



Élelmiszertudományi Kar

Alkalmazott Kémia Tanszék – Sör-és Szeszipari Tanszék

EGY GYAKRAN HASZNÁLT PESZTICID, A FENHEXAMID HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PROBIOTIKUS LACTOBACILLUS TÖRZSEKRE

TDK Dolgozat

BÉKEFI ESZTER

Biomérnök szak, III. évfolyam



TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005

TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023

Témavezetők: Dr. Dernovics Mihály
egyetemi docens
Bujna Erika
egyetemi tanársegéd

**Budapest
2012**

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	2
1.1. A peszticidek	2
1.2. A fungicidek	4
1.2.1 A fenhexamid	5
1.3. A tejsavbaktériumok és a <i>Lactobacillus</i> nemzetség	8
1.4. A peszticidek baktériumokra gyakorolt nem specifikus hatása	11
1.5. Növényvédőszeres és metabolitjaik meghatározásának analitikai alapjai.....	13
1.6. Az emberi emésztőrendszer működésének modellezése	14
1.7. Célkitűzések	16
2. MŰSZEREK ÉS MÓDSZEREK	17
2.1. Fenhexamid emésztőrendszeri vizsgálata	17
2.1.1. A több enzimre épülő mintaelőkészítés végrehajtása	17
2.1.2. A pronázos mintaelőkészítés végrehajtása	18
2.1.3. Folyadékkromatográfiás mérés (HPLC)	18
2.2. Tejsavbaktériumok vizsgálata fenhexamidot tartalmazó tápközegben	19
2.2.1. Mintaelőkészítés	19
2.2.2. HPLC-UV folyadékkromatográfiás mérés	20
2.2.3. HPLC-ESI-MS/MS folyadékkromatográfiás mérés	21
3. EREDMÉNYEK	22
3.1. A fenhexamid emésztőrendszeri vizsgálatának eredményei	22
3.1.1. HPLC-UV vizsgálati eredmények	22
3.2. A fenhexamidot tartalmazó tápközegben vizsgált tejsavbaktériumok eredményei.....	26
3.2.1. A sejtsűrűség turbidimetriás mérésének eredményei (OD ₆₀₀)	26
3.2.2. A HPLC-UV folyadékkromatográfiás mérés eredményei	27
3.2.3. A HPLC-ESI-MS/MS folyadékkromatográfiás mérés eredményei	30
4. ÖSSZEFOGLALÁS	32
5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	33
6. HIVATKOZOTT IRODALOM.....	34

1. Bevezetés

1.1. A peszticidek

A peszticidek a növénytermesztésben használt, a növények élettartamát és egészségét serkentő vegyszerek. Az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) definíciója szerint minden olyan vegyszer illetve vegyszerkeverék peszticid, amelynek alkalmazásával megszüntetni, kontrollálni vagy megelőzni kívánjuk a kártevőket. A megelőzendő kártevők közé tartoznak az emberei illetve állati betegségek, gyomok vagy más állatok által okozott káros tevékenységek az élelmiszerek, mezőgazdasági termékek és faipari termékek előállítása, tárolása és szállítása során. Ezek mellett a definíció magába foglalja a növény növekedését szabályozó, lombpusztító, szárító és a koraérett gyümölcs lehullását megakadályozó vegyszereket.

Peszticidnek hívjuk azokat az anyagokat is, melyeket állatokon alkalmazunk azok testén illetve testében lévő kártevők szabályozására vagy kiirtására. Ilyen kivédeni kívánt kártevők lehetnek rovarok, növényi kórokozók, mikrobák, gyomok, emlősök, puhatestűek, madarak vagy halak, amelyek károsítják a termést, vagy betegséget terjesztenek (F.A.O., 2003). Napjainkban széles körben elterjedt növényvédő szerek használata a mezőgazdaságban és a háztartások kertjeiben egyaránt, így növelve a betakarított termés mennyiségét és minőségét.

A szerek lehetnek természetes vagy mesterséges eredetűek. Tartalmazhatnak olyan fertőtlenítő illetve antimikrobás hatóanyagokat (például akár vírusokat, baktériumokat), amelyek megakadályozzák a kártevők kialakulását vagy a már meglévő kártevőket életképtelenné teszik.

Annak ellenére, hogy az emberiség számára jelentős hasznót hajtanak a peszticidek, komoly hátrányokkal is számolni kell a használatuk során. A vegyszerek toxikus hatása egyaránt veszélyes lehet mind az emberre, mind pedig az állatokra. Emiatt több országban is betiltották vagy határértékekhez kötötték bizonyos peszticidek használatát, ezzel korlátozva az élővilágot negatívan befolyásoló hatásait. Azonban a mai napig sok vegyszer hosszú távú hatásáról nincs megfelelő mennyiségű információ. Ráadásul a peszticidek emberi szervezetre és a környezetre gyakorolt hatása rendkívül széleskörű és nagyon eltérő lehet az egyes vegyszerekre nézve. Ez elsősorban a peszticid kémiai tulajdonságaitól és az alkalmazott vegyszer koncentrációjától függ.

A peszticidek hatása a természetes vizekben és a talajban is érzékelhető, mivel a permetezett növényekről a fel nem szívódott vegyszer először a talajba majd onnan a talajvízbe kerül. Ennek legnagyobb veszélye, hogy a víz körforgásával a peszticid maradványok felszívódhatnak más növényekbe, valamint bekerülhetnek tavak és folyókba, melyek vizének minősége emiatt jelentősen romlik, és ezzel a környéken élő állatokra szervezetébe is bekerülhet.

A peszticidek emberi szervezetre gyakorolt hatásait három kategóriára osztották fel; az azonnali akut hatásra, a hosszú távú nagy dózisú és a hosszú távú kis dózisú peszticiddel való érintkezés hatásaira (B.C., 2012).

Akut mérgezés esetén a szervezetbe jutott peszticid mennyiségétől függően jelentkezhet a mérgezettnél szédülés, fejfájás, szem- és nyálkahártya irritáció, súlyosabb esetekben tudatzavar, remegés, izomgörcsök, vagy akár eszméletvesztés és a légzés összeomlás is. Akut mérgezéseket főként a permetezőszer alkalmazása során bekövetkező véletlen balesetek okozhatnak (B.C., 2012).

Az emberi szervezet hosszú távú peszticidnek való kitettségének vizsgálatakor tünetek széles skáláját tárták fel, mind a nagy dózisú, mind pedig a kis dózisú szervezetbekerülés esetén.

A peszticidekkel való érintkezés gyermekeknél is okozhat eltérést már egészen kis korban, sőt akár a születés előtt is. Több kutatás is szoros kapcsolatot mutatott ki a szülők peszticiddel való érintkezésének és születési rendellenességek, rendellenes magzatfejlődések és halvaszületések előfordulásának gyakorisága között (Sanborn és mtsai, 2007). Gyermekeknél okozhat légzési rendellenességeket, amelyek az asztma kialakulásához vezethetnek, rendellenes növekedést és neurológiai fejlődést, amely befolyásolja az állóképességüket, a memóriájukat és a koordinációs képességeiket (Jurewicz és Hanke, 2008). Súlyos esetben okozhat gyermekkori agydaganatot, limfómákat, leukémiát és a rák más fajtáit is (Bassil és mtsai, 2007; Sanborn és mtsai, 2007).

A peszticidek hosszú távú hatásának való kitettség felnőtteken, amennyiben kis mennyiségű vegyszernek vannak kitéve, eredményezhet hosszabb reakcióidőt, rosszabb vizuális memóriát és idegességet. Komolyabb mérgezés esetén hasonlóan a gyermekeknél tünetként felléphetnek különböző daganatok és rákos megbetegedések, az idegrendszerben kognitív és pszichomotoros rendellenességek, valamint más neurológiai elváltozások (Eskenazi és mtsai, 1999).

Egy kutatás során, melyben a mezőgazdaságban dolgozó munkavállalók tüneteit vizsgálták, kimutatták, hogy egy akut peszticid mérgezés tünetei rendkívül hosszú távúak, évekkel később is jelentkezhetnek. Ilyen tünetek például a beszéd és figyelembeli zavarok, vizuális memória gyengülése, a finommotoros mozgás sebességének csökkenése. Emellett az alanyoknál depresszió és idegesség jelentkezett, valamint gyakran előfordult zavartság és ingerlékenység is (Eskenazi és mtsai, 1999).

Érdemes megemlíteni, hogy a levegőben nagy felületre szétpermetezett peszticid nagyban hozzájárul a légszennyezéshez. Másik veszélye a peszticidek ilyen módon történő alkalmazásának, hogy az időjárási viszonyoktól függően a peszticid a permetezett terület környezetébe is eljuthat és ott is kifejtheti hatását, amely ebben az esetben negatív lehet. Legtöbbször az ilyen hatás ellen a természetük úgynevezett ütközőzónákat alakítanak ki a permetezni kívánt területek körül, amelyek megakadályozzák a peszticid terjedését (Hall, 1999).

1.2. A fungicidok

A peszticidok csoportosítása többféleképpen történhet: legáltalánosabban az adott peszticid célcsoportja alapján, ennek megfelelően a fő csoportok a fungicidok, a herbicidok, az inszekticidok, a rágcsálóirtók, és a tetűirtók (E.P.A., 2012). A használatban lévő csoportosítások közé tartozik még a halmazállapot és kémiai felépítés alapján történő osztályozás is.

Fungicidoknak a gombairtó és –szabályozó szereket nevezzük (A.P.S., 2012). Világszerte a nagymértékű termés kiesés tulajdonítható a különböző gombáknak, melyek ellen ezek a szerek védelmet nyújtanak, azonban még mindig vannak olyan gomba által okozott betegségek, amelyekre nem jelent megoldást (A.P.S., 2012).

A fungicidok csoportosítása történhet a bennük lévő hatóanyag kémiai tulajdonságai szerint. Ez alapján rendkívül sok csoportot lehet megkülönböztetni, amelyek közül a leggyakoribbak a benzimidazolok, adikarboximidek, az aminok, a ditiokarbamátok, az aromás szénhidrogének, a kéntartalmúak, a strobilinok, az azolok, a karboxianilidek, a réztartalmúak és a probenazolok (Brent és Hollomon, 2007).

A különböző hatóanyagokat használó fungicideknél különböző mértékű a célkórokozók rezisztenciája az adott szerekre. Például a réztartalmú szereknél vagy a ditiokarbamátoknál a kialakuló rezisztencia mértéke elenyésző, annak ellenére, hogy már sok éve használatban vannak. Ezzel szemben más típusoknál, például a benzimidazoloknál és a strobilinoknál igen gyakori a célorganizmus rezisztenciájának kialakulása, ami a bevezetést követő 2-10 év alatt alakult ki (Brent és Hollomon, 2007).

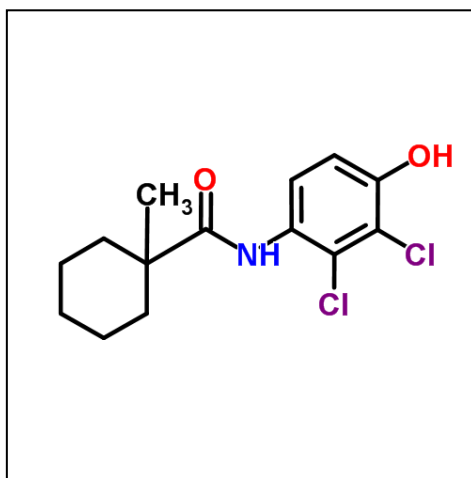
Az emberi fogyasztásra termesztett növényeknél sok esetben a fogyasztás során fungicidmaradványok kerülhetnek az emberi szervezetbe, főleg olyan növényeknél, ahol betakarítás utáni vegyszert alkalmaztak. A maradványok jelenlétére szigorú határértékek vonatkoznak, a fungicidok toxikus tulajdonsága miatt. Amíg a mezőgazdaságban felhasznált fungicidok káros hatással lehetnek az emberi szervezetre, addig a gyógyászatban számos olyan fungicid létezik, amelyeket az emberi gombás fertőzések kezelésére használnak.

Környezeti szempontból a fungicid várható hatásait sokszor igen körültekintően át kell gondolni és meg kell tervezni, mivel a vegyszerek a környezeti és időjárási tényezők miatt a kezelni kívánt célfelülettől eltérő területeket is elérhet, ezzel hatást gyakorolva a kezelt növény környezetében lévő állatokra, talajra, vízre és levegőre.

1.2.1 A fenhexamid

A fenhexamid, azaz a 2,3-diklór-4-hidroxi-1-metilciklohexakarboxianilid (1. ábra), a hidroxianilid fungicidek közé tartozik. Napjainkban az egyik legelterjedtebb permetezőszer a *Botrytis* fajokhoz kötődő szürkepenészes és monília rothadás megakadályozására. Évekig tartó kísérletek és vizsgálatok után a vegyszert a Bayer CropScience cég 1998-ban hozta forgalomba. A világ számos országában regisztráltan alkalmazható zöldségek és más növények védelmének érdekében, Európában Teldor®, Ázsiába Password®, Amerikában pedig Elevate® néven. Használata a szőlő, szamóca, málna, citrusfélék, uborka, saláta, paradicsom, meggy és őszibarack termesztése során a legjellemzőbb (Anderson és mtsai, 1999).

A fenhexamid alkalmazásával elkerülhető más termékekkel szembeni keresztrezisztencia kialakulása, valamint a kutatások eredményeként kiderült, hogy gátolja a szürkepenész ergoszterol termelését, amely koleszterolhoz hasonló szerepet tölt be a gomba sejtjeiben. Ezt a hatást ugyan más gombák ellen alkalmazott permetszerekkel már elérték, de a szürkepenész ellen egyedül a fenhexamid rendelkezik ilyen hatással. A termesztők számára rendkívül imponáló előnyei közül kiemelendő, hogy hatás hosszú távú (Bayer, 2012).



1. ábra. A fenhexamid molekulaszervezete

Az egyes növényeknél eltér az alkalmazásra javasolt időszak. A szőlőnél a fűtzáródás előtt és az érés időszakában megelőző jelleggel kell felhasználni. A meggy és őszibarack esetében közvetlenül a termés érése előtt alkalmazandó. Paradicsomra történő alkalmazáskor a virágzási és bogyónövekedési időszakban kell kezelni a növényeket. Szamócában és málnában a virágzás és termésnövekedés időszakában kell permetezni. A saláta esetében ajánlott már egészen a palántavetés kezdetétől használni a szert, az uborkában a hajtásnövekedés idején (Farmit, 2012).

Az Európai Bizottság a szer vizsgálatának eredményét 2008 júliusában adta ki, amelyben engedélyt adott az Unión belüli használatra (E.U., 2010). Széleskörű vizsgálatot végeztek a szer

növényekre, állatokra és az emberre gyakorolt hatásait kutatva. Megállapították, hogy a fenhexamid csak elenyésző mértékben mérgező, szemmel illetve bőrrel érintkezve nem okoz irritációt, nem karcinogén (F.A.O., 2005).

Az EFSA, az Európai Unió hatályos szerveként, 2010-ben határozta meg a fenhexamidra vonatkozó legfrissebb egészségügyi határértéket. A határérték felülvizsgálatára egyrészt egy Belgium által benyújtott indítvány miatt került sor, melyben az ország a fenhexamid maximális maradékanyag szintjének 30 mg/kg-ról 40 mg/kg-ra kívánta emelni a salátafélékben (E.F.S.A., 2010/1). A vizsgálat során a méréseket a salátaféléken kívül kiterjesztették más vetésforgóban termelt gabonafélékre is.

A vonatkozó határértéket a hagyma esetében is felülvizsgálták, a gyártó cég kérésére. Az indítványban a Bayer Crop Science az akkor hatályos 0,05 mg/kg maximális maradványszint emelését 1 mg/kg-ra kívánta megváltoztatni. A vizsgálatok során három termésfajtát vizsgáltak, gyümölcsöket és termő zöldségeket, leveles zöldségeket és magokat. A vizsgálatok eredményeként a maximális maradványszintet a kért 1 mg/kg-os szinttel ellentétben 0,6 mg/kg felső értékkel határozták meg (E.F.S.A., 2010/2).

A mérések kiterjedtek a fenhexamid és maradványainak a növényekre, állatokra, a környezetre és a fogyasztókra gyakorolt hatásaira is. A mérési eredmények szerint nem volt felfedezhető sem a salátafélékben, sem pedig a többi vizsgált növényben jelentős fenhexamid felhalmozódás, valamint a fogyasztókra gyakorolt hatása sem jelentős, az intenzív fenhexamid használat a terményeken nem okozza a toxikológiai referenciaérték átlépését. A vizsgálatok a maximális maradványszintet 40 mg/kg-nál állapították meg, az elfogadható napi bevitel szintje pedig 0,2 mg/kg testsúly/nap (E.F.S.A., 2010/1; E.F.S.A., 2010/2).

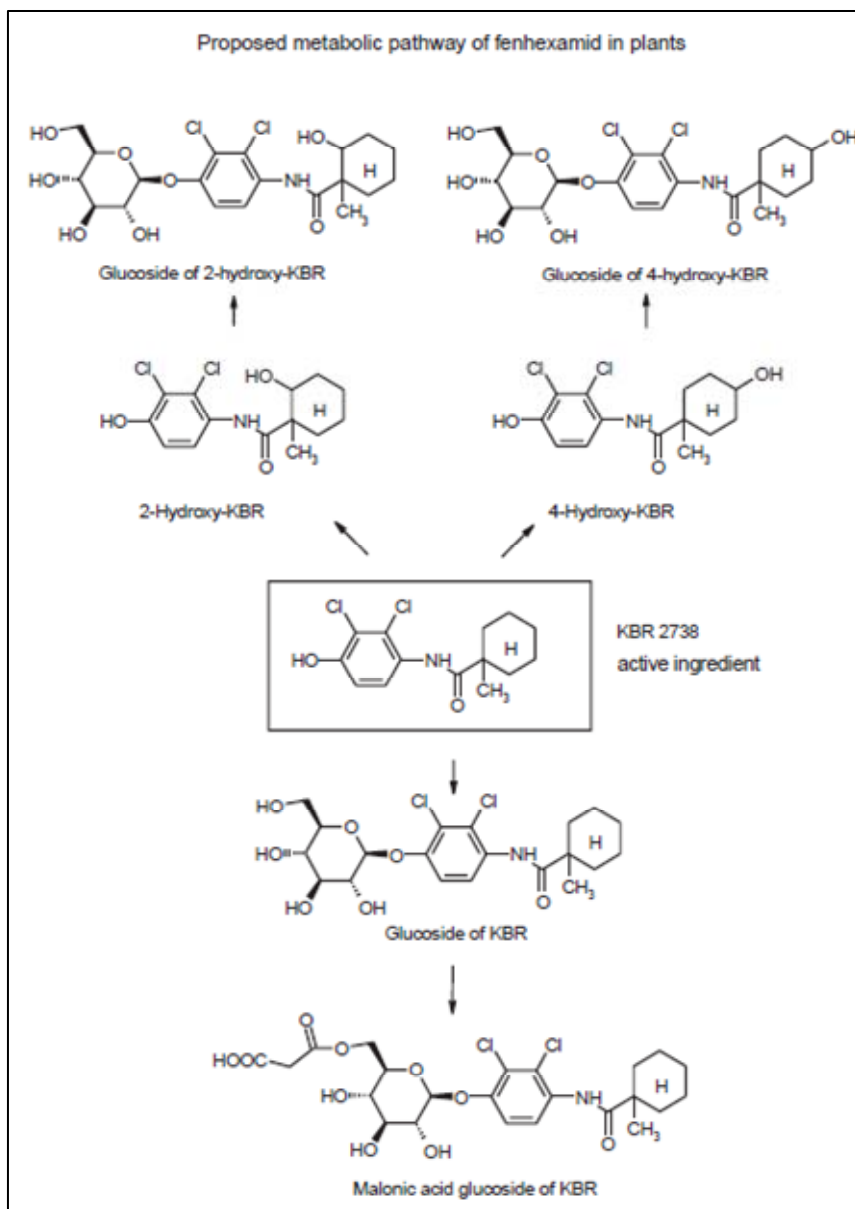
A fenhexamid növényekben történő átalakulásának két útja lehetséges (2. ábra). Ez a vizsgálatok szerint az összes növényben hasonlóképp történik meg. Az átalakulás a kiválasztást segíti, egyfajta detoxikációs útvonal révén, és nem bomlásban ölt testet, mivel kifejezett lebontási folyamatot a vizsgált növények esetén legfeljebb 10%-os mértékben észleltek.

Az átalakulás-detoxikáció egyik módja, hogy az aromás hexángyűrűhöz a 2. vagy a 4. szénatomhoz egy hidroxil csoport kapcsolódik, majd ebből glikozid melléktermék képződik. A másik mód pedig az oxidáció kíséretében történő glikozidképződés (F.A.O., 2005).

Az állati szervezetben történő bomlás során a kecske és a patkány szervezetére gyakorolt hatást vizsgálták (Anderson és mtsai, 1999; Byrnes, 2001; F.A.O., 2005; J.M.P.R., 2005). A kutatásokból kiderült, hogy a kecske szervezetében nem találtak hidroxifenhexamidhoz kapcsolódó szulfátszármazékot, a patkányéban viszont kimutatható volt. A kecske szervezetében a fenhexamid kimutatható volt az izmokban, a vesében és a zsírban, de a tejbe nem került a vegyületből. A

legjellemzőbb származék a 4-hidroxi-fenhexamid volt, amit már a tejben is kimutattak (F.A.O., 2005).

Több vizsgálatot is végeztek a fenhexamid környezeti hatásainak felderítésére. A fenhexamid talajban való viselkedésének kutatása során kiderült, hogy viszonylag hamar, kevesebb, mint egy nap alatt lebomlik az aktív összetevő fele. Többféle bomlástermék is keletkezik kis koncentrációban (Anderson és mtsai, 1999).



2. ábra. A fenhexamid detoxikációs folyamata növényekben
(forrás: Anderson és mtsai, 1999)

A hidrolízisre vonatkozó vizsgálatok kimutatták, hogy a fenhexamid a természetes állapothoz közeli kémhatású környezetben stabil marad a hidrolízis során (Anderson és mtsai, 1999; F.A.O., 2005).

A természetes vizekben folytatott vizsgálatok során kiderült, hogy a fenhexamid bomlása közben számos melléktermék keletkezik, de ezek koncentrációja nem jelentős. A melléktermékek keletkezésének egyik útja az aromás gyűrűn lévő hidroxilcsoport kapcsolódása egy metilcsoporttal, a keletkezett vegyületek másik fő csoportja a fenhexamid szulfonszármazékai voltak (Anderson és mtsai, 1999).

Bár a fenhexamidban – ahogy a neve is árulkodik róla – amid kötés és fenolos hidroxilcsoport is található, a vegyület részben a telített gyűrű miatt vízben gyakorlatilag nem oldódik, szerves oldószerben (etanol, acetonitril) azonban korlátlanul oldható. A kereskedelmi forgalomban kapható készítményekben (permetezőszerekben) külön meg nem nevezett emulgeálószerrel együtt alakítanak ki vízben oldódó kiszerelést.

1.3. A tejsavbaktériumok és a *Lactobacillus* nemzetség

A tejsavbaktérium az összefoglaló neve azoknak a baktériumnemzetségeknek, amelyek Gram-pozitívak, fakultatív aerob anyagcseréjűek, jól tolerálják a savas kémhatású környezetet, így sok más baktériummal ellentétben alkalmazhatóak fermentációnál, melynek során cukrokat alakítanak tejsavvá. Ez a tulajdonság rendkívül fontos szerephez juttatja őket az emberi szervezetben, valamint az élelmiszergyártásban is. A tejsavbaktériumok csoportjába tartoznak, jelenlegi besorolás szerint, a *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* és *Weisella* nemzetségek (Todar, 2012a).

Mivel a szénhidrátok bontásából nyernek energiát, valamint csak korlátozott mértékben képesek a számukra szükséges alkotók szintetizálására, nagy szénhidráttartalmú, aminosavban és vitaminokban gazdag táptalajt igényelnek a növekedéshez. A természetben a legtöbbször különállóan vagy más állatokkal szimbiózisban élnek, de van közöttük opportunista patogén is, ilyen például a *Streptococcus pneumoniae* is, amelyek okozhatnak torokgyulladást, tüdőgyulladást és akár gennyes fertőzéseket (Todar, 2012a).

A *Lactobacillus* nemzetség rendkívül változatos biokémiai és fiziológiai tulajdonsággal rendelkező baktériumokat foglal magába. A nemzetséget a benne lévő baktériumok anyagcseréje alapján három fő csoportra osztották. Az első csoportba tartoznak azok a obligát homofermentatív fajok, amelyek a fermentáció során a glükózt tejsavvá bontják. Növekedésükhöz 45°C körüli

hőmérséklet a legmegfelelőbb, 15°C alatt nem növekednek. A második csoport tagjai fakultatív heterofermentatívak, a kisebb, 15°C körüli hőmérsékletet kedvelik. Oxigén jelenlétében aerob fermentációra is képesek. A harmadik csoportban található baktériumok heterofermentatívak: a glükóz bontása során szén-dioxidot, valamint tejsavat, ecetsavat és etanolt (ez utóbbi három vegyületet változó arányban) termelnek (Todar, 2012a). A laktózt a baktériumok az általuk termelt β -galaktozidáz enzim segítségével bontják le.

A *Lactobacillus* nemzetség volt az első olyan mikroorganizmus csoport a baktériumok közül, amelyeket élelmiszer előállításra és minőségének megőrzésére tudatosan használtak (Bernardeau és mtsai, 2006). A élelmiszeriparban széles körben használják őket:

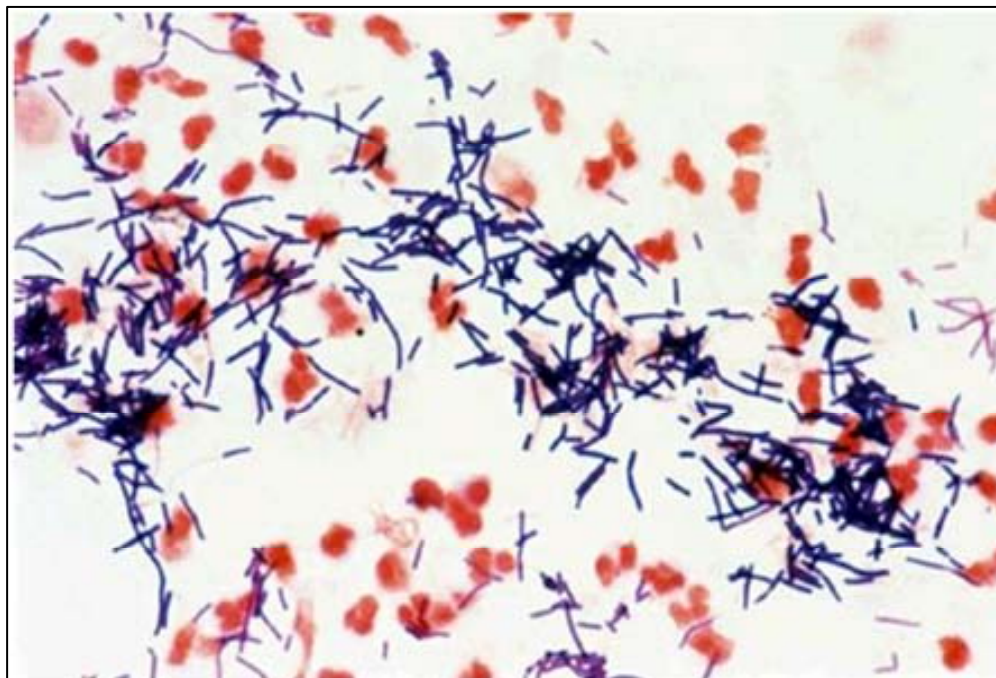
- A tejtermékek gyártásánál a megfelelő íz, fiziko-kémiai, és reológiai jellemzők elérésében ill. a mikroflóra kialakításában vesznek részt.
- *Lactobacillus* fajokat használnak az ún. gyorsérlelt hústermékek gyártásánál, mivel a tejsav előállítása révén, a környezet kémhatásának csökkentésével segítenek visszaszorítani a kórokozó baktériumok elszaporodását az előállított élelmiszerben (Martini és mtsai, 1991; Todar, 2012b).
- A fermentált zöldségfélék gyártástechnológiája /pl. a savanyúkáposzta és más, nem ecetsavval savanyított savanyúságok készítése/ nagy mértékben *Lactobacillus* fajokra épül.
- A borkészítésben a *Lactobacillus* fajok az almasav és a borkősav bontásában játszanak szerepet.

A *Lactobacillus*ok számos fontos szerepet töltenek be az emberi szervezetben is. A gyomorban kis számban találhatóak meg, a savas kémhatású környezet miatt. Legnagyobb részük a bélrendszerben gyülemlik fel, ahová a fogyasztott fermentált táplálékokból, a szájüregből és más közelebbi emésztőrendszeri szakaszokból kerülnek (Walter, 2008).

A *Lactobacillus* fajok széles körben ismertek probiotikus, egészségmegőrző hatásaikról, ezért sok kutatás irányult a működésük vizsgálatára. Bizonyossá vált, hogy a szervezet természetes baktériumháztartásának felborulása összefüggésbe hozható egyes betegségekkel, például gyulladásos bélbetegségekkel, a vastagbélrákkal vagy akár az elhízással és különböző allergiákkal. Ezen elváltozások kezelésében a probiotikus hatással rendelkező *Lactobacillus* fajok segítséget jelenthetnek (Walter, 2008).

Fontos szerepet játszanak az bélrendszerben történő emésztés folyamán is, ahol enyhén savas környezetet biztosítva segítenek visszaszorítani a káros mikroorganizmusok elterjedését, valamint az emésztésben résztvevő enzimeket termelnek. Befolyásolják még a szervezet koleszterolszintjét, valamint normalizálják a bélmozgást (E.M.B.L._01, 2012).

A *Lactobacillus acidophilus* (3. ábra) a lactobacillusok első csoportjának tagja. Az emberi szervezet egyik legismertebb bélflórát alkotó baktériuma. A *Lactobacillus acidophilus* szerepet játszik a *Candida* fertőzések visszaszorításában, mivel a betegséget okozó gomba, a *Candida albicans* növekedését gátolja (E.M.B.L._01, 2012).



3. ábra. *Lactobacillus acidophilus* (Internet_01, 2012)

A baktérium a szájban is megtalálható, ahol amiláz enzimet termel, de egyúttal patogén hatást is kifejt az emberi szervezetre. A bekerülő ételtörmelékből származó fehérjékkal lepedéket alkot, amely a könnyen emészthető táplálékból savat képez. Ez a sav a fogban lévő kalcium oldódásához és ezzel együtt a fogzománc eltűnéséhez vezethet, ami fogszuvasodáshoz vezet (E.M.B.L._01, 2012).

A *Lactobacillus plantarum* nemzetség anyagcsere szempontjából történő csoportosításánál, a második, azaz fakultatív heterofermentatív csoportba tartozik. Számos helyen találkozhatunk vele, például a tejben, húsokban és különböző növényekben. A baktériumnak rendkívül sokoldalú tulajdonságai vannak, mivel ez a faj rendelkezik a tejsavbaktériumok közül az egyik legnagyobb genommal (Kleerebezem és mtsai, 2003). A *Lactobacillus acidophilus*-hoz hasonlóan megtalálható az emberi bélflórában és a szájban is. Elsőként az emberi nyálból sikerült kinyerni a baktériumot. Egyik egyedi tulajdonsága, hogy képes folyékonyra tenni a zselatint. Emellett a baktérium fontos szerepet játszik a mezőgazdaságban, mivel a takarmányozásra használt szilázs előállításánál ezt a fajt használják a leggyakrabban (E.M.B.L._02, 2012).

A *Lactobacillus casei* a lactobacillusok második csoportjába tartozik. A nemzetségbe tartozó fajok közül ennek a baktérium képes megélni a legszélesebb kémhatású és hőmérsékleti viszonyok mellett. Az emberi szervezetben egyik fontos szerepe a *Lactobacillus acidophilus* növekedésének elősegítése, valamint fontos tulajdonsága, hogy gátolja az emésztőrendszerben egyes humánpatogén *Escherichia coli* fajok elterjedését (Ingrassia és mtsai, 2005).

A *Lactobacillus casei*-t leggyakrabban az élelmiszeriparban és az egészségügyben alkalmazzák, probiotikumként valamint számos tejtermék előállításánál. Jelentős szerepet játszik a sajtgyártásban, ahol a fermentációnál gyorsabb és intenzívebb íz elérésére használják, valamint sok joghurtban megtalálható.

A *Lactobacillus rhamnosus*-t először a *Lactobacillus casei* egyik fajaként ismerték, de egy genetikai vizsgálat kimutatta, hogy valójában önálló mikrobafaj (Collins és mtsai, 1989). A baktérium a lactobacillusok második csoportjába tartozik. Az emberi szervezetben elősegíti az emésztőrendszerben lévő bélflóra egyensúlyának megtartását, ugyanakkor kutatások azt is bizonyították, hogy gyermekeknél megnövelheti egyes légúti fertőzések kialakulásának kockázatát (Villena és mtsai, 2012).

1.4. A peszticidek baktériumokra gyakorolt nem specifikus hatása

Minden olyan környezetre gyakorolt hatás, amely reakciót vált ki az abban élő szervezetekből, stresszhatásként értelmezhető. Ezek a stresszhatások lehetnek élettelen vagy élő tényező által okozott változás. A stresszhatások közé sorolandók az ember által okozott génmanipulációs és xenobiotikus tényezők, amely csoportba beletartoznak a peszticidek környezetre gyakorolt hatásai is (Clair és mtsai, 2012).

A peszticidek a termésmennyiség és –minőség növelő hatásuk miatt széleskörűen alkalmazottá váltak a mezőgazdaságban és az élelmiszeriparban. Ebből fakadóan egyre nagyobb kockázatot jelentenek a növényekben és az élelmiszerekben megmaradt peszticidmaradványok, amelyek nem megfelelő gyártási folyamatok során könnyen kapcsolatba kerülhetnek a termékek mikroflórájával és kölcsönhatásba léphetnek azokkal. (Abou-Arab, 2002).

Több kutatás is kimutatta, hogy az élelmiszeriparban, például a tejtermékek és a húsok gyártásánál, a felhasznált mikrobákra hatással vannak a környezetükbe kerülő peszticidek és azok származékai. Az élelmiszerekben előforduló gyakori tejsavbaktériumok vizsgálatakor látható volt, hogy a felhasznált peszticidek ugyan különböző mértékben, de a legtöbb esetben gátolták a vizsgált baktériumok fejlődését és hatással voltak az anyagcseréjükre is. A vizsgálat során külön mérték a fungicidek, a herbicidek és a rovarirtók által okozott eltéréseket. A legnagyobb növekedés gátló hatást a rovarirtók fejtették ki, a legkevésbé pedig a fungicidek voltak hatással a vizsgált törzsekre.

A tejsavbaktériumok sejtjeinél morfológiai változás nem volt megfigyelhető (Ayana és mtsai, 2011; Clair és mtsai, 2012).

A növekedés gátlása mellett a peszticidek másik fontos hatása a baktériumok savtermelésének befolyásolása, amely vagy a termelt sav mennyiségének csökkenésében, vagy pedig a végtermék változásában nyilvánult meg (Ayana és mtsai, 2011). A növekedési vizsgálat eredményéhez hasonlóan szintén a rovarirtók befolyásolták a legjobban a baktériumok savtermelését, a fungicidek pedig a legkevésbé.

A peszticidek mikrobákra gyakorolt hatása mellett megfigyelhető, hogy a mikrobák is átalakíthatják a peszticidek hatásmechanizmusát és azok képződő bomlástermékeit. A húsiparban használt tejsavbaktériumok peszticidekre gyakorolt hatása során tapasztalták, hogy a baktériumok a környezetükben található peszticideket lebontották (Abou-Arab, 2002). Ez pozitívan befolyásolta a termék minőségét, mivel a toxicitása csökkent. A tejtermékeknel is a mikrobák hasonló hatást fejtettek ki a peszticidekre. Egy kedvelt sajtfajta előállításánál végzett mérések azt az eredményt mutatták, hogy amennyiben peszticiddel szennyezett tejet használnak az elkészítéshez, a sajtf fermentációnál résztvevő baktériumok lebontják a megtalálható peszticidek egy részét, így csökkentve a toxicitást. A vizsgálat azt is kimutatta, hogy a peszticidek koncentrációjában a legnagyobb csökkenés a sajt érlelési időszaka alatt következett be. Ezt a hatást az érlelést végző mikroorganizmusok bontásának tulajdonították (Abou-Arab, 1997).

Meglepő módon a peszticid határértékek megállapításánál azok emberi bélflórára mutatott hatását ritkán vizsgálják. Jellemzően a peszticid vizsgálata során a peszticid bomlástermékeinek azonosítása, felhalmozódása, általában a vizsgált rendszerekre mutatott direkt (mutagén, karcinogén, teratogén) hatása kerül górcső alá. Az, hogy a peszticidek hogyan hatnak az emberi bélflórára és hogy ezen keresztül hogyan befolyásolják annak működését, csak napjainkban került előtérbe.

Ennek egy, az elmúlt években előkerült megfigyelés adott zöld utat, miszerint az emberi mikroflóra mind a sejtszámban, mind a kimutatható metabolomikai aktivitása (például enzimek típusa és mennyisége) több nagyságrenddel haladja meg az emberi sejtek számát és a máj aktivitását (Possemiers és mtsai, 2009). Az elmúlt évtizedben ismertté vált az a tény is, hogy számos gyógyszerből vagy élelmiszerből származó komponens aktivitása, felszívódása, biológiai hozzáférhetősége és egyáltalán hasznossága megítélhetetlen az adott személy mikroflórájának ismerete nélkül.

Ezek után meglepő, hogy viszonylag kis számú közlemény foglalkozik a peszticidek bélflórára gyakorolt hatásával. Jellemző, hogy a „gastrointestinal”, „pesticide” és a „microbial” szóra metszetként, article title, abstract keywords szűkítéssel, a Scopus kereső összesen 14 találatot ad ki. Bár a legelső közlemény tudomásunk szerint 1968-ból származik és az akkor elterjedt DDT

permetszer patkány bélflórájára gyakorolt hatását vizsgálja (Braunberg és Beck, 1968), a mai napig nem érkezett rá hivatkozás. Ugyancsak a jelentős visszhang nélkül maradt egy 1982-es közlemény, amely a peszticid hatását vizsgálta a méhek mikroflórájára (Drobnikova és Bacilek, 1982). Valamivel több közlemény foglalkozik azokkal a mikrobákkal, amelyeket a teljes bélflórától elkülönítve is szoktak vizsgálni, mint például a lactobacillusokkal (Ayana és mtsai, 2011; Cabras és mtsai, 1999; Clair és mtsai, 2012).

1.5. Növényvédőszerek és metabolitjaik meghatározásának analitikai alapjai

Az Európai Unióban jelenleg közel 1300 különböző, növényvédőszerként alkalmazható vegyület kapható kereskedelmi forgalomban önmagában vagy ún. peszticid-koktélokban, a felhasználási céltól függően kialakított formulázásban és kiserelésben. (E.U., 2012) A gépesített növényvédelmi folyamatok révén a fejlett nyugat-európai gazdaságokban már nem csupán a szabadföldi termesztésben, hanem a konyhakertészeti terményeknél is gyakorlatilag automatikusan, sokszor előzetes kártevő felmérés nélkül, a peszticidek egészségügyi várakozási idejével optimált módon zajlik a permetezési / kártevőmentesítési folyamat. Ennek következtében az intenzív termelésből származó gyümölcsök és zöldségekben teljesen megszokott, hogy peszticidek és azok metabolitjainak tucatjai vannak jelen, többnyire az egyenként megállapított maximális határértékeknél /MRL, maximum residue limit/ kisebb mennyiségben.

E folyamat egyenes következménye, hogy a peszticidek minőségi és mennyiségi meghatározására kialakított mintaelőkészítési és mérési szabványok / előírások ún. multi-komponenses eljárásokat követnek. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy lehetőség szerint egy bizonyos mintaelőkészítés után legfeljebb két mérési eljárással, legfeljebb két mérési lépésben lehessen több száz peszticidet meghatározni. Nyilvánvaló, hogy az ilyen, viszonylag gyors eljárások kompromisszumokkal terheltek, azonban a gyors reagálás igénye és az elvárt, viszonylag kis költségű módszerek alkalmazása megkerülhetetlen.

Mintaelőkészítés terén komplex élelmiszerminták esetén az ún. QUECHERS technológia használata terjedt el, amely acetonitril alapú extrakciós eljárásra épül (Lehotay és mtsai, 2010), míg nem illékony és illékonyra nem tehető peszticidek esetén a mérés technika ma szinte kizárólag HPLC-ESI-MS rendszereket igényel (Kmellár és mtsai, 2010).

1.6. Az emberi emésztőrendszer működésének modellezése

Az utóbbi években számos, az emberi vagy állati emésztést szimuláló rendszert fejlesztettek ki. Az *in vitro* rendszerek egyik jelentős előnye az *in vivo* megfigyelésekkel szemben, hogy rendkívül sok időt megtakarítanak a vizsgálat során, ezzel hasznos alternatívát nyújtva az élelmiszerek vizsgálatában is. Az állati és emberi emésztés ugyanakkor rendkívül összetett folyamat, ezért a mesterséges rendszerek nagy hátránya, hogy soha nem lesznek képesek teljes pontossággal reprodukálni a folyamatot, így mindig kompromisszumot kell találni a vizsgálat gyorsasága és modellezés mértékének illeszkedése között (Hur és mtsai, 2011; Oomen és mtsai, 2003).

Az emésztést szimuláló rendszerek két csoportra oszthatók: az egy szakaszos modellekre és a több szakaszos, összetett modellekre (McClements és Li, 2010). A használni kívánt mesterséges emésztőrendszert mindig annak megfelelően választják ki, hogy milyen élelmiszer emésztési folyamatát kívánják vizsgálni vele – pl. lipideknél lipázt, fehérjéknél proteázt, keményítő esetében pedig amilázt alkalmaznak (Hur és mtsai, 2011).

Az egy szakaszos modell esetén az emésztőrendszer egy adott szakaszát szimulálják, és ennek megfelelően választják ki a vizsgálatához szükséges enzimeket és állítják be a környezeti paramétereket (McClements és Li, 2010). Összetett emésztési vizsgálat esetén az emésztőrendszer több egymást követő szakaszát vizsgálják, ezért több enzimből álló rendszert hoznak létre (McClements és Li, 2010). Az alkalmazott enzimeket azonban nem egyszerre, hanem fokozatosan adják a rendszerhez, így szimulálva az emésztés különböző szakaszait. Az egyes részek inkubációs ideje azonos kell legyen a természetes emésztési szakasz hosszával (Hur és mtsai, 2011).

A leggyakrabban használt enzimek és kísérőkomponenseik közé tartozik a pepszin, a pankreatin, a tripszin, a kimotripszin, a peptidázok, az α -amiláz, az epesó és a mucin. A vizsgálatoknál alkalmazott emésztőenzimeket mindenevő emlősök szervezetéből nyerik ki, például patkányokból vagy sertésekből, de sok esetben fordul elő, hogy önkéntesek által emberi szervezetből jutnak a szükséges enzimekhez. Amennyiben nincs szükség az enzimek egyedi vizsgálatára, az egyes fehérjebontó enzimek helyett a bakteriális eredetű fehérjebontó enzimkeveréket, az ún. pronáz enzimet is lehet használni, amely gyakorlatilag a *Streptomyces griseus* által termelt enzimkeverék. Az összetett emésztési rendszerekhez nem elég kizárólag az emésztőenzimek hozzáadása, mindenképp biztosítani kell azokat a kiegészítő összetevőket, amelyek az enzimek optimális működéséhez feltétlenül szükségesek (Hur és mtsai, 2011).

A mesterséges emésztőrendszerek másik csoportosítása szerint a rendszerek lehetnek statikusak és dinamikusak. A statikus rendszerekre jellemző, hogy a vizsgálat során a természetes emésztés fizikai jelenségei, például az idővel változó paraméterek és a keverés folyamata nem kerülnek reprodukálásra, valamint a keletkezett emésztés termékei a rendszerben maradnak a folyamat során. Ezeket a modelleket akkor alkalmazzák, ha a vizsgálni kívánt anyagok előzetesen kinyert, tiszta tápanyagok vagy egyszerű élelmiszerek.

A rendszer rendkívül hasznos a kevésbé összetett emésztési folyamatok, például a gyomor emésztő folyamatainak vizsgálatánál, összetett vagy teljes emésztési kísérlet lebonyolítására azonban nem célszerű használni. A gyomor folyamatainak vizsgálatánál a rendszer a táplálék homogenizálását, a sósav és a járulékos emésztőenzimek időben eltoltt hozzáadását tartalmazza, ezzel szimulálva az egymást követő emésztési szakaszokat. Ezt követi a nátrium-hidroxiddal vagy nátrium-karbonáttal való semlegesítés, végül pedig a hasnyálmirigy enzimek és az epesavak hozzáadása (Wickham és mtsai, 2009).

Mivel a teljes emésztési folyamat sokkal összetettebb a gyomorban és a vékonybélben lezajlott emésztésnél, olyan rendszer alkalmazására lehet szükség, amely sokkal részletesebben modellezi a folyamatot. A dinamikus emésztőrendszert szimuláló modellek alkalmasak az ilyen komplex vizsgálatok elvégzésére.

A modellnél már valódi, összetett élelmiszerekkel való mérések lebonyolítása is lehetséges, mivel a természetes emésztőrendszer fizikai jelenségeit is megjeleníti. A statikus modellel ellentétben az emésztés során keletkezett termékeket el lehet távolítani a rendszerből. A rendszer nagyon jól használható olyan modelleknél, ahol az emésztett tápanyag viszkozitása, részecskemérete változik, valamint olyan hatásokat is figyelembe vesz, mint a diffúzió, a kolloidfázisok keletkezése és az emésztési szakaszok közötti tápanyagmegoszlás (Wickham és mtsai, 2009). Napjainkban a legfejlettebb mesterséges emésztést szimuláló rendszer a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME; 4. ábra). Ezzel a reaktorról az emésztőrendszer mikrobiális felépítésének fenntartása akár több hónapon át is lehetséges (Molly és mtsai, 1994).



4. ábra. A SHIME rendszer (Internet_02, 2012)

A rendszer öt szakaszból áll: az egyes szakaszok a gyomor, a vékonybél, valamint a vastagbél felszálló, haránt és leszálló szakaszában lejátszódó folyamatokat reprodukálják. Az első két szakaszt folyamatosan feltöltik és ürítik, míg a maradék három szakasz folyamatos keverés alatt áll, összesen 76 órán keresztül (De Boever és mtsai, 2000). A rendszer lehetővé teszi, hogy a természetes emésztésnél fellépő paraméterek a lehető legpontosabban beállítását és az folyamatos szabályozását.

1.7. Célkitűzések

A vizsgálatainkat megelőző szakirodalmi kutatás során nem találtunk arra vonatkozó információt, hogy a fenhexamid, mint az egyik legelterjedtebb és viszonylag nagy (akár 40 mg/kg) maximális maradványértékkel rendelkező fungicid hogyan viselkedik az emberi szervezetben és milyen hatással lehet a probiotikumként is alkalmazott *Lactobacillus* nemzetségre. Emiatt vizsgálatunk egyik célja az volt, hogy egyszerű *in vitro* módszerrel megállapítsuk, ez a fungicid bomlás nélkül túljuthat-e a gyomor és a vékonybél szakaszain, ill. amennyiben a vizsgált fungicid az emberi emésztőrendszerbe kerül, képes-e bármilyen hatást gyakorolni az ott található probiotikus hatású lactobacillusokra.

2. Műszerek és módszerek

2.1. Fenhexamid emésztőrendszeri vizsgálata

A fenhexamid emberi emésztés során történő felszívódásának vizsgálatakor első lépésben kétfajta módszer került összehasonlításra. Az első módszernél az alkalmazott enzimek a pepszin, az epesó, a tripszin és az α -amiláz voltak, amelyekkel a gyomor és a vékonybél emésztését modelleztem, míg a második módszernél a pronázt, mint általános fehérjebontó enzimet használtuk. Minden kísérletnél kétszer desztillált vagy ioncserélt vizet alkalmaztunk.

A vizsgálat ezen szakaszában az alkalmazott fenhexamid forrása a hazánkban kereskedelmi forgalomban megvásárolható Teldor® permetezőszer volt, amelynek a gyártmánylap szerint 43 m/m %-a fenhexamid. A felhasznált enzimek közül a pronáz (4000000 PU/g) a Merck cég, a pepszin (452 U/mg), az epesó, az α -amiláz (30800 U/ml) és a tripszin (1645 U/mg) a Sigma-Aldrich cég (St. Louis, MO, USA) terméke volt.

A mérés során felhasznált vegyszerek közül a hangyasav, a nátrium-klorid, a nátrium-hidroxid, az etanol és a TRIS puffer a Reanal (Budapest) cégtől, az acetonitril pedig a Fisher Scientific (VWR, Radnor, PA, USA) cégtől származott.

A vizsgálatok során használt ultrahangos roncsoló a Hielscher cég (Teltow, Németország) UP100H típusú készüléke, az alkalmazott centrifuga a Hettich cég (Tuttligen, Németország) Mikro 22 R típusú készüléke volt.

2.1.1. *A több enzimre épülő mintaelőkészítés végrehajtása*

A mintaelőkészítések menete Kápolna és Fodor (Kápolna és Fodor, 2007) közleménye alapján került kidolgozásra. Minden vizsgálatot két párhuzamos méréssel hajtottuk végre.

A vizsgálatához 60,0 mg pepszin és 7,0 mg Teldor készítményt (egyenértékű 3,0 mg fenhexamiddal) mértünk be egy 15,0 ml térfogatú zárható műanyag centrifugacsőbe. Ehhez 4,0 ml térfogatú, 0,01 M sósavat (pH=2,0) és 0,15 M NaCl-t tartalmazó oldatot adtunk, majd az oldatot alapos keverés után 3 órára 37 °C-on rázógépbbe (180 1/min) helyeztük. A rázás végeztével az oldat kémhatását semlegeshez közeli értékre kellett beállítani, ehhez 630 μ l 0,1 M NaOH oldatot használtunk fel. A kémhatás beállítása pH papíros ellenőrzés mellett történt.

A pepszines oldathoz 2,0-2,0 ml ioncserélt vízben oldott epesó valamint tripszin és α -amiláz enzimeket adtunk hozzá. Az epesó és a tripszin mennyisége 40,0 – 40,0 mg, az

α -amiláz mennyisége 40 μ l volt. Hozzáadás után az oldatot 4 órán át 37°C-on rázógépbbe helyeztük. Ezzel a második lépéssel mind a gyomor, mind pedig a vékonybél kezdeti szakaszának modellezése kerül végrehajtásra.

Az eddig elkészített mintát centrifugáltuk, 4000 g terheléssel, 15 percig, 25 °C-on. A centrifugálás után a mintákról leválasztottuk a felülúszót, majd a kb. 8 ml térfogatú oldatot acetonitrillel 10,0 ml térfogatra töltöttük fel, így acetonitrilre számítva kb. 20 V/V % oldatot kaptunk. Ezt az oldatot 0,45 μ m pórusméretű teflon fecskendőszűrő segítségével leszűrtük, majd a folyadékkromatográfiás méréshez a mintát 20-szorosára hígítottuk 20 V/V%-os acetonitril oldattal.

A centrifugálással leválasztott üledéket extraháltuk az esetlegesen az üledékben felgyülemlett fenhexamid kinyerésének érdekében. Az extrahálás során a szilárd üledékhez 5,0 ml acetonitrilt adtunk, majd alapos vortex keverés után centrifugáltuk 4000 g terheléssel, 15 percig, 25 °C-on. A centrifugált oldatot a felülúszó begyűjtése után 0,45 μ m pórusméretű teflon fecskendőszűrőn leszűrtük. A HPLC-hez használt minta összeállításakor 200 μ l szűrt mintához 800 μ l ioncserélt vizet adtunk, így alakítva ki acetonitrilre számítva kb. 20 V/V % oldatot.

2.1.2. A pronázos mintaelőkészítés végrehajtása

A vizsgálat kétfajta módon futott végig. Az első esetben 50,0 mg pronáz és 7,0 mg Teldor készítményt (egyenértékű 3,0 mg fenhexamiddal) mértünk be, majd a centrifugacsőbe 4,0 ml, pH=7,8 kémhatású, 0,05 M koncentrációjú TRIS puffert adtunk. A puffer hozzáadása után a mintát 16 órán át 37°C-os hőmérsékletű rázógépbbe helyeztük. A második esetben a pronáz és a Teldor mellett 60,0 mg epesót is bemértünk, hogy az epesó emulgeáló hatását vizsgáljuk ennél az enzimes kezelésnél is.

Az elkészített mintákat centrifugáltuk, 4000 g terheléssel, 15 percig, 25 °C-on. A centrifugálás után a mintákról leválasztottuk a felülúszót, 4,0 ml vizet adtunk hozzá, majd a kb. 8 ml térfogatú oldatot acetonitrillel 10,0 ml térfogatra töltöttük fel, így acetonitrilre számítva kb. 20 V/V % oldatot kaptunk. A mintaelőkészítés további lépései a több enzimre épülő mintaelőkészítéshez hasonlóan történtek.

2.1.3. Folyadékkromatográfiás mérés (HPLC)

A fenhexamid kimutatására HPLC-UV műszert használtunk (Agilent 1200; Santa Clara, CA, USA). A méréshez felhasznált oszlop egy fordított fázisú Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₈ volt, melynek méretei: 4,6 mm x 150 mm x 5 μ m. A vizes eluensként („A” eluens) ioncserélt vizet, szerves eluensként („B” eluens) acetonitrilt használtunk.

A minták HPLC-vel történő mérését megelőzően egy kalibrációs görbe elkészítésére volt szükség. A kalibráció 20 ppm koncentrációjú fenhexamid standard (Sigma-Aldrich) felhasználásával történt. A kalibrálás során az injektált mennyiség 10 µl, 25 µl, 50 µl és 100 µl volt, ezek abszolút értékben 0,2 µg, 0,5 µg, 1 µg és 2 µg fenhexamidot tartalmaztak. A kalibráció során kapott értékeket, valamint a kalibrációs egyenes meredekségét és iránytangensét az 1. táblázat tartalmazza.

Injektált fenhexamid (µg)	integrált terület
0	0
0,2	115,7
0,5	281,1
1,0	562,9
2,0	1134,6
Illeszkedés jósága (R^2)	1,0000
Meredekség	566,3
Tengelymetszet	0

1. táblázat: HPLC-UV mérés mennyiségi meghatározásánál használt paraméterek

A mérés a fenhexamidra jellemző UV elnyelési hullámhosszon, 280 nm-en történt. Az oszlopot 30 °C-on termosztáltuk. A kromatográfiás elválasztás időtartama 27 perc volt, amelyet a következő gradiens elválasztással hajtottunk végre: izokratikus szakasz (20% acetonitril) 0-3. perc; gradiens szakasz (acetonitril koncentrációjának növelése 100%-ig) 3-18. percig; mosás (100% acetonitril) 18-22. percig, visszaállítás (acetonitril koncentrációjának csökkentése 20%-ig) 22-23. percig, oszlop kondicionálás 23-27. percig.

2.2. Tejsavbaktériumok vizsgálata fenhexamidot tartalmazó tápközegben

2.2.1. Mintaelőkészítés

A mérés során nyolc *Lactobacillus* tejsavbaktérium faj viselkedését vizsgáltuk fenhexamidot tartalmazó tápközegben való tenyésztés során. A nyolc faj, melyek a BCE Sör- és Szeszipari Tanszékének törzsgyűjteményéből származtak, a következő volt: *L. plantarum* 299V, *L. casei* 01, *L. acidophilus* 150, *L. acidophilus*-5, *L. plantarum* 2142, *L. plantarum* 2108, *L. casei* 2756, *L. plantarum* 2741, és a *L. rhamnosus* NCAIM B01725. A vizsgálat során két párhuzamos mérést hajtottunk végre.

A baktériumokat MRS tápközegben (Himedia M369-500G; Himedialabs, Mumbai, India) tenyésztettük. Az állomány megfelelő frissességének elérése érdekében célkomponens nélküli

táptalajba passzáltuk a sejteket öt alkalommal, két napos lépésközökkel. Az átoltás során 100 µl sejtet pipettáztunk az új 5,0 ml-es tápközegbe.

A tenyésztés után OD₆₀₀ (600 nm-en végrehajtott turbidimetriás) méréssel megmértük a tenyészetek sejtsűrűségét. A *L. rhamnosus* NCAIM B01725, *L. casei* 2756, *L. plantarum* 2741, *L. plantarum* 2108, és *L. plantarum* 2142 tenyészeteknél ötszörös, míg a *L. acidophilus*-5, *L. casei* 01, *L. acidophilus* 150 tenyészeteknél nyolcszoros hígítást kellett alkalmazni az azonos, OD₆₀₀ = 0,7 érték körüli sejtsűrűség eléréséhez (2. táblázat).

Baktériumok	Abszorbancia	Hígítás
<i>L. rhamnosus</i> NCAIM B01725	0,616	5x
<i>L. casei</i> 01	0,441	8x
<i>L. casei</i> 2756	0,627	5x
<i>L. acidophilus</i> -5	0,523	8x
<i>L. acidophilus</i> 150	0,659	8x
<i>L. plantarum</i> 2108	0,537	5x
<i>L. plantarum</i> 2142	0,524	5x
<i>L. plantarum</i> 2741	0,727	5x

2. táblázat: A vizsgált tejsavbaktériumok szaporodásának mértéke szerint szükséges hígítási lépések

A baktériumtenyészetekből az azonos sejtsűrűségekre való hígítás után 100 µl kivételével átoltást végeztünk, ezúttal fenhexamidot tartalmazó tápközegbe. Mind a nyolc baktériumot egyenként 5,0 ml végtérfogatú tápközegbe oltottuk át, melyből minden mintánál 0,1 ml térfogatot tett ki az etanolban oldott fenhexamid standard (Sigma-Aldrich; 1000 µg/ml). A 0,1 ml etanolos oldathoz az 5x hígított tenyészeteknél 1,0 ml sejt és 3,9 ml tápközeg, a 8x hígítottaknál 0,625 ml sejt és 4,275 ml tápközeg adódott. Az így kialakított oldatok 20 ppm koncentrációban tartalmaztak fenhexamidot, ami fele akkora, mint az EU-ban jelenleg hatályos, fenhexamidra vonatkozó legnagyobb megengedett maradvány koncentráció.

Minden baktériumból készítettünk emellett kontrollmintát, ezeknél a tápközeg nem tartalmazott fenhexamidot. Az összeállított mintákat két napig termosztátban 37°C hőmérsékleten nőni hagytuk, majd újra megmértük a sejtsűrűséget OD₆₀₀-on.

2.2.2. HPLC-UV folyadékkromatográfiás mérés

A méréshez szükséges kalibráció elkészítése az előző méréseknél alkalmazott módszer alapján történt, a kalibrációhoz ennél a mérésénél is 20 ppm koncentrációjú fenhexamid standardot használtunk fel.

A mintaelőkészítés a következő módon zajlott: az 5,0 ml térfogatú tápközegekből vortex homogenizálás után 1,8 ml-t pipettával 2,0 ml térfogatú Eppendorf-csőbe mértük át, majd 20 percig centrifugáltuk 10000 g terheléssel, 25°C-on.

A centrifugálás után a felülúszót pipettával eltávolítottuk. Az üledéket 1,0 ml térfogatú 20 V/V%-os acetonitril hozzáadásával és 1 percig tartó ultrahangos szondával (100W; Hielscher UP-100H) történő roncsolással extraháltuk. A roncsolás után az üledéket ismét centrifugáltuk, az első centrifugálással azonos paramétereken. A felülúszót ismét lepipettáztuk. A mintákat ezután leszűrtük, ehhez 0,45 µm-es teflon fecskendőszűrőt használtunk. A felülúszók esetében a HPLC méréshez összeállított minta 200 µl felülúszóból, 140 µl acetonitrilből és 660 µl ioncserélt vízből állt, az üledékeknél 200 µl üledékből, 100 µl acetonitrilből és 700 µl ioncserélt vízből.

A HPLC méréshez felhasznált oszlop, a felhasznált eluens és beállított mérési paraméterek valamint a kalibráció menete megegyeznek az előző, emésztőenzimekkel történő vizsgálat során alkalmazottakkal. Az injektálási térfogat 100 µl volt.

2.2.3. HPLC-ESI-MS/MS folyadékkromatográfiás mérés

Az eredmények kiértékelése során vált nyilvánvalóvá, hogy a HPLC-UV vizsgálatok mellett szükség van HPLC-ESI-MS/MS mérésekre is, melyeknek célja a fenhexamid egyik detoxikációs termékének, a fenhexamid-O-glükozidnak kellően érzékeny meghatározása volt. Ezeknek a méréseknek a kidolgozása/optimalizálása nem tartozik ezen TDK dolgozat anyagához, és magukat a méréseket sem a TDK munkát végző hallgató hajtotta végre, csupán a végeredményeket hasznosította.

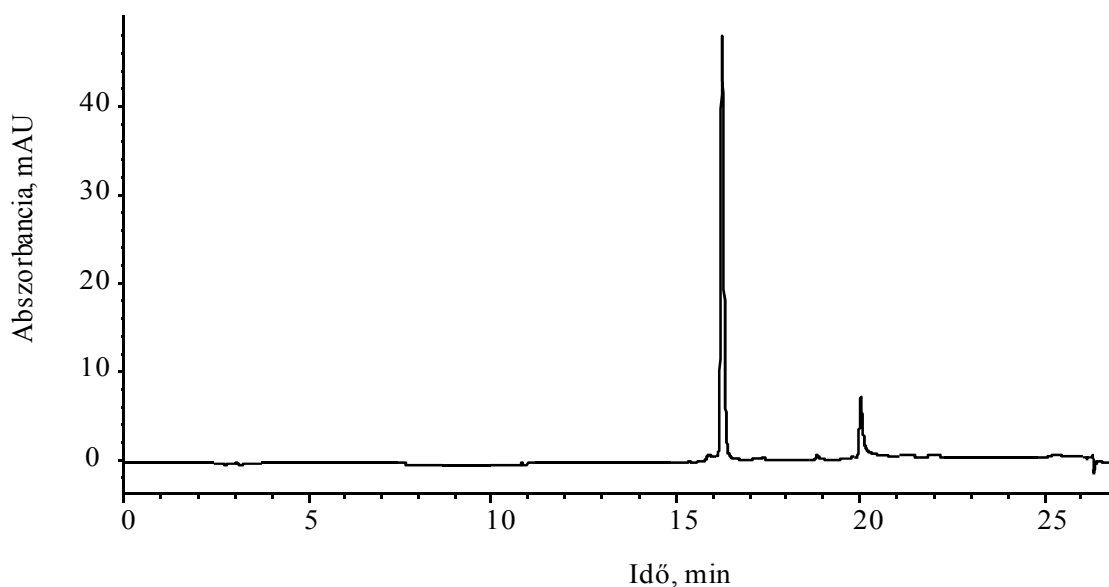
A HPLC-ESI-MS méréseket Kmellár (Kmellár és mtsai, 2010) ill. Polgár (Polgár és mtsai, 2012) közleményei alapján az Alkalmazott Kémia Tanszéken hajtották végre egy Applied Biosystems QTRAP 3200 (Applied Biosystems – Perkin Elmer; Waltham, Massachusetts, USA) típusú tömegspektrométeren, amelyhez egy Agilent 1100 típusú folyadékkromatográfiás készülék volt kapcsolva. A felhasznált kromatográfiás oszlop, eluensek és grádiens megegyeznek a HPLC-UV méréseknél leírtakkal. A méréshez szükséges fenhexamid-O-glükozid előállítását és az azonosításához szükséges tömegspektrometriai paramétereket a bekezdésben felsorolt két közlemény ill. Dr. Száraz Leonóra folyamatban lévő szakdolgozata (Száraz, 2012) tartalmazza.

3. Eredmények

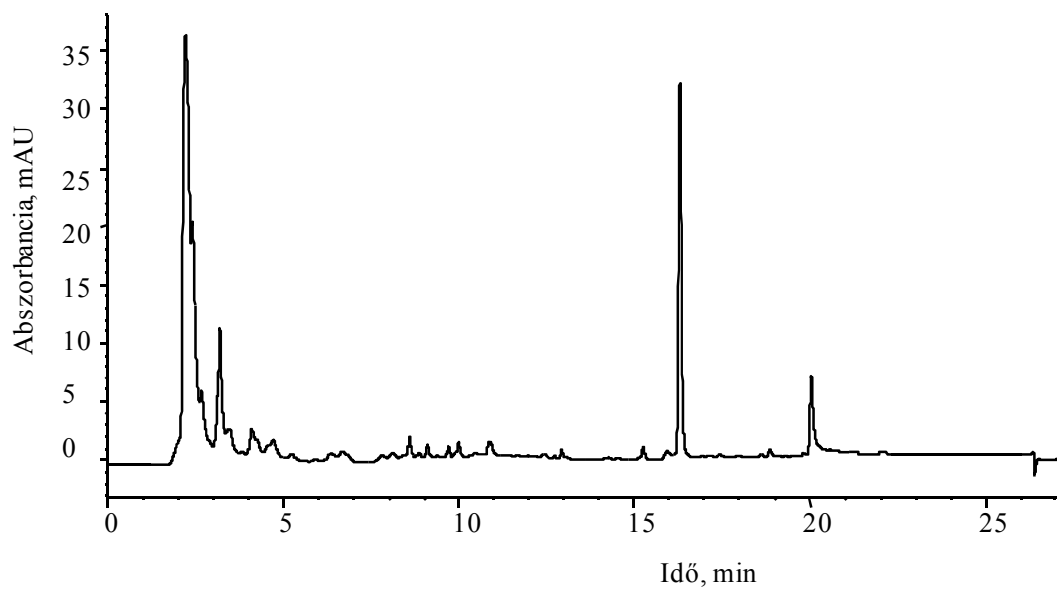
3.1. A fenhexamid emésztőrendszeri vizsgálatának eredményei

3.1.1. HPLC-UV vizsgálati eredmények

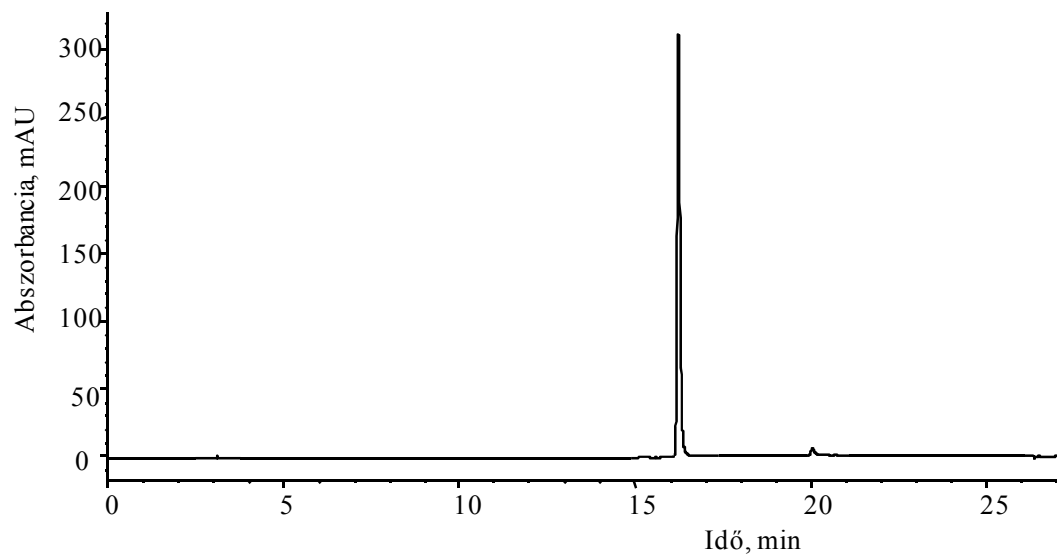
A kalibrációs standardok vizsgálatánál a fenhexamid, mint erősen lipofil komponens, a HPLC elválasztás során $t_R=16,1$ perc retenciós időnél érkezett a kromatográfiás oszlopról (5. ábra), egy, az adott standardra jellemző szennyező komponenssel együtt ($t_R=20,0$ perc). A fenhexamid retenciós idejénél nem tapasztaltunk zavarást egyetlen minta mérésénél sem, így a több enzimet alkalmazó eljárás felülúszójának (6. ábra), üledékének (7. ábra), a pronázos kezelés felülúszójának (8. ábra) ill. üledékének (9. ábra) elemzésénél sem. Az epesókat tartalmazó vizsgálati minták kromatogramjai megegyeztek a csak pronázos kezeléssel átesett minták eredményeivel, így azokat külön nem közöltük.



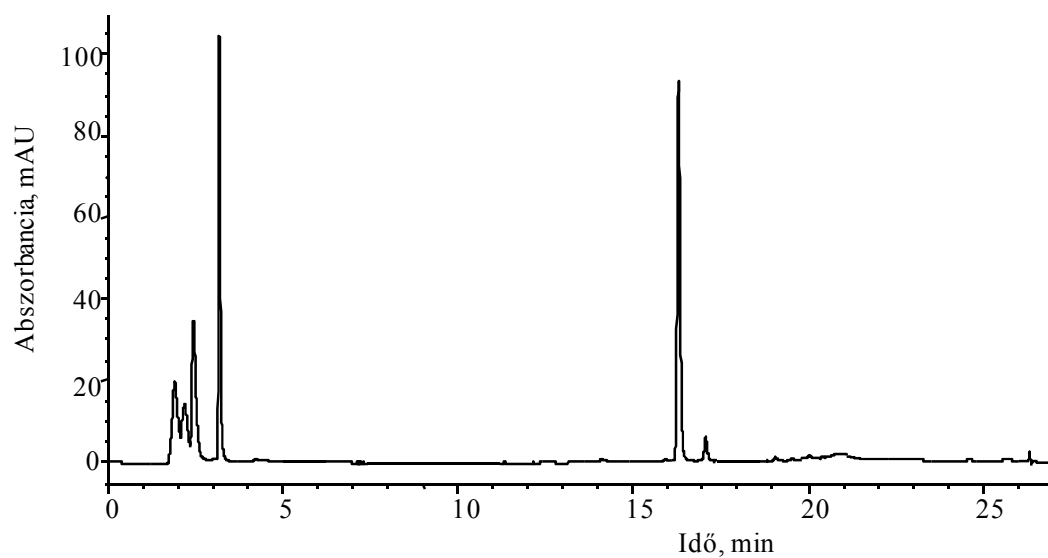
5. ábra: A fenhexamid standard ($t_R=16,1$ min) HPLC-UV kromatogramja.



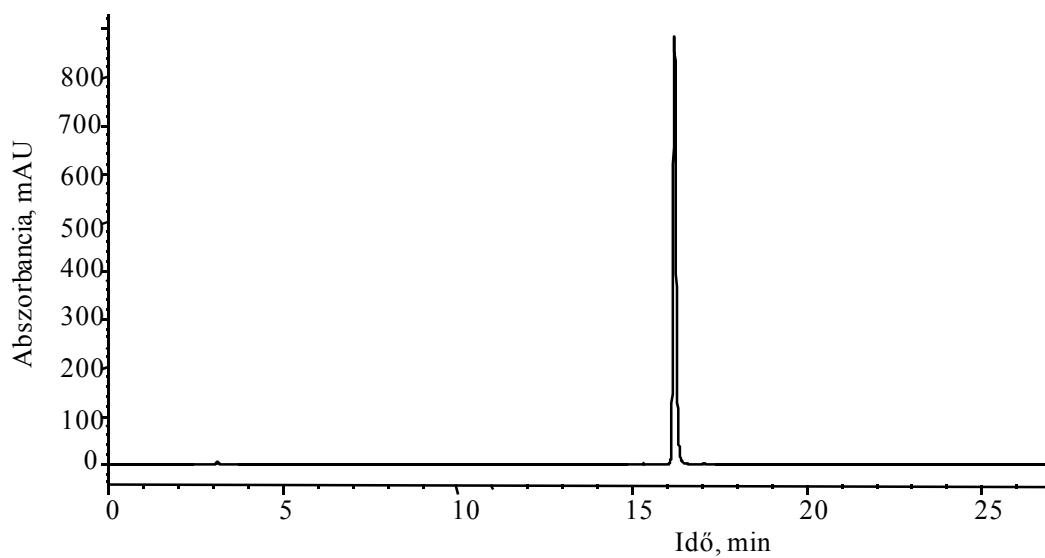
6. ábra: A több enzimes mintaelőkészítés után kapott felülúszó HPLC-UV kromatogramja. A fenhexamid elúciója nem zavart, retenciós ideje 16,1 perc.



7. ábra: A több enzimes mintaelőkészítés után kapott üledék HPLC-UV kromatogramja. A fenhexamid elúciója nem zavart, retenciós ideje 16,1 perc.



8. ábra: A pronázos mintaelőkészítés után kapott felülúszó HPLC-UV kromatogramja. A fenhexamid elúciója nem zavart, retenciós ideje 16,1 perc.



9. ábra: A pronázos mintaelőkészítés után kapott üledék HPLC-UV kromatogramja. A fenhexamid elúciója nem zavart, retenciós ideje 16,1 perc.

A kapott eredmények összefoglalását a 3. táblázat hordozza. Az adatok elemzése során több fontos észrevételt lehetett tenni:

- Bár a fenhexamid rendelkezik amidkötéssel, a mintákhoz adagolt 3,0 mg fenhexamid mennyisége nem csökkent le a kezelések hatására, tehát sem a pepszines kezelés kémhatása, sem a fehérjebontó enzimek aktivitása nem eredményezett mérhető léptékű bomlást a minták fenhexamid tartalmában.
- A Teldor termék kiszerezésében alkalmazott emulgeálószeres és az epesók együttes hatása sem tudta 60% fölé emelni a fenhexamid oldatban lévő mennyiségét.

Bár mindhárom vizsgálati eljárás előrejelző képességében és a modellezés mértékében „belépő” szintűnek számít, elmondható, hogy a növényi eredetű élelmiszerek felületén bejutó fenhexamid feltehetően számottevő bomlás nélkül átjut mind a gyomron, mind pedig a vékonybél kezdeti szakaszain, és nem zárható ki, hogy azt követően találkozhat a bélflórát alkotó mikroorganizmusokkal – bár hozzáférhető mennyisége nagy valószínűség szerint csökken.

Kísérlet sorszáma	Kísérlet jellege	Felülúszóban lévő fenhexamid mennyisége, mg	Üledékben lévő fenhexamid mennyisége, mg	Összes fenhexamid, mg	Fenhexamid megoszlása a mintában, felülúszó/ üledék
1.	Több enzimes	1,33	1,61	2,90	46 % / 54 %
2.	Pronáz	1,49	1,51	3,0	50 % / 50 %
3.	Pronáz + epesók	1,80	1,20	3,1	60 % / 40 %

3. táblázat: A fenhexamid enzimes bontási kísérleteinek összesítése.

3.2. A fenhexamidot tartalmazó tápközegekben vizsgált tejsavbaktériumok eredményei

3.2.1. A sejtsűrűség turbidimetriás mérésének eredményei (OD₆₀₀)

A fenhexamiddal kiegészített tápközegekben végrehajtott inkubálás elteltével újra megmértük a sejtsűrűséget. A tenyészetekből vortex keverést követően kivett 1,0 ml elegyek OD₆₀₀-on mért sejtsűrűségét ioncserélt vízzel történő hígítással 1,0, illetve azt megközelítő abszorbancia értékekre állítottuk be. A baktériumoknál kapott abszorbancia értékek és az alkalmazott hígítások a 4. táblázatban láthatók. A mérés alapján két fajnál, a *L. plantarum* 2108-nál és *L. casei* 2756-nál nem mutatkozott számottevő különbség a fenhexamidot tartalmazó és a kontrolltenyészet sejtsűrűsége között, a növekedésükre a hozzáadott komponens nem volt hatással, így ezeket a törzseket a továbbiakban nem vizsgáltuk. A maradék hat fajból öt esetében a fenhexamid a szaporodást gátolta, míg egy esetben (*L. plantarum* 2142) a fenhexamidos tápközegekben nagyobb sejtsűrűség alakult ki. A minták további vizsgálata HPLC-UV műszerezettséggel történt.

Baktériumok és kezelésük	Hígítás mértéke (hozzáadott ioncserélt víz, ml)	Hígítás utáni abszorbancia (OD ₆₀₀)
<i>L. rhamnosus</i> NCAIM + fenhexamid	1,5	1,018
<i>L. rhamnosus</i> NCAIM	1,7	1,072
<i>L. casei</i> 01 + fenhexamid	1,5	1,099
<i>L. casei</i> 01	1,7	1,082
<i>L. casei</i> 2756 + fenhexamid	0,5	1,02
<i>L. casei</i> 2756	0,7	0,979
<i>L. acidophilus</i> -5 + fenhexamid	1,5	1,087
<i>L. acidophilus</i> -5	2,2	1,093
<i>L. acidophilus</i> 150 + fenhexamid	1,5	1,092
<i>L. acidophilus</i> 150	2,2	0,934
<i>L. plantarum</i> 2108 + fenhexamid	1,0	0,899
<i>L. plantarum</i> 2108	0,9	0,898
<i>L. plantarum</i> 2142 + fenhexamid	2,0	0,994
<i>L. plantarum</i> 2142	1,5	0,927
<i>L. plantarum</i> 2741 + fenhexamid	1,5	1,097
<i>L. plantarum</i> 2741	2,0	1,097

4. táblázat: A fenhexamidot tartalmazó tápközegekben szaporított és a kontroll tenyészetek azonos sejtsűrűségre történő hígításának mértéke és a mért végleges abszorbancia értékek (OD₆₀₀)

3.2.2. A HPLC-UV folyadékkromatográfiás mérés eredményei

A kontroll tenyészetekhez képest fenhexamidot (100 µg) tartalmazó tápközegekben eltérő mértékű sejtszaporodást mutató fajok esetében elvégeztük a tápközegekben maradt ill. a sejtekhez adszorbeálódott vagy általuk felvett fenhexamid mennyiségi meghatározását. Figyelembe véve a mérési eljárás ill. a mintaelőkészítés bizonytalanságát, a *L. plantarum* 2142 és a *L. rhamnosus* NCAIM fajok esetében számottevő mértékben kevesebb fenhexamidot tudtunk visszamérni a tápközeghez adott mennyiséghez képest. Ez az eltérés fakadhat a fenhexamid átalakulásából/átalakításából ill. az ultrahangos szondával végrehajtott extrakció esetleg nem kvantitatív voltából.

Minta	Fenhexamid tartalom a felülúszóban, µg	Fenhexamid tartalom az üledékben, µg	Összes fenhexamid tartalom, µg
<i>L. acidophilus</i> 150	92,3	8,4	100,7
<i>L. acidophilus</i> -5	90,3	7,0	97,3
<i>L. casei</i> 01	91,1	7,8	98,9
<i>L. plantarum</i> 2142	79,4	12,2	91,6
<i>L. plantarum</i> 2741	81,3	15,8	97,1
<i>L. rhamnosus</i> NCAIM	75,7	8,0	83,7

5. táblázat: Fenhexamiddal kiegészített tápközegekben szaporított *Lactobacillus* fajok fenhexamid-felvételének vizsgálata.

Az eredmények igazolása céljából a méréseket megismételtük két törzzsel, a leginkább eltérést mutató *L. rhamnosus* NCAIM ill. egy közel teljes visszanyerést eredményező fajjal, a *L. casei* 01-gyel. A megismételt szaporítások és mérések előkészítése, körülményei, HPLC-UV mérési eljárásai megegyeztek az eredeti mérésnél alkalmazottakkal.

Minta	Fenhexamid tartalom a felülúszóban, µg	Fenhexamid tartalom az üledékben, µg	Összes fenhexamid tartalom, µg
<i>L. rhamnosus</i> NCAIM	84,3	10,2	94,5
<i>L. casei</i> 01	78,8	12,2	91,0

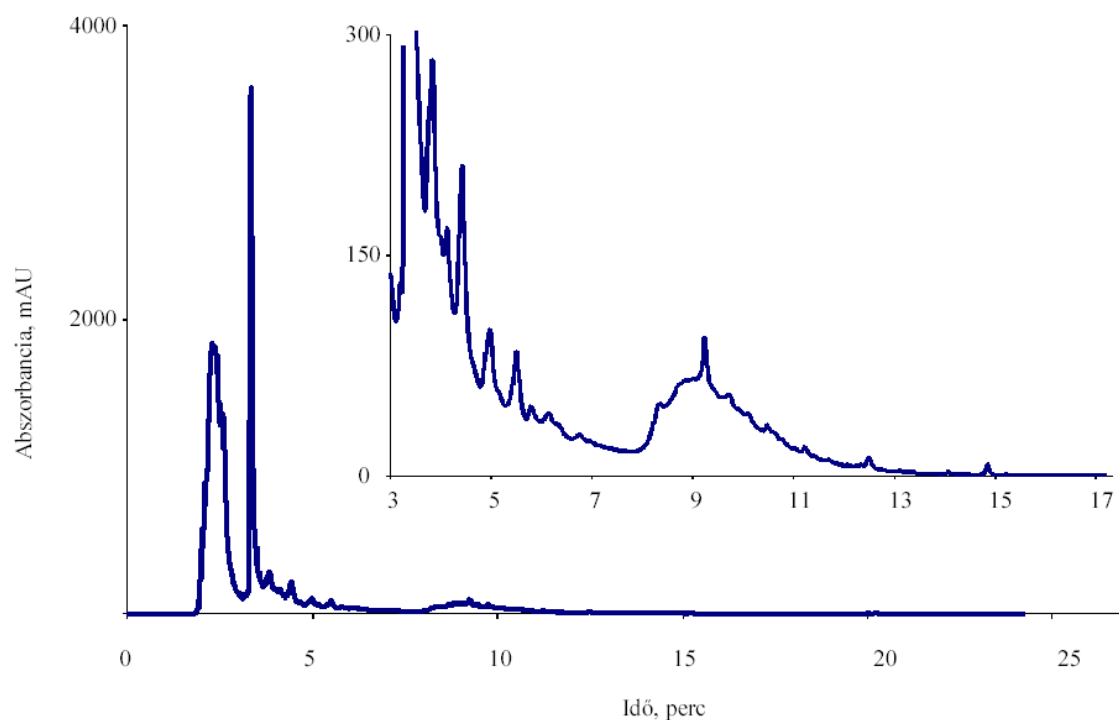
6. táblázat: Fenhexamiddal kiegészített tápközegekben szaporított *Lactobacillus* fajok fenhexamid-felvételének vizsgálata – megismételt vizsgálat.

Az 5. és 6. táblázatból látható, hogy a vizsgálatok reprodukálhatósága gyenge, mivel ugyanazon fajok esetén akár 10%-ot megközelítő mértékben tért el a visszanyert fenhexamid mennyisége a korábbi vizsgálatokhoz képest. Ez a jelenség többféleképpen magyarázható:

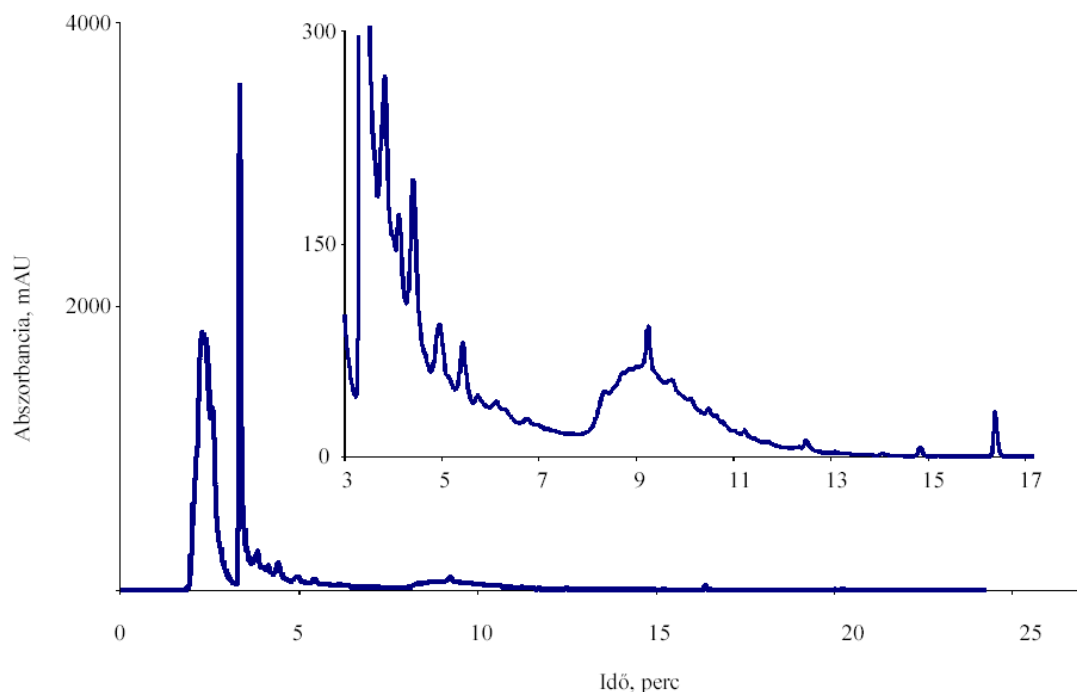
- A sejtek szaporodási ciklusában ill. a fermentációs paraméterekben fellépő akár apró eltérések is nagy mértékben befolyásolhatják a visszanyert fenhexamid mennyiségét, pl. a sejtekből történő kinyerés hatásfokának változása által.
- Az ultrahangos szondán és acetonitriles oldaton alapuló feltárás nem kimerítő, lehetséges, hogy a fenhexamid egy része a sejteken belül marad.
- A fenhexamid egy része a fermentációs tápközeg és a szaporított sejtek anyagcseretermékeinek függvényében az üveg kémcső falán adszorbeálódhat.

Amennyiben a tápközegekhez adagolt 20 ppm (20 µg/ml) koncentrációjú fenhexamid 5-10%-a valamilyen módon átalakul a korábban ismertetett bomlás- ill. detoxikációs termékekre (2. ábra) vagy azokhoz hasonló vegyületekre, akkor azok is oldatban maradnak és HPLC-UV vizsgálattal kimutathatók. Ebben az esetben a fenhexamidra jellemző 280 nm abszorbancia hullámhosszon végrehajtott HPLC-UV vizsgálat során az új komponens megjelenhet a kromatogramban, feltételezhetően közelebb a holtterfogathoz, mivel a peszticidek detoxikációs végtermékei általában hidrofilebbek az alapvegyületnél.

Ahogy a 10. és 11. ábrákból látható, a példaként választott *L. rhamnosus* NCAIM két vizsgálati kromatogramja között csupán a $t_R=16,1$ perc retenciós időnél érkező fenhexamid csúcsban van eltérés; más vegyület megjelenése – ezen a hullámhosszon – nem érzékelhető. Ez a vizsgálat önmagában nem zárja ki teljes mértékben, hogy a fenhexamid számottevő része átalakult volna valamilyen detoxikációs vagy bomlás terméké, azonban arra utal, hogy az előbbieken felsorolt három, a mintaelőkészítéshez-extrakcióhoz kötődő hibalehetőséget nem lehet kizárni.



10. ábra: fenhexamidot nem tartalmazó (kontroll) tápközegeben szaporított *L. rhamnosus* NCAIM tápközegeének HPLC-UV vizsgálata. A kromatogram nagyított részlete az ábra jobb oldalán található.

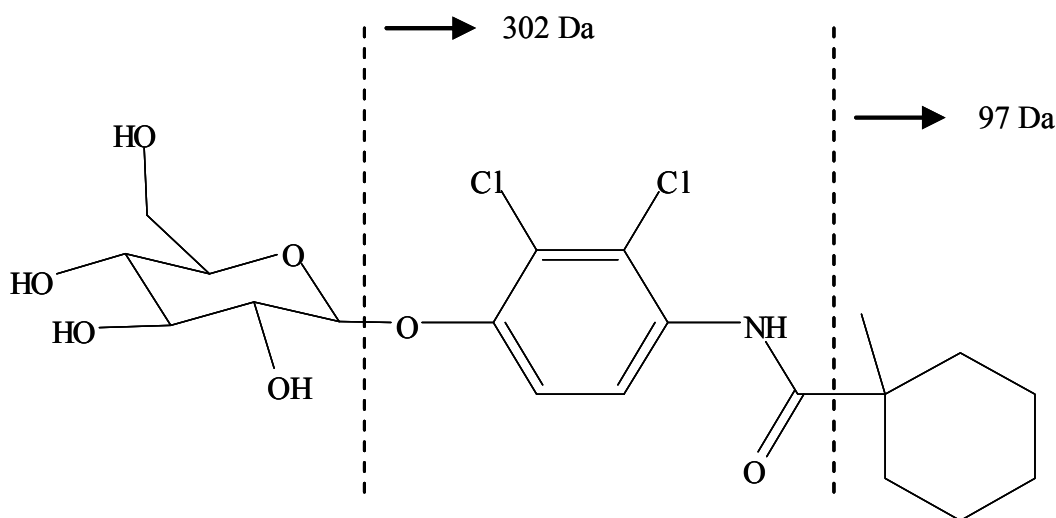


11. ábra: 20 ppm fenhexamidot tartalmazó tápközegeben szaporított *L. rhamnosus* NCAIM tápközegeének HPLC-UV vizsgálata. A kromatogram nagyított részlete az ábra jobb oldalán található.

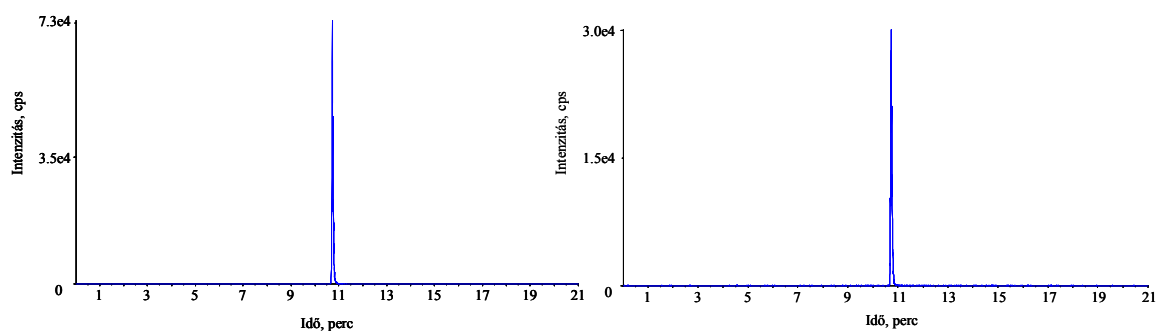
3.2.3. A HPLC-ESI-MS/MS folyadékkromatográfiás mérés eredményei

A HPLC-UV vizsgálatok eredményei alapján nem lehetett kizárni, hogy a tejsavbaktériumok a fenhexamidból valamilyen metabolitot állítanak elő, akár csak kis mennyiségben is. Ennek kiderítésére három lehetőség nyitott: (a) nagy felbontású szerves tömegspektrométerrel végrehajtott HPLC-ESI-MS vizsgálatnál manuális keresés véghezvitele a szakirodalomban leírt metabolitok megtalálása céljából, vagy (b) az előző vizsgálat lefolytatása metabolomikai célszoftveres kereséssel ill. (c) kis felbontású szerves tömegspektrométerrel végrehajtott HPLC-ESI-MS/MS vizsgálatnál olyan metabolitok keresése, amelyekhez rendelkezésre áll standard vegyület. Bár az első két lehetőség meghaladja a TDK értekezés kereteit, a harmadik módszerhez rendelkezésre állt egy fenhexamid metabolit, a fenhexamid-O-glükózid standard vegyülete (Polgár és mtsai, 2012) (12. ábra) ill. a vegyület mérésére kidolgozott HPLC-ESI-MS módszer (Száráz, 2012). Bár ezt a vegyületet korábban kizárólag növényekből mutatták ki, érdemesnek tűnt megvizsgálni, nem jöhet-e létre baktériumok anyagcseréjében.

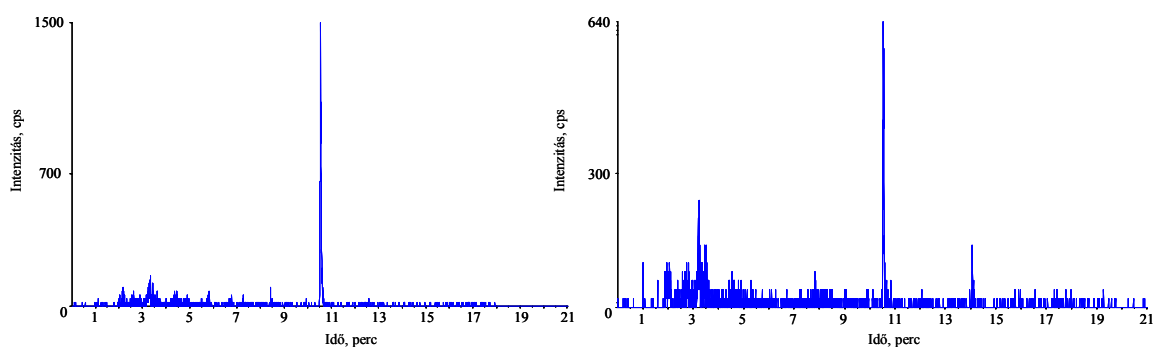
A mérési módszer azon az elven alapul, hogy amennyiben egy vegyület standardja rendelkezésre áll, akkor a szerves tömegspektrométert optimalni lehet ennek a vegyületnek az érzékeny és szelektív kimutatására azáltal, hogy a készülékben a vegyület jellegzetes fragmenseit hozzuk létre. Ha a vizsgálandó mintában megtalálható a vegyület, akkor az a standarddal azonos retenciós időnél fog érkezni a kromatográfiás rendszerről és azonos fragmenseket fog mutatni. A fenhexamid-O-glükózid esetén a 12. ábrán szereplő vonalak mentén alakulnak ki a készülékben a fragmensek, jellegzetes relatív tömegű fragmenseket (302 Da ill. 97 Da) hozva létre. A 13. ábrán az alapvegyülethez képest hidrofilebb, 1 ppm koncentrációjú fenhexamid-O-glükózid standard elúciós paramétereit ($t_R=10,7$ perc) és a két jellegzetes fragmens intenzitását figyelhetjük meg.



12. ábra: A fenhexamid-O-glükózid szerkezete. A függőleges szaggatott vonalak a molekula szerves tömegspektrométerben mutatott jellegzetes fragmentációs viselkedését jelzik.



13. ábra: A fenhexamid-O-glükozid standard HPLC-ESI-MS/MS kromatogramjai. Baloldalon a nagyobb intenzitású (302 Da), jobboldalon a kisebb intenzitású (97 Da) fragmens kromatogramja látható.



14. ábra: fenhexamid tartalmú tápközegben szaporított *L. casei* 01 tápközegének HPLC-ESI-MS/MS kromatogramjai. Baloldalon a nagyobb intenzitású (302 Da), jobboldalon a kisebb intenzitású (97 Da) fenhexamid-O-glükozid fragmens kromatogramja látható.

A fenhexamid-O-glükozidra szelektív HPLC-ESI-MS/MS mérést mind a hat vizsgált *Lactobacillus* faj fenhexamiddal kiegészített tápközegén elvégeztük. Meglepő módon az egyik faj, a *L. casei* 01 esetén sikerült egyértelműen azonosítani a fenhexamid származékot (14. ábra): mind a retenciós idő, mind a fragmensek intenzitásai megegyeztek a standard vegyületével. Bár a vegyület koncentrációja nagyon kicsi (nagyságrendileg 10 ppb), ez a megfigyelés több szempontból is fontosnak tekinthető:

- Ez az első eset, hogy egy *Lactobacillus* fajról sikerült kimutatni: kismértékben ugyan, de metabolizálni képes egy rá elvileg nem ható fungicidet.
- A *L. casei* fajok a leggyakrabban használt probiotikus mikrobák, így felvetődhet, hogy érdemes lenne megvizsgálni viselkedésüket az összes olyan engedélyezett peszticidre, amelyek számottevő mennyiségben juthatnak el a bélflóra alsó szakaszaiba.

- Az eredmények tükrében nem zárható ki, hogy egyes növényi peszticid metabolit képződésének hátterében bakteriális anyagcserefolyamatok is meghúzódnak.
- Mivel a metabolitot a tápközegből mutattuk ki, még nem lehet pontosítani, hogy intra vagy extracelluláris enzim a felelős a képződésért.

4. Összefoglalás

Munkám során az egyik legelterjedtebb fungicidet, a fenhexamidot vizsgáltuk az emberi emésztést részben modellező enzimes kísérletekben ill. probiotikumként használható *Lactobacillus* fajok tápközegébe kevert formában. Az volt a célunk, hogy információt gyűjtsenek egyrészt a fenhexamid stabilitásáról savas ill. fehérjebontó enzimeket tartalmazó oldatokban, másrészt megvizsgáljuk, hogyan hat ez a peszticid a lactobacillusok szaporodására.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a fenhexamid nem mutatott számottevő mértékű bomlást sem a gyomrot, sem pedig a vékonybél kezdeti szakaszát modellező rendszerekben, így nem zárható ki, hogy egy része eljuthat a bélflórát alkotó mikrobákig. A fenhexamid a vizsgált 8 *Lactobacillus* faj többségét, 5 fajt gátolt a szaporodásban, míg egy esetben a szaporodás mértéke nagyobb volt a fenhexamid jelenlétében. Ennek a jelenségnek a háttere nem ismert és további vizsgálatokat igényel. Az egyik *Lactobacillus* faj, a *L. casei* 01 esetében kimutattunk egy korábban kizárólag növényekben előforduló fenhexamid származékot, a fenhexamid-O-glükozidot: ezen metabolit képződésének módját és mértékét ugyancsak további kísérletek során lehet tisztázni.

5. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezető tanáromnak Dr. Dernovics Mihálynak és konzulensemnek Bujna Erikának, hogy iránymutatásukkal lehetővé tették dolgozatom elkészítését.

Köszönettel tartozom továbbá tanárainknak, Rezessyné Dr. Szabó Juditnak, Dr. Nguyen Duc Quangnak és Havas Petrának, hogy biztosították méréseim elvégzését a Sör-és Szeszipari Tanszéken.

Szeretném megköszönni Firisz Zsuzsannának, Bakonyvári Ildikónak és Vass Andreának a munkám során nyújtott segítségüket és hasznos tanácsaikat.

6. Hivatkozott irodalom

- A.P.S. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/Pages/default.aspx>. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- Abou-Arab, A. A. K. 1997. Effect of Ras cheese manufacturing on the stability of DDT and its metabolites. *Food Chemistry*. 59(1):115-119.
- Abou-Arab, A. A. K. 2002. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. *Food and Chemical Toxicology*. 40(1):33-41.
- Anderson, C., Brumhard, B., Ditzgens, K., Reiner, H. 1999. Metabolism of fenhexamid (KBR 2738) in plants, animals, and the environment. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*. 52(1):227-251.
- Ayana, I. A. A. A., El Deen, A. A. G., El-Metwally, M. A. 2011. Behavior of certain lactic acid bacteria in the presence of pesticides residues. *International Journal of Dairy Science*. 6(1):44-57.
- B.C. http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/g_1.htm. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- Bassil, K. L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D. C., Kaur, J. S., Kerr, K. J. 2007. Cancer health effects of pesticides - Systematic review. *Canadian Family Physician*. 53(1):1705-1711.
- Bayer. <http://www.bayercropscience.hu/webset32.cgi?BayerCrop@@@HU@@@32@@@GOOGLEBOT>. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- Bernardeau, M., Guguen, M., Vernoux, J. P. 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *Fems Microbiology Reviews*. 30(4):487-513.
- Braunberg, R. C., Beck, V. 1968. Interaction of DDT and the gastrointestinal microflora of the rat. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 16(3):451-453.
- Brent, K. J., Hollomon, D. W. "Fungicide resistance: the assessment of risk." 53. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee, 2007.
- Byrnes, C. "Evaluation of the new active FENHEXAMID in the product TELDOR 500 SC FUNGICIDE." National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, 2001.
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Pirisi, F. M., Farris, G. A., Madau, G., Emonti, G. 1999. Pesticides in fermentative processes of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(9):3854-3857.
- Clair, E., Linn, L., Travert, C., Amiel, C., Seralini, G. E., Panoff, J. M. 2012. Effects of Roundup (R) and Glyphosate on Three Food Microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Current Microbiology*. 64(5):486-491.
- Collins, M. D., Phillips, B. A., Zanoni, P. 1989. Deoxyribonucleic-acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* Sp-nov, subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* Sp-nov, Comb-nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39(2):105-108.
- De Boever, P., Deplancke, B., Verstraete, W. 2000. Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *Journal of Nutrition*. 130(10):2599-2606.
- Drobnikova, V., Bacilek, J. 1982. Effect of some pesticides on microorganisms isolated from honeybees. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 29(6):734-738.
- E.F.S.A. 2010/1. Modification of the existing MRL for fenhexamid in onions. *EFSA Journal*. 8(7):1696-1728.
- E.F.S.A. 2010/2. Modification of the existing MRLs for fenhexamid in various leafy vegetables. *EFSA Journal*. 8(1):1455-1475.
- E.M.B.L._01. http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/bacteria/Lactobacillus_acidophilus.html. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- E.M.B.L._02. http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/bacteria/Lactobacillus_plantarum.html. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- E.P.A. <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>. hozzáférési dátum.
- E.U. 2010. A Bizottság 600/2010/EU rendelete. Az Európai Unió Hivatalos Lapja. 174(1):18-39.
- E.U. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- Eskenazi, B., Bradman, A., Castorina, R. 1999. Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environmental Health Perspectives*. 107(1):409-419.
- F.A.O. <http://www.fao.org/docrep/005/y4544e/y4544e00.htm>. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- F.A.O. http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2005_rep/Fenhexamid.pdf. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- Farmit. <http://www.farmit.hu/szoleszet/partnerek/bayer-cropscience/teldor-500-sc>. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- Hall, F. R. "Precision farming: Technologies and information as risk-reduction tools." In *ACS Symposium Series*, 96-116, 1999.

- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*. 125(1):1-12.
- Ingrassia, I., Leplingard, A., Darfeuille-Michaud, A. 2005. Lactobacillus casei DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6):2880-2887.
- Internet_01. <http://austinlauren.pbworks.com/w/page/14266178/Recent%20Media%20on%20Lactobacillus%20acidophilus>. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- Internet_02. <http://www.prodigest.eu/en/technology/2simulatorofhumanintestinalmicrobialecosystemshime>. hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- J.M.P.R. "Fenhexamid." In *2005 Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues /JMPR/*, 255-301. Genf, Svájc, 2005.
- Jurewicz, J., Hanke, W. 2008. Prenatal and childhood exposure to pesticides and neurobehavioral development: Review of epidemiological studies. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 21(2):121-132.
- Kápolna, E., Fodor, P. 2007. Bioavailability of selenium from selenium-enriched green onions (*Allium fistulosum*) and chives (*Allium schoenoprasum*) after 'in vitro' gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 58(4):282-296.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M., Stiekema, W., Lankhorst, R. M. K., Bron, P. A., Hoffer, S. M., Groot, M. N. N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W. M., Siezen, R. J. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(4):1990-1995.
- Kmellár, B., Abrankó, L., Fodor, P., Lehotay, S. J. 2010. Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 27(10):1415-1430.
- Lehotay, S. J., Anastassiades, M., Majors, R. E. 2010. QuEChERS, a sample preparation technique that is "catching on": An up-to-date interview with the inventors. *LC-GC North America*. 28(7):504-516.
- Martini, M. C., Lerebours, E. C., Lin, W. J., Harlander, S. K., Berrada, N. M., Antoine, J. M., Savaiano, D. A. 1991. Strains and species of lactic-acid bacteria in fermented milks (yogurts) - effect on invivo lactose digestion. *American Journal of Clinical Nutrition*. 54(6):1041-1046.
- McClements, D. J., Li, Y. 2010. Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*. 1(1):32-59.
- Molly, K., Vandewoestyne, M., Desmet, I., Verstraete, W. 1994. Validation of the simulator of the human intestinal microbial system (SHIME) reactor using microorganism-associated activities. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 7(4):191-200.
- Oomen, A. G., Rempelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D., Sips, A. 2003. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 44(3):281-287.
- Polgár, L., García-Reyes, J. F., Fodor, P., Gyepes, A., Dernovics, M., Abrankó, L., Gilbert-López, B., Molina-Díaz, A. 2012. Retrospective screening of relevant pesticide metabolites in food using liquid chromatography high resolution mass spectrometry and accurate-mass databases of parent molecules and diagnostic fragment ions. *Journal of Chromatography A*. 1249(1):83-91.
- Possemiers, S., Grootaert, C., Vermeiren, J., Gross, G., Marzorati, M., Verstraete, W., Van de Wiele, T. 2009. The intestinal environment in health and disease - Recent insights on the potential of intestinal bacteria to influence human health. *Current Pharmaceutical Design*. 15(18):2051-2065.
- Sanborn, M., Kerr, K. J., Sanin, L. H., Cole, D. C., Bassil, K. L., Vakil, C. 2007. Non-cancer health effects of pesticides - Systematic review and implications for family doctors. *Canadian Family Physician*. 53(1):1713-1720.
- Szárász, L. 2012. Probiotikus törzsek béta-glükózidáz aktivitásának vizsgálata egy xenobiotikum (fenhexamid-glükózid) hidrolízisén keresztül. Szakdolgozat. BCE - ELTE.
- Todar, K. <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>, hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- Todar, K. http://textbookofbacteriology.net/featured_microbe.html, hozzáférési dátum: 2012.12.10.
- Villena, J., Chiba, E., Tomosada, Y., Salva, S., Marranzino, G., Kitazawa, H., Alvarez, S. 2012. Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). *BMC Immunology*. 13:53(online, oldalszám nélkül).
- Walter, J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(16):4985-4996.
- Wickham, M., Faulks, R., Mills, C. 2009. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition and Food Research*. 53(8):952-958.