VAK B II. 7	1166
VAK C II. 7	989,0
K404 A II. 7	70,34
K404 B II. 7	79,25
K404 C II. 7	72,74
K402 A II. 7	71,64
K402 B II. 7	65,38
K402 C II. 7	84,71
N361 A II. 7	528,0
N361 B II. 7	471,0
N361 C II. 7	443,2
LB	0



Melléklet

**Zearalenon (F2) kvantitatív meghatározása bakteriális feltalúszó mintákból ELISA teszttel
Soft Fow Biotechnology Kft.**

Minta jele	koncentráció
	[µg/kg]
NI1 A 7 III.	232,0
NI1 B 7 III.	243,7
NI1 C 7 III.	284,1
N58 A 7 III.	504,9
N58 B 7 III.	765,5
N58 C 7 III.	822,4
NZS6 A 7 III.	193,0
NZS6 B 7 III.	128,8
NZS6 C 7 III.	229,9
FEH28 A 7 III.	144,2
FEH28 B 7 III.	164,8
FEH28 C 7 III.	143,4
H4 A 7 III.	<20
H4 B 7 III.	<20
H4 C 7 III.	<20
VAK A 7 III.	825,5
VAK B 7 III.	815,0
VAK C 7 III.	973,5



Melléklet

Zearalenon (F2) kvantitatív meghatározása bakteriális felúlszó mintákból ELISA teszttel
Soft Fow Biotechnology Kft.

Minta jele	koncentráció
	[µg/kg]
VAK A	840,3
VAK B	991,1
VAK C	961,7
AK44 A	532,0
AK44 B	488,8
AK44 C	582,4
AK37 A	307,7
AK37 B	331,1
AK37 C	347,9
K14 A	84,25
K14 B	66,93
K14 C	44,55
K408 A	149,4
K408 B	130,7
K408 C	128,0
LB	0

11. Nyilatkozat

NYILATKOZAT

Alulírott **Risa Anita** a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 20.....év.....hó.....nap

.....
hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a dolgozatot áttekintettem, a felhasznált irodalmat a hallgató korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezelte.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 20....évhó.....nap

.....
konzulens aláírása