

DEBRECENI EGYETEM

**MEZŐGAZDASÁG- ÉLELMISZERTUDOMÁNYI ÉS
KÖRNYEZETGAZDÁLKODÁSI KAR**

VÍZ- ÉS KÖRNYEZETGAZDÁLKODÁSI INTÉZET

Intézetvezető:
Prof. Dr. Tamás János

DON toxin csírázásra gyakorolt ökotoxikológiai hatása

Gálya Bernadett
Környezetgazdálkodási agrármérnök szakos hallgató

Konzulensek:

Dr. Nagy Attila
Egyetemi tanársegéd

Biró Györgyi
PhD hallgató

DEBRECEN
2011.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	2
2. Témafelvetés.....	3
3. Szakirodalmi áttekintés.....	4
3.1. A <i>Fusarium</i> nemzetség rendszerezése, fontosabb fajok.....	4
3.2. A <i>Fusarium</i> toxinok képződése, hatásuk és jellemzőik	5
3.3. Deoxinivalenol (DON, vomitoxin).....	6
3.4. A kukorica (<i>Zea mays</i>) fuzáriózisa.....	8
3.5. A fuzáriummal szennyezett kukorica biogáz alapanyagként történő felhasználása	10
3.6. Csíranövény teszt.....	11
4. Anyag és módszer.....	14
4.1. A kísérlet során felhasznált anyagok	14
4.1.1. A kísérlet során felhasznált fermentlé jellemzői	14
4.1.2. A kísérlet során felhasznált hidrolizált termék jellemzői	15
4.2. DON toxin meghatározás ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel	16
4.3. A tenyészedényes csíranövény teszt.....	16
4.4. <i>Fusarium graminearum</i> folyékony tenyészet készítése	18
4.4.1. A fuzáriummal befertőzött mag csírázási képességének vizsgálata.....	21
5. Eredmények és értékelésük	22
5.1. A fermentlé csírázásra gyakorolt hatásának meghatározása	22
5.2. A hidrolizált termék csírázásra gyakorolt hatásának vizsgálata.....	28
5.3. A DON toxin mérés eredményei	31
5.4. A sejtszámlálás eredménye.....	31
5.4.1. A fuzáriummal szennyezett illetve nem szennyezett szemtermés csírázási erejének mértéke	32
6. Következtetés, javaslat	35
7. Összefoglalás	36
IRODALOMJEGYZÉK	37
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	40
NYILATKOZAT.....	41

1. Bevezetés

A növény-kórokozó gombák világa hatalmas. Több mint 20000 olyan gombafajt tartanak számon, amelyek képesek magasabb rendű növényeken élősködni. Ide tartoznak a *Fusariumok*, amelyek korhadó szerves szubsztrátumokon más mikrobákkal együtt vagy ezekkel versengve hasznos tevékenységet folytatnak, azzal hogy elhalt növényi és állati maradványok lebontásában vesznek részt. A *Fusarium sp.* egyes fajai azonban hihetetlen mértékű károkat okozhatnak. A gomba jelenléte az élelmiszereket, ill. élelmiszer-nyersanyagokat hátrányosan befolyásolja. Egyrészt rontja a kalászos gabonafélék, a kukorica minőségét, emellett mennyiségi károkat is okozhat. Másrészt károsító hatásuk megmutatkozik az élelmiszer érzékszervi tulajdonságainak romlásában, tápértékének csökkenésében és az általuk termelt másodlagos anyagcseretermékek (ún. mikotoxinok) egészségkárosító hatásában. A mikotoxinokra az emberen kívül az állatok is érzékenyek. Megbetegednek, a toxin a placentán át a magzatba is átjut. Fejlődési rendellenességeket indukálnak, a magzat pusztulását is okozhatják.

A mikotoxinok közvetlen szennyezésként vagy közvetve juthatnak a táplálékláncba, a szennyezett takarmányt fogyasztó állatoktól származó élelmiszerek, elsősorban tej, tojás és a belsőségek révén. Jól elszaporodnak, többek között növényi eredetű élelmiszer-nyersanyagokon, élelmiszereken, így különös jelentőséggel bír a népesség fő táplálékául szolgáló termények (búza, kukorica, rizs, stb.) fertőzöttsége.

A *Fusarium* nemzetségbe tartozó gombafajok tehát a talajban, és az elhalt növényi maradványokon telelnek át, és konídiumok termelésével támadják meg a különböző növényi részeket. Hazai viszonyok között az egyik legjelentősebb szántóföldi kórokozó a *Fusarium graminearum*. Hazánkban a trichotecén típusú mikotoxinok fordulnak elő leggyakrabban, közülük a deoxinivalenol (DON) jelenlétét mutatták ki legtöbbször a gabonafélékben.

2. Témafelvetés

Az elmúlt években bekövetkező csapadékos időjárás miatt kedvező körülmények alakultak ki a gombák számára. Ez aktuális problémát jelent hazánkban, mivel a 2010-es év csapadékos időjárása rendkívüli módon kedvezett a *Fusarium* sp. fejlődésének. A fuzárium fertőzést és mikotoxin termelődést teljes mértékben sehol sem sikerült még kiküszöbölni, azonban ezek elemzésére speciális analitikai eljárásokat dolgoztak ki. Esetleges ártalmatlanítási módszer lehet a fuzáriummal szennyezett kukorica biogáz alapanyagként való hasznosítása, ebben az esetben azonban meg kell vizsgálni a fermentlé toxintartalmát és annak hatását a csírázásra. A *Fusarium* sp. a kukorica (*Zea mays*) vetőmag penészedését, valamint a csíranövény pusztulását okozhatja, ezért munkám során a kukorica szemtermésre gyakorolt csírázásgátló hatását vizsgáltam. Az Intézetben végzett előzetes vizsgálatok során a gomba 30 napos tartózkodási idő után nem volt kimutatható a bioreaktorban, azonban feltételezhető, hogy a hidrolízis alatt a gomba szaporodása és a mikotoxin termelés is exponenciálisan nő. A fermentált végtermékből nem állt rendelkezésünkre megfelelő eszköz a toxin mennyiségének vizsgálatára, ezért az anaerob hidrolízis modellezése szükségessé vált.

A fentiek alapján kutatásom főbb célkitűzései voltak, hogy megvizsgáljam:

- a fuzáriummal szennyezett (DON-t tartalmazó) és fuzárium mentes kukoricát tartalmazó fermentlé csírázásra gyakorolt hatását,
- fuzáriummal és mikotoxinnal terhelt hidrolizált termék csírázásra gyakorolt hatását,
- a fuzáriummal szennyezett, illetve nem szennyezett kukorica csírázási erejének mértékét.

3. Szakirodalmi áttekintés

3.1. A *Fusarium* nemzetség rendszerezése, fontosabb fajok

A *Fusarium* fajok a *Deuteromycetes*, vagyis a konídiumos gombák osztályába sorolhatók. A rendszerezés alapját az ivartalan úton, leggyakrabban hifavégeken vagy elkülönült, határozott alakú tartókon keletkező konídiumok képezik. A konídium alakja, színe, keletkezési módja nagyon változatos lehet. Általában rövid életűek, vékonyfalúak és mivel rendszerint igen nagy számban keletkeznek, elsősorban a faj gyors elterjedését szolgálják.

Négy rend tartozik ide a konídiumtartók alapján. A *Fusarium* nemzetség a *Moniliales* rendbe sorolható. A rendbe tartozó gombák konídiumai a gazdanövények felületén, szabadon álló egyszerű hifavégeken vagy határozott alakú tartókon keletkeznek. A gomba vegetatív és fruktifikációs része laza penészszerű, sztrómát nem alkot. Ezen belül a *Tuberculariaceae* családba sorolhatók a *Fusarium* sp. tagjai.

A *Fusarium* nemzetség tagjai többféle ivartalan szaporítóképletet hoznak létre. Ilyen a kifli, vagy sarlóalakú, jellegzetes talp- és csúcssejttel ellátott, harántfalakkal tagolt többsejtű makrokonídium és görbült kolbászka alakú, 1-2 sejtű mikrokonídium. Némely faj ezeken kívül még klamidospórákat is létrehoz. A *Fusarium* fajok növénykórtani jelentősége nagy, azonban a telepek nagyfokú alaktani és élettani változékonysága miatt az egyes fajok elkülönítése nehéz.

A nemzetség fontosabb fajai közé tartozik *Fusarium graminearum* Schwabe (*Giberella zeae* /Schw/Petch), amely növénykórtanilag az egyik legjelentősebb fonalas gomba. Számos fontos termesztett növényünk (búza, kukorica) kalász- és csőpenészedését okozza. BURGESS és munkatársai (1975) biológialag két különböző csoportot különítettek el a *F. graminearum* fajon belül. FRANCIS és BURGESS (1977) megállapítása szerint az első biológiai csoportba tartozó egyedek talajeredetűek, amelyek szártőpusztulást okoznak búzán és más gabona- és fűféléken. Ide tartozó *graminearumok heterothallicusak*, amelyek sem szabadföldi, sem pedig laboratóriumi körülmények között nem képeznek termőtestet. A második csoportba tartozó *graminearumok* terjedése és fertőzése légi úton történik, és kalászpenészedést okoz a búzánál, illetve szárkorhadást, csőpenészedést a kukoricánál. A csoport egyedei *homothallicusak* és sok termőtestet képeznek szabadföldi és laboratóriumi körülmények között is (SZÉCSI, 1994). Számos szakirodalom szerint a *F. graminearum* fordul elő leggyakrabban, amely a gabonafélék rózsaszínű penészedését, valamint a kukorica fuzáriumos tőszáradását és csőpenészedését okozza (MUDICH, 1988), ezért választottuk a kísérletünkhöz ezt a fajt.

3.2. A *Fusarium* toxinok képződése, hatásuk és jellemzőik

Fusarium fajok különösen veszélyes kórokozók, a toxikus anyagcseretermékeik miatt (EIFLER, 2011). A *Fusarium* gombafajok széles körben elterjedtek az egész világon. Nagy részük rendelkezik toxintermelő képességgel. Sokféle mikotoxint képesek szintetizálni tág hőmérsékleti intervallumban, így a hazai éghajlati viszonyok mellett is. A gombafertőzöttség a gabonafélék esetén jelentős gazdasági kárt, hozamkiesést és minőségromlást eredményez. A *Fusarium* a gabonaféléket már a földeken megtámadja (szántóföldi penész). A gomba növekedése és a toxin termelése betakarítás után is folytatódik. A gomba szaporodásának optimális hőmérséklete 22-26 °C, a toxinképződése 6-12 °C között van. Ezzel magyarázható, hogy a nedvesen betárolt kukoricán a toxintermelés az őszi, alacsonyabb hőmérséklet hatására indul meg (KOVÁCS és BÍRÓ, 2002).

Magyarországon főként a különböző *Fusarium* fajok által termelt ösztrogén hatású zearalenonnak, a trichotecénvázas mikotoxinoknak és a fumonizineknek van állategészségügyi szempontból meghatározó jelentősége. A *Fusarium* nemzetségbe tartozó penészgombák ún. trichotecénvázas mikotoxinjai közül hazánkban és a mérsékelt égövi országokban a DON toxin mellett a T-2 toxin fordul elő leggyakrabban a takarmányok alapanyagául szolgáló gabonamagvakban (PLACINTA et al., 1999). A kukorica fuzáriózist okozó fajok, és azok által termelt mikotoxinok láthatók az 1. táblázatban.

1. táblázat: A kukorica fuzáriózist okozó fontosabb *Fusarium* fajok és toxinjai

Mikotoxinok	<i>Fusarium</i> fajok
MON, BEA	<i>F. avenaceum</i>
DON, ZEN, NIV, FUS, ZOH, AcDON	<i>F. culmorum</i>
ZEN, ZOH, MAS, DAS, NIV, DAcNIV, FUS, FUC, BEA	<i>F. equiseti</i>
DON, ZEN, NIV, FUS, AcDON, DAcNIV	<i>F. graminearum</i>
DAS, NIV, FUS, MAS, T-2, HT-2, NEO, BEA	<i>F. poae</i>
T-2, HT-2, NEO, MAS, DAS	<i>F. sporotrichioides</i>
MON, BEA	<i>F. tricinctum</i>

(Forrás: MESTERHÁZY, 2010)

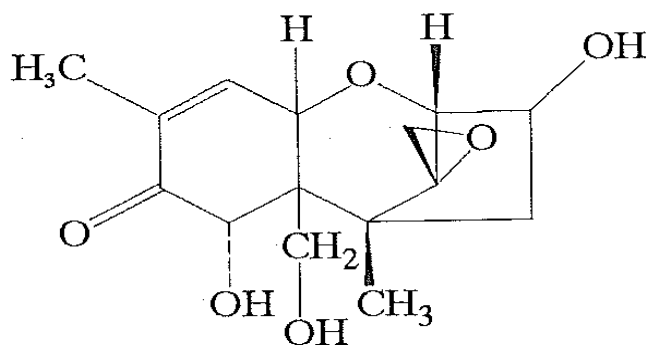
Rövidítések: AcDON=Mono-acetildeoxinivalenol (3-AcDON, 15-AcDON);
 BEA=Beauvericin; DiAcDON=Di-acetildeoxinivalenol (3,15-AcDON);
 DAcNIV=Diacetilnivalenol (4,15-AcNIV); DAS=Diacetoxiszcirpenol; DON=

Deoxinivalenol (Vomitoxin); FUS=Fuzarenon-X (4-Acetil-NIV); FUC=Fuzarochromanon; HT-2=HT-2 toxin; MAS=Monoacetoxiszcirpenol; MON=Moniliformin; NEO=Neosolaniol; NIV=Nivalenol; T-2=T-2 toxin; ZEN=Zearalenon; ZOH=zearalenolok (α és β izomerek).

3.3. Deoxinivalenol (DON, vomitoxin)

A vomitoxin, más néven a deoxinivalenol (DON) tetraciklikus, B-típusú trichotecén, epoxi terpenoid (1. ábra). A trichotecénekhez több mint 50 kémiai rokon, bonyolult szerkezetű metabolit tartozik. Ezek a toxinok képesek egymásba átalakulni és inaktiválódni is. Gyakori előfordulása, speciális biológiai hatása és jelentősége miatt érdemesebb részletesen foglalkozni vele. Élelmiszerszennyezőként csak egy részüket azonosították, ezek közül is a legfontosabbak a T-2 toxin, a deoxinivalenol (DON), a nivalenol és a fusarenon X. Elsősorban a népelelmezési, és állattenyésztési szempontból fontos termesztett növényeket, a kukoricát és a búzát szennyezi. Ezt a toxint a *F. culmorum*, de főként a *F. graminearum*-izolátumok termelik. A *F. graminearum* populációban két trichotecén-kemotípus található meg. Az egyik típus a DON/ADON – termelő izolátumokat, a másik kemotípus pedig NIV/4AVIN- termelő izolátumokat foglalja magába.

A deoxinivalenol első lépésben a fehérjeszintézist gátolja, felborítja a citokinin szabályozást, megváltoztatja a sejt proliferációt és sejtelhaláshoz vezet. Igen erős immunrendszer gátló hatása van (FAZEKAS et al., 2011).



1. ábra: A DON kémiai szerkezete

(Forrás: www.fermentek.co.il)

DON szennyezések elsősorban gabonafélékben (búza, kukorica, árpa, rozs, zab és rizs) gyakoriak, a DON csaknem minden cereáliatermékben kimutatható (egyedül vagy más trichotecénekkel). Deoxinivalenol (DON) toxinnal szennyezett élelmiszer-és takarmány, egészségügyi kockázatot jelent az emberre és az állatállományra egyaránt. Főleg a DON szennyezettség következménye a sertések takarmány-visszautasítása és hányása, valamint a baromfifélék tojástermelésének csökkenése. A szarvasmarha viszont kevésbé érzékeny a DON-nal szennyezett takarmányra. Az ember esetében a DON toxinnal szennyezett gabonafélék fogyasztása szédülést, gyomorgörcsöket, hányingert és hasmenést okoz. Közegészségügyi szempontból hazánkban a deoxinivalenol az egyik legveszélyesebb mikotoxin. Élelmiszerekben megengedett szintjeire csak néhány országban írtak elő eddig határértéket főleg gabona termékekre (2. táblázat).

2. táblázat: Az élelmiszerekben előforduló DON toxin felső határértékei

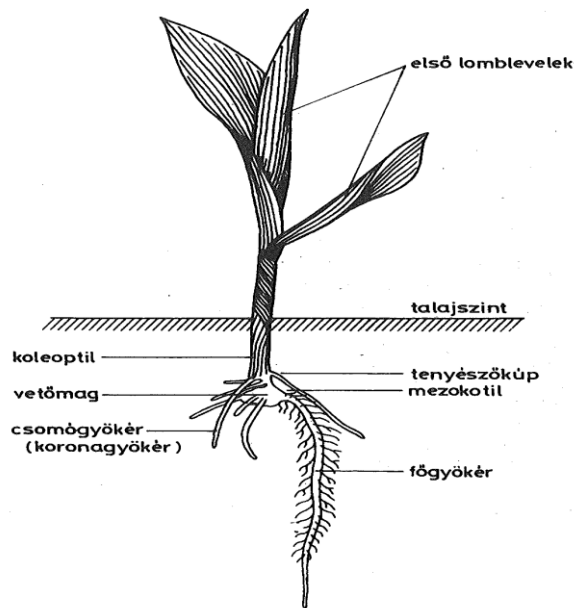
	Élelmiszerek	Felső határérték (µg/kg)
1.	Feldolgozatlan gabonafélék kivéve durumbúza, zab és kukorica	1 250
2.	Feldolgozatlan durumbúza és zab	1 750
3.	Feldolgozatlan kukorica	1 750
4.	Közvetlen emberi fogyasztásra szánt gabonafélék, gabonalisztek (beleértve a kukoricalisztet, a kukoricakorpát és a kukoricadarát), korpa mint közvetlen emberi fogyasztásra szánt késztermék és csíra, a 7. sorban felsorolt élelmiszerek Kivételével	750
5.	Tészta (száraz)	750
6.	Kenyér (beleértve a kis pékárukat), tésztafélék, kekszek, gabonaszeletek és reggeli gabonapelyhek	500
7.	Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek és bébitelek	200

(Forrás: 1881/2006/EK rendelete)

3.4. A kukorica (*Zea mays*) fuzáriózisa

A kukorica vetésszerkezeti aránya az előző évben az összes mezőgazdasági területhez képest 28% volt. Kukoricából 7 millió tonnát takarítottak be, közel 8 %-kal kevesebbet 2005-2009 átlagánál, amely szélsőséges adatokból tevődik össze az aszályos időjárás miatt (ANDRÁSI és VALKÓ, 2011). A gabonaövezetbe tartozó régiókban, mint pl. a Kárpát medence, az elmúlt 30 év legsúlyosabb növénytermesztési veszteségeit a kalászfuzáriózis és a kukorica fuzáriumos csőpenészedése okozta (HORNOK, 2001). Átlagon felüli csapadékos, párás, meleg időjárási körülmények között országos járvány alakulhat ki. A járványok kialakulását az időjárásen kívül befolyásolja többek között a vetésidő, a fajta ellenálló képessége, a vetőmag mennyisége, valamint a nitrogénműtrágya adagolása. A kórokozó fuzáriumok kártétele a termés mennyiségének csökkenésén túl, a minőség romlásában is megmutatkozik, így gyenge minőségű vetőmag illetve toxinszennyezett lehet a takarmány vagy étkezési gabona (KOVÁCS, 2010). A védekezés nagyon nehéz a fuzáriózis ellen, mert nagyon sok helyen állt a táblákon a víz, így földi géppel lehetetlenné vált a védekezés (BÉKÉSI és HERTELENDY, 2011).

A kukorica jelentősége széles körű felhasználhatóságában rejlik, hiszen takarmányként, élelmiszerként, vetőmagként és ipari nyersanyagként is használják. A pázsitfűfélék családjába, a *Zea* nemzetségbe tartozik. Bojtos gyökérzetű növény, a csíra gyököcskéjéből fejlődnek az elsődleges csíragyökerek, amelyek a legmélyebbre hatolnak (2. ábra). A csírázáshoz kellő mennyiségű vízre, megfelelő hőmérsékletre és oxigénre van szüksége. A kukorica a csírázásához nagyobb hőmérsékletet igényel, mint más gabonafélék (SÁNDOR és MOLNÁR, 1999).



7. ábra. Fiatal csíranövényke

2. **ábra:** A kukorica csíranövénye (SÁNDOR és MOLNÁR, 1999)

A növény minden fejlődési szakaszában megfigyelhetők a fuzárium fertőzés tünetei. (DEL FIORE et al., 2010). A *F. graminearum* a gabona, a fűfélék, a búza és a kukorica fuzáriózist okozza (KÖVICS, 2000). A különböző *Fusarium* fajok a csírázástól a betakarításig, sőt még a betakarítás után is fertőzhetik a kukoricát. A kukorica fuzáriózisának legfontosabb fertőzési forrása a vetőmag, mivel a kórokozók a vetőmag belsejében micélium, felületén pedig klamidosprórák és konídiumok vannak jelen. A kórokozók micéliuma a szemek felületén néhány hónapig, míg a belső szövetekben 3-4 évig is életképesek maradnak. Az időjárási tényezők közül a csapadék, főleg annak eloszlása befolyásolja a betegség fellépését. A betegség első tünete a hiányos kelés, a fertőzés kiindulhat a fertőzött magból, illetve a talajból is. A kórokozók még a talajban megtámadják a magot, illetve a csírat, még a kelés előtt. A hosszan tartó, hűvös, csapadékos időjárásban szokott jelentős lenni a magvak penészedése és a csíra rothadása. Később a már kikelt fiatal növények földalatti szárát, illetve a gyökereit támadják meg a kórokozók. A fertőzött növények levelei besárgulnak, összefonnyadnak, vagy súlyosabb fertőzés esetén megbarnulnak és elhalnak. Az elrothadt szemeken, csírákon, a fiatal növény gyökerein illetve a szár tövén a gombák micéliumától (az általuk termelt színezőanyagoktól) fehér, rózsaszín, piros vagy lilásvörös színeződés jelenik meg. A fertőzött csíranövények sorsa főként az időjárástól és a kórokozó faj patogenitásától függ. Kedvező körülmények esetén a növények meggyógyulnak, és látszólag egészségesen fejlődnek tovább,

azonban a kórokozók a nyár során a gyökerekben és szártőben lappangva tovább élősködnek. A betegség tünetei rendszerint akkor jelentkeznek ismét, hogyha a növény fejlődését valamilyen környezeti tényező nagymértékben akadályozza (pl.: víz- vagy tápanyaghiány). Ebben az esetben a szár belső szövetei olyan mértékben károsodhatnak, hogy kényszerérés következhet be. Súlyosabb esetben pedig a szár alsó részének korhadása miatt a csövek súlya a növényeket a földre húzza, és a szár eldől, eltörik. A szár belső felén és kórokozó gombától függően sárgás-vöröses vagy fehéres-lila elszíneződés figyelhető meg. Fejlettebb korban a fuzáriózis egy jellemzője (de ritkán előforduló tünete) a kukorica vörösödése. A tünetek legtöbbször virágzás idején jelentkeznek, de megfigyelhetők korábban és később is. A növények levelein, a levélhüvelyen de a csupasz száron is többé-kevésbé összefüggő sötétvörös színeződés figyelhető meg. A vörösen elszíneződött növények gyengébben növekednek, vékonyabbak, alacsonyabbak az egészségesnél. Továbbá a szemek és a csövek kisebbek lesznek. A kihúzott növények szártőve, lágygyökerei, gyökerei korhadtak, gyakran vöröses-lilás árnyalatúak. A kukorica fuzáriózisének érés körüli tüneteire a csövek penészedése jellemző, ez a betegség legismertebb tünete. A betegség leggyakrabban a csövek végén kezdődik, és ritkábban a cső közepén vagy alapján. A kórokozók a micéliummal bevonják a csuhalevelek alatt a cső felső harmadát, felét, sőt ha elegendő idő áll a rendelkezésükre, akkor az egész csövet. A micélium először a szemek felületén és a szemsorok között fejlődik ki, később pedig átjárja a szemeket és a csutkát is. A szemek és a csutka elszíneződik, majd elkorhad. A különböző *Fusarium* fajok a tárolás alatt is megtámadhatják a kukoricát, tartósan nedves körülmények között teljesen megsemmisíthetik a terményt (PETRÓCZI, 1997).

3.5. A fuzáriummal szennyezett kukorica biogáz alapanyagként történő felhasználása

A fuzáriummal szennyezett kukorica, amely mint már a fentiekben említettem nem használható élelmiszerként, vetőmagként vagy takarmányként, hulladékká válik. A biogázüzemek fontos szerepet tölthetnek be a fertőzött kukorica hasznosításában, egyik legfontosabb szerepük a mezőgazdasági termelés kiegészítésében van. A fermentáció első szakasza a hidrolízis, amelyben a mikroorganizmusok heterogén csoportja a fehérjéket, szénhidrátokat és zsírokat főleg rövid szénláncú zsírsavakká alakítja át hidrolízis és fermentáció révén. A hidrolizált kisebb molekulák oldatba mennek, és ezeket a vegyületeket a

savtermelő baktériumok szubsztrátként használják fel. A hidrolízist és a savképződés folyamatát nem lehet szétválasztani, mert a hidrolízissel együtt az illó zsírsavképződés is elindul. A hidrolitikus sejten kívüli enzimek (proteáz, cellobiáz, amiláz, foszfatáz) olyan vegyületek, amelyek a makromolekulákat hidrolízissel kisebb molekulákká alakítják át. A hidrolízist befolyásolja a pH, hőmérséklet és a fajlagos felület. A lebontási folyamatban széndioxid és H_2 képződik (ÖLLÖS et al., 2010).

A fermentlé kijuttatásánál jelentős ammónia veszteség léphet fel, ez csökkenthető a fermentlé gyors talajba dolgozásával vagy direkt talajba fecskendezéssel (SOMOSNÉ, 2010). Egy holland kutatás (HUIJSMANS és MOL, 1999) szerint a termőföldre kijuttatott fermentlé ammónia párolgása min. 50 %-kal csökkenthető abban az esetben, ha 6 órán belül beszántják az adott területet. A kijuttatás eszköze lehet a csőkonzolos kijuttatás, valamint a sekély injektálás. Az optimális körülmények a fermentlé kijuttatásához az esős, nedves és szélmentes időjárás (SOMOSNÉ, 2010).

A nemzetközi kísérletek, főleg a *Fusarium* gomba kimutathatóságát célozták meg laboratóriumi körülmények között a biogáz rendszerben. Az anaerob fermentálás végtermékének mikotoxin tartalmát, illetve annak hatását a talaj-növény-állat-ember rendszerre eddig még nem vizsgálták (BIRO et al., 2011). A toxin hatása a csíra növekedésére még szintén kevésbé ismert, így ezt csíranövény tesztekkel lehet megvizsgálni.

3.6. Csíranövény teszt

Csíranövény tesztnek nevezzük összefoglalóan azokat a fitotoxikológiai tesztek, amelyek magukba foglalják a csírázás gátlás és gyökérnövekedés teszteket. A csíranövényekkel végzett tesztek nagy előnye, hogy a teszt-élőlény vetőmagként jól tárolható, a csíranövény szükség esetén, kis helyen, könnyen felnevelhető (FELFÖLDY, 1987). Ez az eljárás megmutatja, hogy a tesztnövényre vonatkoztatva milyen az adott minta toxicitása a kontroll tenyészedénnyel összevetve. A mérgezés hatását a csírázás elmaradása, illetve a csíranövények csökkent növekedése vagy esetleges elváltozása jelzi. A csírázási százalék és a gyökérhosszúság együttes vizsgálatával olyan vizsgálati módszerek alapozhatók meg, mint például a környezeti hatástanulmány, így még pontosabb képet kaphatunk egy adott szennyezésről (GONG et al., 1998; NAGY és TAMÁS, 2008). Természettudományos vizsgálatok során rendszeresen és eredményesen alkalmaznak csíranövény tesztet világszerte (RIEPERT és FELGENTREU, 2002).

Az eljárás során az adott növényfaj magvait helyezik a vizsgálandó közegbe, és meghatározott idő elteltével megszámlálják a kikelt csíranövények számát. A csírateszteknek több típusa ismert. Egyik csíráztatási módszer a nedveskamra-módszer (Petri-csészés), amely előnye, hogy a mag felületi, valamint a maghéj alatt fertőzést okozó, szinte valamennyi gomba és baktérium növekedését, fejlődését, és termőképleteik kifejlődését ki lehet vele mutatni. Ennél a módszernél általában a Petri-csészék aljára szűrőpapírt helyeznek, amelyet steril vízzel megnedvesítenek. Abban az esetben, ha az azonosítás céljából a maghéjon tenyésző gombák fejlődését nézik meg, a magvakat előzetes fertőtlenítés nélkül a csíráztató ágyra helyezik. Ha pedig a belső szövetekben lévő kórokozókat kívánják meghatározni, akkor a magvakat külsőleg fertőtleníteni kell. A magvakat a csíráztató ágyba steril oltókamrában szokták behelyezni. Ezután pedig termosztátban 20-25 °C-ra teszik. A sterilizált magokon csak azok a gombák figyelhetők meg, amelyek a maghéj alatt vagy a mélyebb szövetekben fejlesztenek micéliumokat, pl.: *Fusarium*, *Phoma*, *Septoria* stb. A másik módszer lehet a tenyészedenyes csíráztatás, amely előnye, hogy jobban megfigyelhető a mag csírázása, és a fiatal növény fejlődése, illetve a fejlődésben jelentkező esetleges rendellenességek vagy elváltozások a növényen. Ennél a módszernél különböző anyagokból készült edényeket alkalmaznak, alaprétegnek pedig 1 mm-es szitán átszitált, jól kimosott és autoklávban vagy szárítószekrényben 105 °C-on lesterilizált finom kvarchomokot használnak. Ennél a módszernél ügyelnek arra, hogy a magokat steril csipesszel, illetve 1,5-2,5 cm távolságra helyezzék az edényekbe. A csírázás idején elpárolgott vizet steril vízzel szokták pótolni. Ezt a módszert főleg a vetőmag egészségi állapotának mennyiségi vizsgálatánál javasolják (RADUKESCU és NEGRU, 1971). Az egyes szennyezők toxicitásának vizsgálatára - a csírázásgátlás mellett - más paraméterek mérése is elterjedt. Csíratesztre javasolt tesztnövények közé tartoznak: uborka, saláta, retek, rizs, köles, mustár, repce, zsázsa, vörös here, búzafélék (ORGANIZATION FOR THE ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) 1984), zab, **kukorica**, káposzta, sárgarépa, szója, paradicsom, angol perje, hagyma, bab (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USFDA), 1984; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA), 1996).

A csíratesztek előnye, hogy a vizsgálat tárgyát nem képező faktorok hatása általánosítható, vagy figyelmen kívül hagyható, illetve számos tényező kontrollálható. Továbbá a csírateszthez hozzáadott anyagok mennyiségét is pontosan ismerjük. Az előnyökhöz tartozik

még, hogy gyorsan, egyszerűen elvégezhető a csírateszt és a nagyszámú vizsgálat kiválóan értékelhető statisztikailag.

4. Anyag és módszer

4.1. A kísérlet során felhasznált anyagok

4.1.1. A kísérlet során felhasznált fermentlé jellemzői

A kísérletem során felhasznált fermentlevet a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Víz- és Környezetgazdálkodási Intézet biodegradációs laboratóriumában készítették, és bocsátották rendelkezésemre. A 3. táblázatban látható, hogy a két eltérő típusú fermentlében (amelyeket a csíranövény tesztekben vizsgáltam) milyen alapanyagok kerültek, továbbá milyen mennyiségben (g-ban kifejezve). A 2. típusú fermentlébe a beállítás során fuzáriumos kukoricadara került.

3. táblázat: A felhasznált input anyagok mennyisége

1. típusú fermentlé (26, 3%-os kontroll biogáz kísérlet)		2. típusú fermentlé (26, 3%-os fuzáriumos biogáz kísérlet)	
Alapanyag	Mennyiség 5 l-re (g)	Alapanyag	Mennyiség
húslé	220	húslé	220
silókukorica	160	silókukorica	160
szeparált anyag	43	szeparált anyag	43
hígtrágya	500	hígtrágya	500
kontroll kukoricadara	57	fuzáriumos kukoricadara	57
fermentlé	4020	fermentlé	4020

(Forrás: Biró Györgyi)

A fuzárium illetve a DON toxin hatását három eltérő tenyészedényes kísérletsorozat keretében vizsgáltuk. A kísérlet beállítása úgy történt, hogy 70 ml vizsgált anyagot a már előzetesen lemerít 1 kg talajhoz adtam, homogenizáltam, majd az edényekbe helyeztem (az edény aljára szűrőpapír került). A kiadagolt fermentlé mennyiséget valós, nitrát érzékeny szántóföldi talajokra kijuttatott nyírbátori biogázüzemből származó fermentlé mennyisége alapján számítottuk ki, az arra a területre elkészült talajtani szakvélemény alapján. A kezeléseket kétféle fermentlé hozzáadásával végeztem. Az egyik fermentlé az alapanyag 26 %-ában (sz.a.) *Fusarium* sp. fertőzött (DON toxint tartalmazó), míg a másik fuzáriumtól mentes kukoricadarát tartalmazott. Minden kezelés esetén három ismétlést alkalmaztam és az eredményeket kontroll vizsgálatokkal vettem össze. A kontroll ebben az esetben is csak

kvarchomokot tartalmazott. Az első és második kezelés alkalmával a májusban készült fermentlevet, a harmadik kezelés során pedig a márciusban készült fermentlevet használtam fel.

4.1.2. A kísérlet során felhasznált hidrolizált termék jellemzői

Az anaerob hidrolízis során 38 °C-on, anaerob körülmények között, 4 napos inkubáció történt. A kontroll hidrolizált termék 500 ml steril ioncserélt vizet és 25 g kukoricadarát tartalmazott, illetve a K1-es hidrolizált termék 490 ml steril ioncserélt vízből, 25 g kukoricadarából és 10 ml gombaszuszpenzióból tevődött össze (4. táblázat). A K1-es beállítás esetén a gombasejtszám $2,2 \cdot 10^8$ volt. A K2-es kezelésben a K1-es sejtszám 5-szöröse, a K3-as kezelésben pedig 10-szerese volt. Az utóbbi két beállítás végtermékét nem vizsgáltam a csíranövény teszt során, mert bepenészedtek. Ennek valószínűleg az volt az oka, hogy az alapanyagként felhasznált kukorica nagymértékű fertőzöttségét légsterilizálással nem sikerült megszüntetni. A mikroszkópos azonosítás során *Aspergillus sp.* penészgombák jelenlétét tapasztaltuk a K2-es és a K3-as hidrolizált termékekben. A továbbiakban a kukoricadara és a víz együttes fertőtlenítését tervezzük autoklávban a teljes csíramentesség elérése céljából.

4. táblázat: A hidrolizált termék összetétele

Minta neve	Összetétele	Sejtszám
Kontroll	500 ml steril ioncserélt víz +25 g kukoricadara	-
K1	steril ioncserélt víz 490 ml+25g kukoricadara+10 ml gombaszuszpenzió	$2,2 \cdot 10^8$

(Forrás: Biró Györgyi)

A hidrolizált termékekben előzetesen különválasztottuk a szűrletet és a szilárd fázist. A kontrollból és a K1-esből a szűrletet és szuszpenziót alkalmaztuk és ezt kevertük a kvarchomokhoz. A K2 és a K3-as hidrolizált terméket nem használtam a csíráztatás során, mivel a kísérlet vége előtt bepenészedett. A kísérlet beállítása az előzőekhez hasonlóan történt.

4.2. DON toxin meghatározás ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel

Az alapanyagként használt kukorica, a fermentlé és a hidrolizált termék Don toxin tartalmának meghatározása ELISA módszerrel történt (kit RIDASCREEN® FAST DON R5902), amely a 3. ábrán látható. A vizsgálatokat a nyírbátori regionális biogázüzem központi laboratóriumában végezték. A minta előkészítése során ledaráltak 5 g kukoricát, és bele tették 100 ml desztillált vízbe és ezt 3 percig rázták. Szűrőpapíron leszűrték, és a szűrletből 100 µl-t mértek ki. A fermentlé és a hidrolizált termék esetén a minta előkészítés csak szűrésből állt. Ezt követően a plate-re pipettáztak 2-szer 50 µl-t az 5 standardból, és a szűrt mintából. Mindegyikhez hozzáadtak 50 µl enzim konjugátumot és 50 µl DON antitestet, majd szobahőmérsékleten 5 percig sötétben inkubálták. Az inkubálási idő lejártá után 3-szor lemosták, és hozzáadtak 100 µl kromagén szubsztrátot és 3 percig ismét sötétben, szobahőmérsékleten inkubálták. Ezt követően hozzáadták a stop reagens, amivel leállították a reakciót és 10 percen belül 450 nm-en lemérték az ELISA Microplate Reader fotométerrel.



3. ábra: RIDASCREEN® FAST DON R5902

(Forrás: Biró Györgyi)

Az ELISA Microplate Reader PC-vel csatlakozik egy számítógéphez, ami a mérést követően mutatja a mintában lévő DON toxin mennyiségét (ppm-ben).

4.3. A tenyészedényes csíranövény teszt

A munkám során 3 különböző kísérletet állítottam be, amelyben az elsőként a fuzáriummal szennyezett (DON toxint tartalmazó) illetve fuzárium mentes fermentlevek csírázásra gyakorolt hatását vizsgáltam. Továbbá vizsgálatokat végeztem a hidrolizált termék csírázásra

gyakorolt hatásának meghatározására, illetve a harmadik kísérletben *Fusarium graminearum*mal fertőzött mag csírázási erejének mértékét kívántam meghatározni.

A vizsgálataim során kvarchomokot használtam (Scharlab Magyarország Kft, Debrecen), amelynek szemcsemérete 0,1-0,8 mm, illetve max. 0,02 % kloridot (Cl), max. 0,03 % vasat (Fe) tartalmazott (30 kg-ra levetítve). A csírateszteket steril laboratóriumi körülmények között végeztem el. A talajt a kísérlet beállítása előtt 24 órán át szárítószekrényben légsterilizáltam. Ezt követően OHAUS gyártmányú PIONEER Balances típusú mérleggel 1kg-t mértem ki. Minden keverési arány mellé beállítottam egy kontrollt, hogy a csírázás során időben és térben tapasztalható különbségek még jobban megfigyelhetők legyenek. A kontroll tenyészedény csak kvarchomokot tartalmazott. A keverési művelet után megöntöztem a talajt, olyan módon, hogy teljesen ázzon át, így elérve a maximális víztelítettségi szintet. 24 óra elteltével lemértem minden edény tömegét, így megkapva a minimális vízkapacitást. A lemért edények tömegét feljegyeztem, és a naponta történő öntözés során a hiányt ioncserélt vízzel pótoltam. A kísérlet során LG 33. 95-ös hibrid kukoricát használtam fel, melynek jellemzői, hogy korai kukorica, lófogú szemtípusa van. Új, nagy termőképességű, a korai és középcsoport határán érő. Vízleadása éréskor gyors, betakarításkor a szemnedvesség tartalma éréscsoportja átlagánál kedvezőbb. Magas, zöld száron érő hibrid, a csövek hosszúak, jól termékenyülnek, a csutka vékony, piros színű. Alkalmazkodó képessége nagyon jó, szárazságtűrése éréscsoportjában kiemelkedő. Eltérő termőhelyi adottságoknál is eredményesen termesztethető (I2). A nem fertőzött kukoricaszemek *Fusarium sp.*-től való mentességét előzetes mikrobiológiai vizsgálatokkal igazoltuk. A vetést a kukoricaszemek felületi fertőtlenítését követően végeztem el, 3-4 cm mélyre ültettem a magokat, steril csipesszel helyeztem be 20 magot egy tenyészedénybe. A csíráztatáshoz felhasznált magok fertőtlenítése fungicid, baktericid oldatban történt. 10 percig, az Edmund Bühler KS típusú eszközzel Neomagnolos oldatban rázattam, majd még 2-szeri öblítést végeztem. A csíráztatás szobahőmérsékleten 22 ± 2 °C-on, minden esetben 6 napig tartott a talaj hőmérséklet alapján, amit minden esetben a kísérlet beállítása előtt lemértem. A csírázási idő elteltével a csírákat kiszedtem, megtisztítottam illetve lemértem. Az eredmények háromféle módon értékeltem ki. Az egyes kezelések csíráképességét kontroll százalékában (%) kifejezve vizsgáltam. Toxikológiai minősítést is készítettem minden egyes kezelés esetében (NÉMETH, 1998) alapján, ahogy az a 5. táblázatban is látható a minősítés a gyökerek átlagos hossza alapján

történt a kontroll %-ában. Továbbá az általános statisztikát is elkészítettem minden egyes kísérlet alkalmával.

5. táblázat: Toxikológiai minősítés a csíranövény teszt alapján

A gyökerek átlagos hossza a kontroll %-ban	Minősítés
0-5 %	igen mérgező
6-50%	mérgező
51-90%	kissé mérgező
91-120%	nem mérgező
> 120%	serkentő

(Forrás: NÉMETH, 1988.)

A csíranövények gyökérhosszait (mm) a kísérlet végén lemértük, valamint a Tukey-féle variancia-analízist használtunk az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségek, azaz mikotoxinok csírázásra gyakorolt ökotoxikológiai hatásának kimutatására.

4.4. *Fusarium graminearum* folyékony tenyészet készítése

Fuzáriummal szennyezett és nem szennyezett kukorica szemtermés csírázási erejének összehasonlítása céljából megfertőztem a növénymagot a *Fusarium graminearum* Schwabe F. 00970 gombatörzzsel, amely a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből (MIMNG) származik. A kísérlet során Papavizas táptalajt készítettük el (6. táblázat). A Papavizas táptalaj egy *Fusarium* specifikus táptalaj, ezáltal csak a *Fusarium graminearum* fejlődik ki rajta.

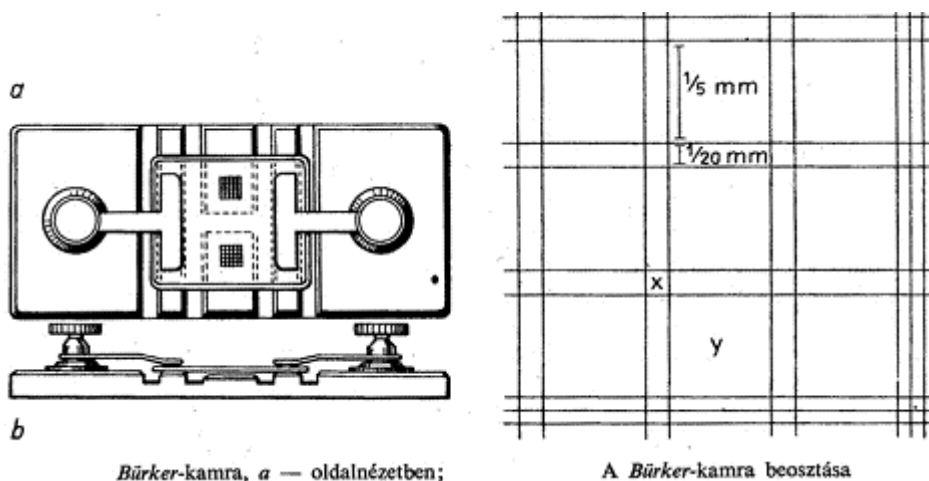
6. táblázat: A Papavizas táptalaj a következő receptura szerint készült el

Papavizas táptalaj	Bemért mennyiség (g; ml)
Pepton	7, 5 g
KH₂PO₄	0, 5 g
MgSO₄ *5 H₂O	0, 25 g
Epesó	0, 25 g
PCNB	0, 25 g
Klór-tetraciklin	0, 025 g
Sztreptomicinszulfát	0, 050 g
Ioncserélt víz	500 ml

(Forrás: SZÉCSI és MESTERHÁZY, 1998.)

A táptalaj elkészítése során első lépésként az összes munkaeszközt lefertőtlenítettem, majd bemértem a receptben szereplő nagyobb mennyiségeket PIONEER Balances típusú mérleggel, a kisebbeket pedig (OHAUS Explorer) analitikai mérleggel, majd 500 ml-ig feltöltöttem az autoklávozható edényt. Ezt követően Velp ARED Heating magnetic stirrer 1200RPM típusú mágneses keverővel 20 percig kevertem, hogy minél inkább elhomogenizáljam a táptalajt. Miután megtörtént homogenizálás a táptalaj kémhatásának beállítása következett, amelyet indikátorpapírral ellenőriztem. A táptalaj pH-ját a megadott értékre állítottam be, a Papavizas táptalaj esetében ez az érték 5,2 volt. Ha eltért a megadottól, akkor citromsavval vagy NaOH-val állítottam be a kívánt értékre. A táptalajt Raypa típusú autoklávban 20 percig nedves hőben (121° C-on) és túlnyomáson (1,5-2,5 atm) sterilizáltam. Ezt követően a NÜVE LN 120 típusú lamináris boksban Erlenmeyer lombikokba töltöttem ki a táptalajt, melyet szobahőmérsékletre hűlés után használtam fel. Következő lépésként történt az átoltás ferde agarról. Az oltókacsot izzítást követően a tenyészet felső széléhez érintettem, ha forró volt megvártam, míg lehűlt. Ezt követően végighúztam a kacsot a tenyészet felszínén, és kivettem egy kacsnyi gombát. Majd a kacson lévő gombát leoltottam a folyékony táptalajba. Ezt követően rázó inkubátorban (Edmund Bühler KS 15) 1 hétig fényben 200 r.p.m.-n inkubáltam. 1 hét inkubációt követően pedig ellenőriztem a makrokonídiumokat úgy, hogy sejtszámlálást végeztem Bürker kamrában (4. ábra). Ezek a számlálókamrák speciálisan kiképzett tárgylemezek, amelyeken meghatározott mélységű és

köbtartalmú csatornák, illetve kamrák találhatók. Ha ezekbe mikroba szuszpenziót viszünk, és fedőlemezzel befedjük akkor pontosan definiált rétegvastagságú és köbtartalmú folyadékban meg tudjuk állapítani a mikrobák összes sejtszámát.



4.ábra: A Bürker-kamra

(Forrás: <http://phys.bio.u-szeged.hu>)

A számlálást a következőképpen hajtottam végre. Az előre elkészített szuszpenzióból mindkét kereszt középre cseppenttem 1 ml-t és óvatosan lefedtem a fedőlemezzel buborékmentesen, illetve fémszorítóval leszorítottam. A BIO-3CCD, binokuláris, beépített CCD kamerás mikroszkóppal vizsgáltam a különböző gomba képleteket, elvégeztem a sejtszámlálást. Számláláskor az azonos területű négyzetekből (vagy téglalapokból) 10-15-ben megszámloltam a sejteket. A kapott darabszámot összeadtam és elosztottam a leszámolt négyzetek számával. Így megkaptam, hogy egy négyzetben átlagosan hány sejt található (n). Számláláskor úgy jártam el, hogy egy-egy kis négyzetben az azok határvonalain elhelyezkedő sejtek közül minden esetben azokat számoltam hozzá, amelyek a vizsgált nagyságú négyzet két meghatározott oldalánál fekszenek. A felső és a baloldali határvonalakon fekvőket beleszámloltam, az alsó és a jobboldali határvonalakon fekvőket nem vettem figyelembe. A kamrák magassága 0,1 mm. A kis négyzetben esetében az átlag sejtszámot 4×10^6 -nal szoroztam meg, és így megkaptam, hogy mennyi az összes sejtszám a minta 1 ml-ben. A sejtszámlálás eredményeit, az eredmények és értékelésük fejezetben ismerttettem.

Az LG 33. 95-ös steril kukoricát inokuláltam a meghatározott sejtszámú gombaszuszpenzióval. A magokat 15 percig áztattam a gombaszuszpenzióban, ezt követően szűrőpapírra helyezve inkubáltam 25 °C-on 2 hétig, valamint biztosítottam a gombák számára a megfelelő nedvességet. A fuzárium fertőzés jeleként már látszott a magok nagy részén a rózsaszín penészedés. Ezeket a fertőzött magokat ültettem el, és végeztem velük csíratesztet, hogy a fuzáriummal szennyezett és nem szennyezett kukorica csírázási erejének mértékét összehasonlítsam.

4.4.1. A fuzáriummal befertőzött mag csírázási képességének vizsgálata

A fuzáriummal szennyezett, illetve nem szennyezett kukorica csírázási erejének mértékét kívántam úgy meghatározni, hogy beállítottam egy kontroll tenyészedényt, amely csak kvarchomokot tartalmazott és ebbe ültettem a fuzárium mentes szemterméseket, valamint az előzetesen befertőzött magokat egy másik tenyészedénybe helyeztem. A csíráztatás 2 hétig tartott, csak vízpótlás történt minden nap. A *Fusariumos* fertőzés százalékos megállapításának módszere a csírázókéesség meghatározásának vizsgálata HILTNER-féle mértékfokozat szerint történt, amely kifejezi a magvak százalékát és a fertőzés intenzitását is (7. táblázat).

7. táblázat: A fuzáriumos fertőzés intenzitása

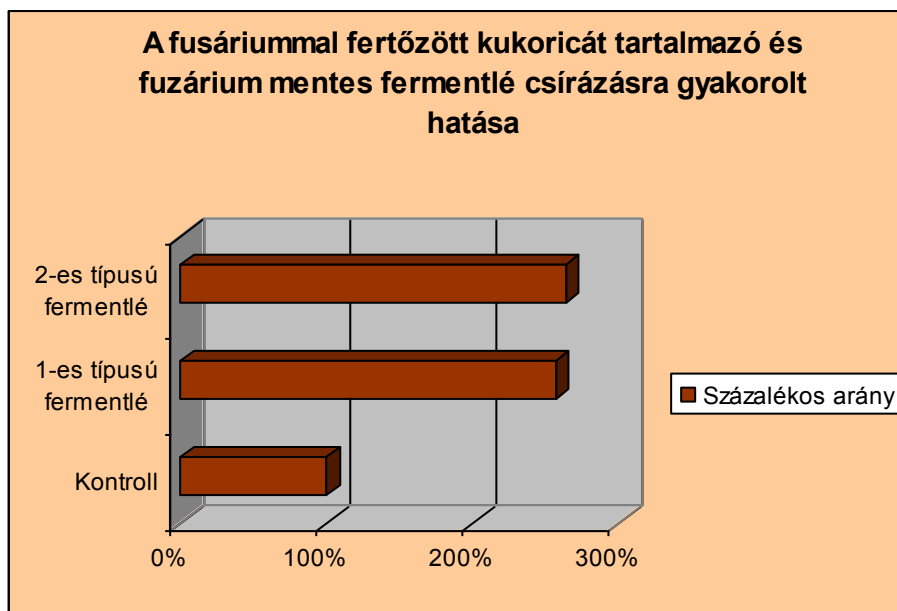
Fuzáriumos fertőzés %-ban	Fertőzés intenzitása
1-2 %	elhanyagolható fertőzés
2-5%	kevés fertőzés
5-10%	valamivel több fertőzés
10-20%	közepes fertőzés
20-30%	közepesnél erősebb fertőzés
30-50%	erős fertőzés
50%	nagyon erős fertőzés

(Forrás: RADULESCU és NEGRU,1971)

5. Eredmények és értékelésük

5.1. A fermentlé csírázásra gyakorolt hatásának meghatározása

A fermentlé csírázásra gyakorolt hatását 3 különböző kísérlet során vizsgáltam. Az júniusi kísérlet (továbbiakban 1-es kísérlet) alkalmával 3 beállítás történt, ekkor a fuzáriummal szennyezett és nem szennyezett fermentlé csírázásra gyakorolt hatását kívántam meghatározni. Ennek érdekében beállítottam 1-es illetve 2-es típusú fermentlevet tartalmazó tenyészedényeket, valamint egy kontroll edényt. A leírt eredményeket három módon szemléltettem. Az 5. ábra szemlélteti, hogy a kukorica csíranövények milyen arányban keltek ki a kontrollhoz képest. Ebben a kísérletben egyértelműen látszik, hogy a kontrollhoz képest az 1-es és a 2-es típusú fermentlé is serkentően hatott a kukorica csírázásra. Ennek az lehet oka, hogy a vetésmélység valószínűleg nem volt mindenhol egyforma, valamint ebben a kísérletben a csíráztatás még humuszos homoktalajon történt, a kontrollban nem volt értékelhető az eredmény, valószínűleg azért, mert tisztázatlan volt a humuszos homok terheltsége. Emiatt váltottunk a további kísérletek során standard kvarchomokra.



5. ábra: Az 1-es kísérlet eredményei (Forrás: saját készítés)

A kontroll érték a nem mérgező kategóriába esett, illetve az 1-es és a 2-es típusú fermentlevet tartalmazó keverékek szintén a nem mérgező kategóriákba estek a gyökerek átlagos hossza alapján (8. táblázat).

8. táblázat: A gyökerek átlagos hosszának minősítése a kontroll százalékában

Bekeverés típusa	Gyökerek átlagos hossza a kontroll %- ában	Minősítés
Kontroll	100	nem mérgező
1-es típusú fermentlé	102, 5	nem mérgező
2-es típusú fermentlé	101, 8	nem mérgező

(Forrás: saját készítés)

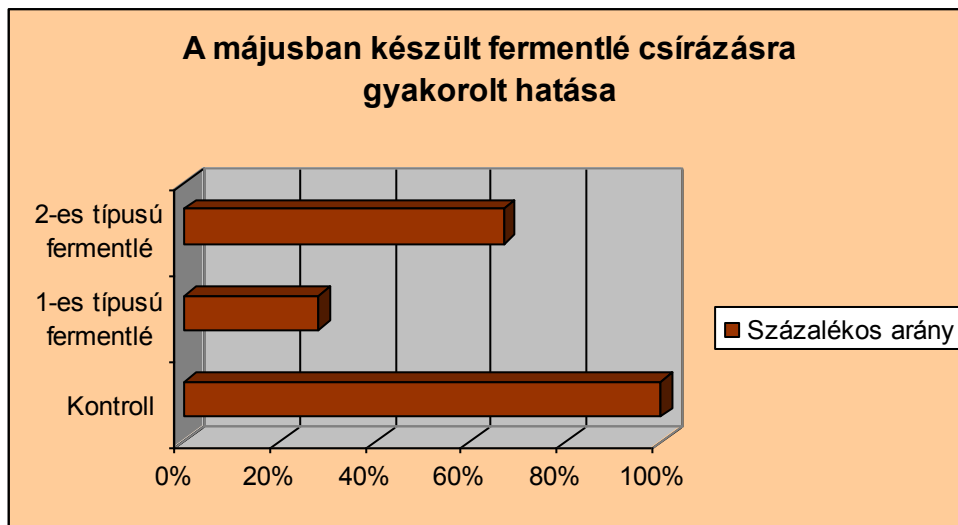
A fenti eredményeket alátámasztja a júniusi kísérlet általános statisztikája a kvarchomok-fermentlé (1-es és 2-es típusú) keveréken (cm), amit a 9. táblázat szemléltet. A Tukey-féle variancia analízis alapján nincs szignifikáns különbség a különböző kezelések között, tehát statisztikailag nem igazolható a csírázásra kifejtett serkentő vagy gátló hatás.

9. táblázat: Az 1-es kísérlet általános statisztikája

Bekeverés típusa	Medián	Módusz	Átlag	Szórás
Kontroll	8	8	7,99	4,15
1-es típusú fermentlé	8,8	11,9	9,24	3,42
2-es típusú fermentlé	8,4	4,4	8,99	3,73

(Forrás: saját készítés)

A júliusi kísérlet (továbbiakban 2-es kísérlet) alkalmával szintén vizsgáltam a májusban elkészített 1-es és 2-es típusú fermentlé csírázásra gyakorolt hatását. A 6. ábrán jól megfigyelhető, a kontrollhoz viszonyítva az 1-es típusú fermentlé felhasználásakor 72 %-kal, míg a 2-es típusú fermentlé felhasználásakor 33 %-kal kevesebb növény csírázott ki. Ennek valószínűsíthetően az lehet az oka, hogy a hosszú tárolási idő miatt feltehetően olyan anyagok keletkeztek a fermentlében, amely gátlóan hatott a csírázásra.



6. ábra: A 2-es kísérletben végzett csíráztatás mértéke (%-ban) (Forrás: saját készítés)

A 2. kísérlet eredményeinek értékelése során szintén minősítettem a gyökérhosszakat a toxikológiai minősítés alapján. Ebből egyértelműen kiderült, hogy az 1-es típusú fermentlé egyértelműen gátolta a csírázást és a mérgező kategóriába tartozik a gyökerek átlagos hossza alapján. A 2-es típusú fermentlé már kevésbé gátolta a növény növekedését, hiszen ahogy a 10. táblázatban látszik a kissé mérgező tartományba esett, és a csírák több, mint a fele tudott növekedni.

10. táblázat: A gyökerek átlagos hosszának minősítése a kontroll százalékában

Bekeverés típusa	Gyökerek átlagos hossza a kontroll %-ában	Minősítés
Kontroll	100	nem mérgező
1-es típusú fermentlé	28	mérgező
2-es típusú fermentlé	67	kissé mérgező

(Forrás: saját készítés)

Továbbá a vizsgálatok során az eredményeim alátámasztása céljából elvégeztem a 2-es kísérlet általános statisztikai értékelését is, amely a 11. táblázatban látható.

11. táblázat: A 2-es kísérlet általános statisztikája

Bekeverés típusa	Medián	Módusz	Átlag	Szórás
Kontroll	13,6	13,6	13,37	3,61
1-es típusú fermentlé	5,3	5,3	5,45	2,56
2-es típusú fermentlé	8,45	9,3	8,73	4,45

(Forrás: saját készítés)

Ahogy az a 12. táblázatban is látható szignifikáns különbség van a kontroll illetve az 1-es és 2-es típusú fermentlevet tartalmazó kezelések között, így statisztikailag bizonyított a fermentevék csírázásra gyakorolt gátló hatása, az 1-es és a 2-es kezelés között nincs különbség. Ennek valószínűsíthetően az lehet az oka, hogy a fermentlében tárolás során olyan anyagok keletkeztek, amelyek gátló hatást fejtettek ki a csírázásra. A 7. ábrán láthatóak a 2-es kísérlet eredményei.

12. táblázat: Tukey-féle variancia analízis a 2-es kísérletben

Kezelés	Kukorica
1-es	4,42 ^a
2-es	5,85 ^a
kontroll	12,09 ^b

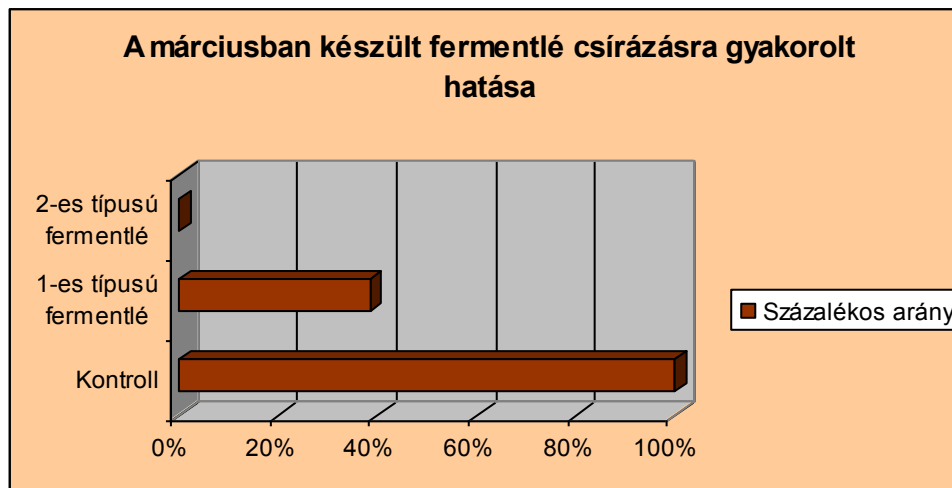
(Forrás: saját készítés)

*azonos betűindexhez tartozó értékek közt nincs szignifikáns eltérés ($P < 0,05$)



7. **ábra:** A júliusi kísérlet során végzett csírateszt (Forrás: saját készítés)

Az augusztusi kísérlet (továbbiakban 3-as kísérlet) során három bekeverést alkalmaztam, egy kontrollt, illetve 1-es típusú illetve 2-es típusú fermentlevet tartalmazó tenyészedényeket állítottam be. Ez a kísérlet annyiban különbözött a két korábbi kísérlettől, hogy míg a júniusi és a júliusi kísérletben májusi fermentlevet, addig az augusztusi kísérletben a márciusi fermentlevet vizsgáltam. A májusi fermentlé serkentő hatását statisztikailag nem tudtuk igazolni. A tárolás során feltehetően csírázás gátló anyagok halmozódtak fel a fermentlében, ezért vált indokoltá a márciusi fermentlé felhasználása, hogy megvizsgáljuk valóban van-e összefüggés a gátló hatás és a tárolási idő között. A lemért eredményeket a következő három módon szemléltettem. Elsőként a 8. *ábrán* látható, hogy milyen arányban keltek ki a csírák a kontrollhoz viszonyítva. Az *ábra* alapján megállapítható, hogy a kontrollhoz képest az 1-es típusú fermentlevet tartalmazó edényekben 61,5 %-kal kevesebb volt a csírázás mértéke, míg a 2-es típusú fermentlevet tartalmazó edényekben egyáltalán nem csírázott ki a kukorica. Ennek feltételezhetően az volt az oka, hogy 5 hónapig tárolt fermentlevet használtam fel a kísérlet beállítása során, és valószínűleg a hosszú tárolási idő alatt olyan anyagok keletkeztek, amelyek erősen gátló hatást fejtettek ki a csírázásra.



8. ábra: A 3-as kísérlet eredményei (Forrás: saját készítés)

Ezt az elméletet támasztja alá a toxikológiai minősítés is (13. táblázat), amelyben egyértelműen látható, hogy az 1-es típusú fermentlé a mérgező a 2-es típusú fermentlé pedig az igen mérgező kategóriába esett, illetve gátolta a csírázást.

13. táblázat: A gyökerek átlagos hosszának minősítése a kontroll százalékában

Bekeverés típusa	Gyökerek átlagos hossza a kontroll %-ában	Minősítés
Kontroll	100	nem mérgező
1-es típusú fermentlé	38,5	mérgező
2-es típusú fermentlé	0	igen mérgező

(Forrás: saját készítés)

A 3-as kísérlet eredményeinek általános statisztikáját is elkészítettem (amely a 14. táblázatban látható), hogy ezzel is jobban szemléltessem a csírázás alakulását a kontrollhoz képest. A Tukey-féle variancia analízis alapján nincs szignifikáns különbség a különböző kezelések között, tehát statisztikailag nem tudtuk igazolni a serkentő vagy gátló hatást.

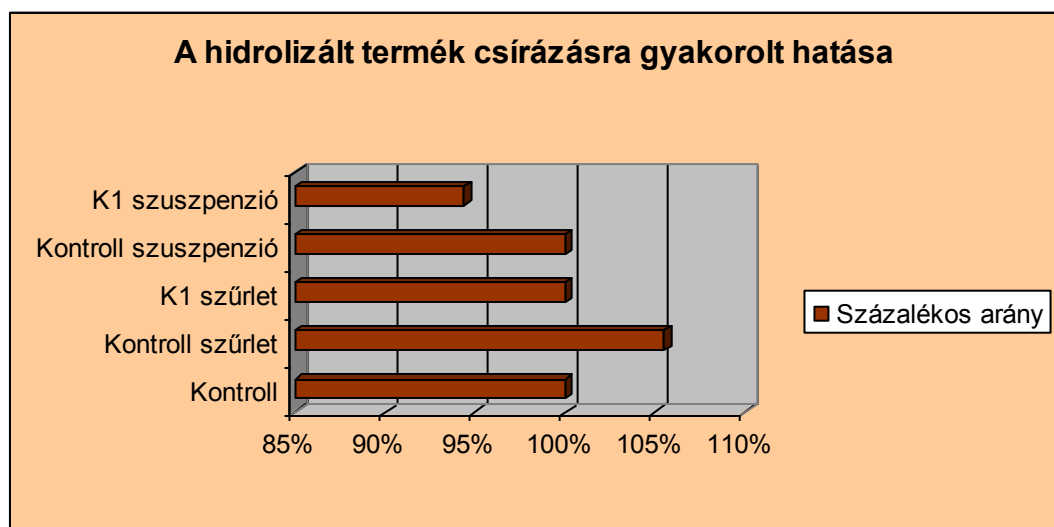
14. táblázat: Az augusztusi kísérlet általános statisztikája

Bekeverés típusa	Medián	Módusz	Átlag	Szórás
Kontroll	18,1	5,5	17,97	7,11
1-es típusú fermentlé	9,35	0	10,5	5,58
2-es típusú fermentlé	0	0	0	0

(Forrás: saját készítés)

5.2. A hidrolizált termék csírázásra gyakorolt hatásának vizsgálata

A hidrolizált termék csírázásra gyakorolt hatását a 9. ábra szemlélteti. A kontrollhoz képest a kontroll szűrletet tartalmazó tenyészedényben 5,5 %-kal több kukorica csírázott ki. Ez volt az egyetlen serkentő eredmény. A többi bekeverésben, lásd K1 illetve a kontroll szuszpenzió ugyanakkora volt a csírázás mértéke, mint a kontrollban. A K1 szuszpenzió esetében pedig még 6 %-kal kevesebb növény csírázott ki.



9. ábra: A hidrolizált termék hatása a csírázásra (Forrás: saját készítés)

A K1 szuszpenzióban 6 %-kal kevesebb, a kontroll szűrletben pedig 5 %-kal több növény csírázott ki. Ez az érték pedig a nem mérgező tartományba tartozik a toxikológiai minősítés szerint. Tehát a gyökérhosszok minősítése alapján kiderült, hogy a kontroll a nem mérgező kategóriába esett, továbbá az összes többi bekeverésben is ez figyelhető meg (15. táblázat).

15. táblázat: A gyökerek átlagos hosszának minősítése a kontroll százalékában

Bekeverés típusa	Gyökerek átlagos hossza a kontroll %- ában	Minősítés
Kontroll	100	nem mérgező
Kontroll szuszpenzió	100	nem mérgező
K1 szuszpenzió	94,4	nem mérgező
Kontroll szűrlet	105,5	nem mérgező
K1 szűrlet	100	nem mérgező

(Forrás: saját készítés)

A gyökérhosszok minősítése után a hidrolizált termék vizsgálatát célzó kísérletben elvégeztem az általános statisztikai vizsgálatokat, amelyeket a 16. táblázatban szemléltettem. Ebben a táblázatban jól látszik, hogy a kontrollhoz képest a kontroll szuszpenzióban nagyobb az átlagos csírahossz.

16. táblázat: A hidrolizált termék felhasználásával végzett kísérlet általános statisztikája

Bekeverés típusa	Medián	Módusz	Átlag	Szórás
Kontroll	13,6	13,6	13,37	3,61
Kontroll szuszpenzió	17,95	18	16,80	3,88
K1 szuszpenzió	14	13	15,13	4,16
Kontroll szűrlet	15,4	15,2	15,39	4,71
K1 szűrlet	15,75	13,5	15,14	3,47

(Forrás: saját készítés)

Ahogy az a 17. táblázatban is látható a Tukey-féle variancia analízis alapján megállapítható, hogy a kontroll illetve a kontroll szűrlet és szuszpenzió szignifikáns különbség van. Az eredmények alapján statisztikailag nem különböznek egymástól, azonban a kontroll illetve a fuzárium mentes szűrlet és szuszpenzió jelentős eltérést mutat, amelynek oka feltehetően a hidrolizálás során esetlegesen feltáródó tápanyagok jelenléte. Figyelembe véve azt, hogy a

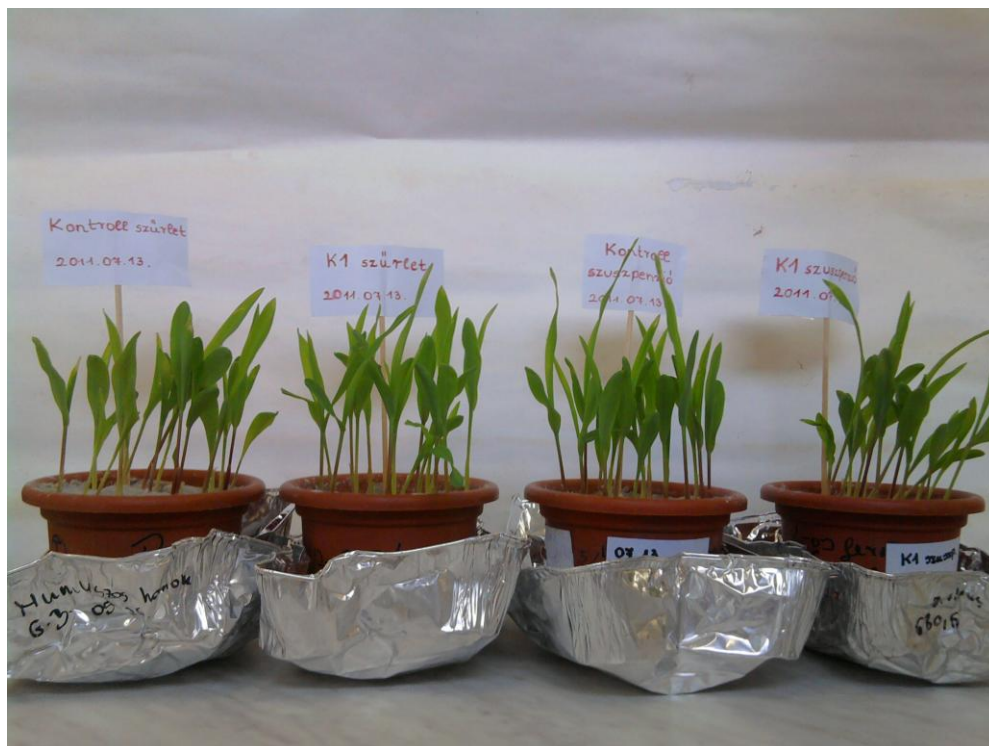
kezelt és a kezeletlen szűrlet és szuszpenzió között szignifikáns különbség nem állapítható meg, egyértelműen kijelentést nem tudunk tenni, hogy a DON toxin milyen hatással bír csírázásra. A számszerű adatok azonban minimális gátló hatást engednek feltételezni, ennek igazolására további vizsgálatokat tervezünk elvégezni. A 10. ábrán látható a hidrolizált termékkel végzett csírateszt eredménye.

17. táblázat: Tukey-féle variancia analízis a hidrolizált termék esetében

Kezelés	Kukorica
Kontroll	12,09 ^a
K1 szűrlet	14,10 ^{ab}
K1 szuszpenzió	14,75 ^{ab}
Kontroll szűrlet	16,33 ^b
Kontroll szuszpenzió	17,18 ^b

(Forrás: saját készítés)

*azonos betűindexhez tartozó értékek közt nincs szignifikáns eltérés ($P < 0,05$)



10. ábra: A hidrolizált termékkel végzett csíranövény teszt (Forrás: saját készítés)

5.3. A DON toxin mérés eredményei

A DON toxin mérés eredményei a 18. táblázatban láthatóak. Csak szűrlet adatok vannak, mivel az ELISA előkészítése során szűrletből kell meghatározni a toxint. A beállítás során nem változott a toxin mennyisége a kontroll esetén. A kontrollhoz képest a kontroll szűrletet tartalmazó tenyészedényben 5%-kal kelt ki több csíranövény. Ennek feltehetően az volt az oka, hogy a kontroll szűrlet kukoricadarát tartalmazott, ami tápanyagként szolgálhatott a csírázáshoz. A K1 szűrletben kis mértékben növekedett a toxin mennyisége, ebben az esetben pedig a kontrollal megegyező volt a kicsírázott kukoricák száma. A kismértékű toxinnövekedés oka feltehetően az volt, hogy 38 °C-on anaerob körülmények között és tápanyagok hiányában a gomba túlélése csökkent, így az exponenciális toxintermelés sem indulhatott meg.

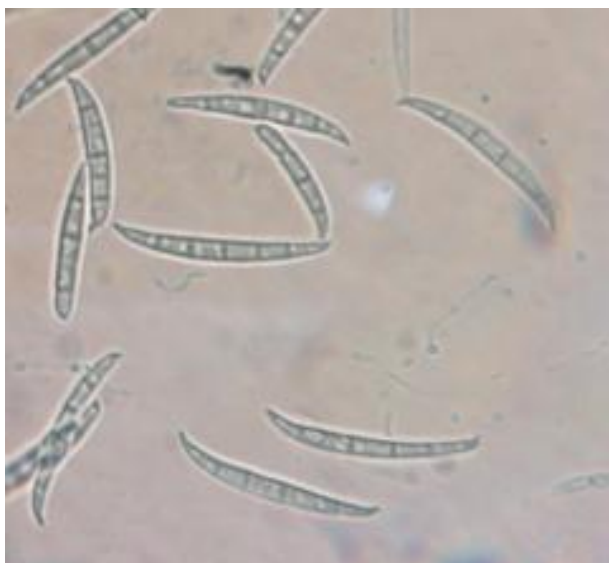
18. táblázat: A toxin mérés eredményei

Vizsgált anyagok	Mért értékek (ppm)
Kiindulási kukoricadara	1,08
Kontroll szűrlet	1,05
K1 szűrlet	1,18

(Forrás: saját készítés)

5.4. A sejtszámlálás eredménye

Az 1 hét alatt Papavizas folyékony táptalajban felszaporodott sejtek Bürker-kamrás sejtszámlálásának eredményeként megkaptam, hogy az összes sejtszám a minta 1 ml-ben $6,4 \cdot 10^7$ -en. A *F. graminearum* makrokonídiumok mikroszkópos képe az 11. ábrán látható.

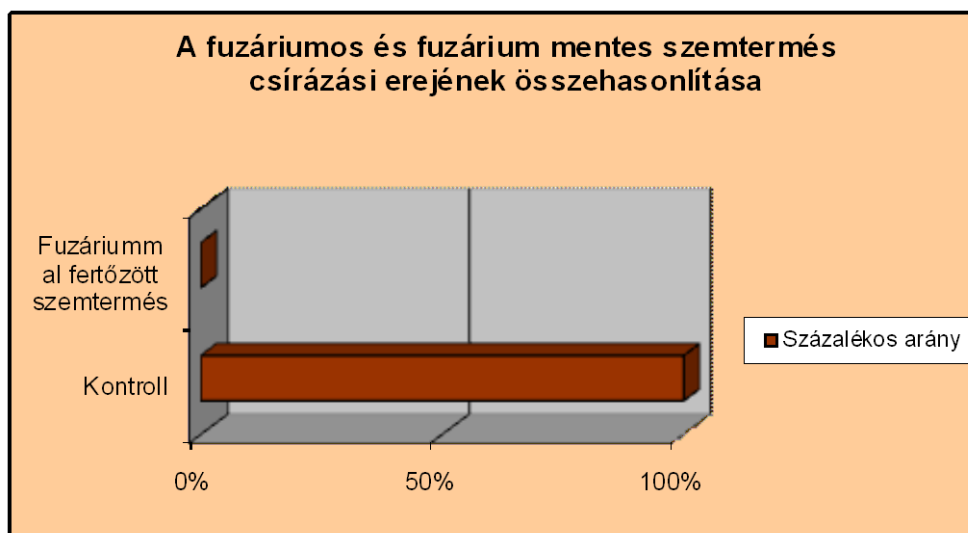


11. ábra: *Fusarium graminearum* makrokonídiumok mikroszkópos képe (40X)

(Forrás: saját készítés)

5.4.1. A fuzáriummal szennyezett illetve nem szennyezett szemtermés csírázási erejének mértéke

A fuzáriummal szennyezett kukorica a nagymértékű fertőzöttség köv. nem csíráztak ki, a kukorica szemek állagukban károsodtak, könnyen szétmorzsolódtak, azonban a fuzáriumtól mentes kukorica kicsírázott (12. ábra).



12. ábra: A fuzáriummal fertőzött kukorica szemtermés és a fuzárium mentes kukorica szemtermés csírázási erejének összehasonlítása (Forrás: saját készítés)

A Németh- féle minősítés szerint is látható, hogy a kontrollhoz képest a fuzáriummal fertőzött szemtermés az igen mérgező kategóriába esett (19. táblázat). A fuzáriumos illetve fuzárium mentes szemtermés átlagos statisztikája a 20. táblázatban látható.

19. táblázat: A gyökerek átlagos hosszának minősítése a kontroll százalékában

Bekeverés típusa	Gyökerek átlagos hossza a kontroll %- ában	Minősítés
Kontroll	100	nem mérgező
Fuzáriummal fertőzött szemtermés	0	igen mérgező

(Forrás: saját készítés)

20. táblázat: A fuzáriumos illetve fuzárium mentes szemtermés átlagos statisztikája

Bekeverés típusa	Medián	Módusz	Átlag	Szórás
Kontroll	12,3	13,6	12,04	4,18
Fuzáriummal fertőzött szemtermés	0	0	0	0

(Forrás: saját készítés)

A HILTNER-féle minősítés szerint ebben a kísérletben mindegyik mag a nagyon erősen fertőzött kategóriába esett, mivel több, mint 50 %-s volt a fertőzés. A 13. ábrán látható a fuzárium mentes és fuzáriummal fertőzött kukorica szemtermés.



13. ábra: A fuzárium mentes és fuzáriummal fertőzött kukorica szemtermés
(Forrás: saját készítés)

6. Következtetés, javaslat

A fuzárium és a DON toxin mennyiségének meghatározása során kísérleteim eredményei alapján nem volt egyértelműen megállapítható a fuzárium mentes és a DON toxinnal terhelt kukoricát tartalmazó fermentlé csírázásra gyakorolt hatása. A továbbiakban tervezzük olyan kísérlet beállítását, amelyben a minimális tárolási idő elteltével használjuk fel a vizsgálni kívánt fermentlevet. Ezen kívül még olyan kísérleti beállítást is szeretnénk megvalósítani, amelyben vizsgáljuk azt, hogy az adott időpontban elkészült fermentlé a tárolás során milyen változásokon megy keresztül és ez hogyan hathat a csírázásra.

A hidrolizált termék csírázásra gyakorolt hatása nem volt kiemelkedő. nem fejtett ki serkentő hatást, azonban kis mértékű gátló hatás volt megfigyelhető a fuzárium és DON tartalmú szűrlet esetén. Olyan kísérleteket tervezünk, melyben a gomba számára szükséges tápanyagokat biztosítjuk (pl. gombatáptalaj használata steril víz helyett), valamint a 25 és 38 °C-os aerob és anaerob körülményeket. Ezután pedig biogáz-termelésre jellemző szubsztrát analógok például húslé, valamint olyan toxintermelést indukáló anyagok felhasználását tervezzük, amelyek a biogáz-termelés esetén jelen lehetnek (pl. különböző szén és nitrogénforrások).

A fuzáriummal szennyezett DON toxint tartalmazó kukorica szemtermésének csírázási erejének összehasonlító vizsgálata során a fuzáriummal szennyezett kukorica szemtermése egyáltalán nem csírázott ki. A nagymértékű fertőzöttség miatt a kukorica szemtermés állagában szétroncsolódott, egyértelmű volt a nagyon erős fertőzés. További vizsgálatokat szeretnénk végezni annak megállapítására, hogy más típusú hibridek esetén mekkora lenne a fertőzés, ezzel esetleg egy fuzáriummal szemben ellenállóbb kukorica hibrid megállapítását célozzuk.

7. Összefoglalás

Az elmúlt években bekövetkező csapadékos időjárás miatt kedvező körülmények alakultak ki a gombák számára. Ez aktuális problémát jelent hazánkban, mivel a 2010-es év csapadékos időjárása rendkívüli módon kedvezett a *Fusarium* sp. fejlődésének. Hazai viszonyok között az egyik legjelentősebb szántóföldi kórokozó a *Fusarium graminearum*. Hazánkban a trichotecén típusú mikotoxinok fordulnak elő leggyakrabban, közülük a deoxinivalenol (DON) jelenlétét mutatták ki legtöbbször a gabonafélékben. A fuzárium fertőzést és mikotoxin termelődést teljes mértékben sehol sem sikerült még kiküszöbölni, azonban ezek elemzésére speciális analitikai eljárásokat dolgoztak ki. Esetleges ártalmatlanítási módszer lehet a fuzáriummal szennyezett kukorica biogáz alapanyagként való hasznosítása. Bár a fermentáció során a *Fusarium* sp. elpusztul, a DON toxin nem bomlik le, a fermentumban visszamarad, és azt kijuttatva a toxin hatással lehet egyes kultúrnövények csírákéességére.

A dolgozatomban célja az volt, hogy megvizsgáljam a fuzárium mentes és a DON toxinnal szennyezett kukoricát tartalmazó fermentlé csírázásra gyakorolt hatását. Mivel a fermentlé toxin tartalma jelenleg megbízhatóan nem mérhető, ezért kukorica alapú hidrolízis modellkísérletet állítottunk be, amelynél a hidrolizált termékben a toxin már mérhetővé vált, így a kísérleteim során a hidrolizált termék csírázásra gyakorolt hatását is vizsgáltam. A hidrolízis segítségével a biogáz gyártás első szakaszát modelleztük. Vizsgálatokat végeztem továbbá a fuzárium mentes illetve fuzáriummal szennyezett, ezáltal DON toxint tartalmazó kukorica szemtermésének csírázási erejének összehasonlítására. A vizsgálataim során, szobahőmérsékleten tenyészeszedényes csírateszteteket állítottam be, ahol standard kvarchomokot használtam. Az egyes kezelések csírákéességét kontroll százalékában (%) kifejezve vizsgáltam. A csíranövények gyökérhosszait (mm) a kísérlet végén lemértem, valamint a Tukey-féle variancia-analízist használtam az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségek, azaz mikotoxinok csírázásra gyakorolt ökotoxikológiai hatásának kimutatására. A vizsgálataim összegzéseként elmondható, hogy egyértelműen nem igazolható a toxin serkentő vagy gátló hatása, azonban a fermentlében található egyéb anyagok felerősíthették a *Fusarium* sp toxinjának csírázást serkentő hatását.

IRODALOMJEGYZÉK

- ANDRÁSI ZS.- VALKÓ G. 2011.: A hazai mezőgazdaság 2010-es éve számokban (1.) Agrofórum 22. 5. 5-6.p
- BIRÓ GY.-TAMÁS J.-BORBÉLY J.-MÉZES L.-HUNYADI G. (2011): Mikotoxin-termelő *Fusarium* fajok okozta káros környezeti hatások csökkentésének lehetőségei. Acta Agraria Debreceniensis. Megjelenés alatt.
- BÉKÉSI P., HERTELENDY P. 2011. : Visszatekintés az Őszi búza növény betegségeinek 2010. évi alakulására. Agrofórum. 22. 2. 36-37. p.
- BURGESS, L. W.- WEARING, A.H.- TOUSSOUN, T. A.: 1975. Surveys of *Fusaria* associated with crown rot of wheat in eastern Australia. J. Agri.Res.26. 791-799. p.
- DEL FIORE, A.- REVERBERI, M.-RICELLI, A.- PINZARI, F.-SERRANTI, S.- FABBRI, A.A.-BONIFAZI,G.: 2010. Early detection of toxigenic fungi on maize by hyperspectral imaging analyzis. International Journal of Food Microbiology. 144. 64-71.p.
- EIFLER, J.- MARTINELLI, E.- SANTONICO, M.- CAPUANO, R.- SCHILD, D.- DI NATALE, C.: 2011. Differential Detection of Potentially Hazardous *Fusarium* Species in Wheat Grains by an Electronic Nose Plos one. Wei-Chun Chin, University of California, Merced, United States of America.1.p.
- FAZEKAS B.- MOLNAR T.- IVANICS E.- ABONYI T.- GLAVITS R.: 2011. Animal health significance of fusariotoxins in swine and poultry. 1. The results of feed examinations in 2010 Magyar állatorvosok lapja 1.sz. 227-232.p.
- FELFÖLDY L.: 1987. A biológiai vízminősítés (4. javított és bővített kiadás) Vízügyi hidrobiológia 16. Bp. Vízgazdálkodási Intézet. 243-246. p.
- FRANCIS, R.G.- BURGESS, L. W.: 1977. Characteristics of two population of *Fusarium roseum* „Graminearum” in eastern Australia. Trans. Br. Mycol. Soc. 68. 421-427. p.
- GONG, P.- WILKE, B.M.- STROZZI, E.- FLEISCHMANN, S.: 1998. Higher plant seed germination and early seedling growth test: evaluation and refinement for the use in ecotoxicological assessment of soils. Proceedings of the International Symposium on Soil, Human and Environment Interactions. 4–11.p.

- HUIJSMANS, J.F.M.- MOL, R.M.: 1999. A model for ammonia volatilization after surface application and subsequent incorporation of manure on arable land. *J.Agric.Engng.* 74. 73-84.p.
- HORNOK L. 2001.: A biológiai sokszínűség fenntartásának különleges módjai a *Fusarium* nemzettségben. Magyar Tudományos Akadémia 1.p.
- FAZEKAS B.- MOLNAR T.- IVANICS E.- ABONYI T.- GLAVITS R.: 2011. Animal health significance of fusariotoxins in swine and poultry. 1. The results of feed examinations in 2010 Magyar állatorvosok lapja 1.sz. 227-232.p.
- KOVÁCS F. – BÍRÓ G. : 2002. Élelmiszer-biztonság az EU-szabályozás függvényében. Bp. Magyar Tudományos Akadémia. 53-54. p.
- KOVÁCS M.: 2010. Aktualitások a mikotoxin kutatásban. Budapest. Agroinform kiadó. 9.p.
- KÖVICS GY.: 2000. A növénybetegségeket okozó gombák névtára. Mezőgazda Kiadó. Bp. 182. p.
- MESTERHÁZY Á.: 2010. A mikotoxinok táplálékláncból való kiiktatásának lehetőségei, a rezisztencianemesítés, a fajtaelismerés és az agrotechnika területén. Aktualitások a mikotoxin kutatásban. Kaposvár. MTA Állattenyésztési és Állathigiéniai Kutatócsoport. 119-140. p.
- MUDICH A.: 1988. Növényvédelmi mikológia. Agrártudományi Egyetem. Keszthely. 12.p.
- NAGY A. – TAMÁS J.: 2008. Effects of heavy metals on seed germination and root length in mining waste – compost mixtures. *Cereal Research Communications.* 36. 803-807. p.
- NÉMETH J.: 1998. A biológiai vízminősítés módszerei. Bp. Környezetgazdálkodási Intézet. 230-232. p.
- ÖLLŐS G.- OLÁH J.-PALKÓ GY.: 2010. Rothasztás Bp. 24. 32-33.p.
- PETRÓCZI I. 1997.: Növényvédelemtan II. Gödöllői Agrártudományi Egyetem. Gödöllő 85-93. p.
- PLACINTA, C.M.-D'MELLO, J.P.F.-MACDONALD, A.M.C.: 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology.* 78. 1. 21-37. p.
- RADULESCU, E.- NEGRU, A.: 2010. Indrumator pentru determinarea bolilor si daunatorilor la seminje. *Agro-Silvicia.* Bucuresti. 32-33.p.
- RIEPERT, F.- FELGENTREU, D.: 2002. Relevance of soil storage to biomass development, N-mineralisation and microbial activity using the higher plant growth test, ISO 11269-2, for testing of contaminated soils. *Applied Soil Ecology.* 20. 57–68.p.

SÁNDOR A.- MOLNÁR F.: 1999. Szántóföldi növények termesztése és növényvédelme. Agrárszakoktatási Intézet- Dinasztia Kiadó, Bp. 7. 11-12.p.

SOMOSNÉ NAGY A.: 2010. A mezőgazdasági biogáztermelés és a fermentlé hasznosítása. Környezetvédelem. 4. 14-16.p.

SZÉCSI Á.: 1994. A *Fusarium graminearum* izolátumok azonosítása új módszerrel. Növényvédelem 30. 1. p.

SZÉCSI Á.-MESTERHÁZY Á.: 1998. Szelektív táptalaj alkalmazása *Fusariumok* izolálására és azonosítására gabona- és kukoricaszemekből. Növényvédelem. 34. 2. 61-66.p.

Internetes hivatkozások

I1.: <http://www.kfki.hu/chemonet/osztaly/eloadas/mesterhazya.html> 2011.08.19. 11.34 h.

I2.: <http://www.limagraincentraleurope.com/hu/products/products-lg-details.cfm?id=384> 2011. 08. 19. 9.58 h.

I3.: <http://www.fermentek.co.il/vomitoxin.htm> 2011.10.09. 21.54 h.

I4.: <http://phys.bio.u-szeged.hu/DT/elettan/figures/burker2.jpg> 2010.10.09. 22.46 h.

Szabványok, rendeletek

1. 1881/2006/EK RENDELETE az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek
2. ORGANIZATION FOR THE ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) 1984.
3. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USFDA), 1984
4. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA), 1996.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Tamás Jánosnak, a Debreceni Egyetem, Agrár-és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság- Élelmiszertudományi- és Környezetgazdálkodási Kar, Víz- és Környezetgazdálkodási Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított a tanszéken a szakdolgozatom elkészítéséhez.

Külön szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek, Dr. Nagy Attilának, egyetemi tanársegédnek, és Biró Györgyi PhD hallgatónak, akik szaktudásukkal és segítőkészségükkel a diplomadolgozatom elkészítését irányították.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá Dr. Borbély Jánosnak, egyetemi docensnek, és Dr. Mézes Lilinek, egyetemi tanársegédnek, akik a tanácsukkal, illetve segítőkészségükkel segédkeztek diplomadolgozatom elkészítésében.

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Petis Mihálynak, hogy engedélyezte nyírbátori regionális biogáz üzem központi laboratóriumában az ELISA méréseket.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani a Debreceni Egyetem, Agrár-és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság- Élelmiszertudományi- és Környezetgazdálkodási Kar, Víz- és Környezetgazdálkodási Tanszéknek, hogy biztosította a mérésekhez szükséges eszközöket és helyet.

NYILATKOZAT

Gálya Bernadett, büntetőjogi- és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy a diplomadolgozat saját munkám eredménye. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, a diplomadolgozatra vonatkozó jogszabályokat betartottam.

Debrecen, 2011.

.....

aláírás

Születési idő:1987.08.14.