

SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
KÖRNYEZET- ÉS TÁJGAZDÁLKODÁSI INTÉZET
KÖRNYEZETVÉDELMI ÉS KÖRNYEZETBIZTONSÁGI TANSZÉK

**A ZEARALENON BIODETOXIFIKÁCIÓJA
RHODOCOCCUS TÖRZSEK SEJTMENTES
KIVONATAIVAL**

Készítette: Risa Anita
Évfolyam: KM MSc. II. évf.

Belső konzulens: Dr. Krifaton Csilla
Beosztása: egyetemi adjunktus

Gödöllő
2014

Tartalomjegyzék

1.	BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	2
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
2.1.	Szennyezőanyagok a környezetben.....	3
2.2.	Hormonháztartást zavaró anyagok	4
2.3.	Mikotoxinok	5
2.3.1.	Mikotoxin termelő gombák.....	6
2.3.2.	Zearalenon	7
2.4.	Mikotoxinok detoxifikálása.....	11
2.4.1.	Biodegradáció	12
2.5.	A mikotoxinok vizsgálati módszerei	15
2.5.1.	Kémiai analitika.....	15
2.5.2.	Immunanalitikai módszerek.....	16
2.6.	Biológiai hatásmérés.....	17
2.6.1.	Biolumineszcencia, mint a toxicitás indikátora	19
2.6.2.	Ösztrogén kimutatására alkalmas módszerek	20
2.6.3.	A BLYES/BLYR tesztrendszer	21
3.	MÓDSZEREK.....	23
3.1.	Bontási kísérlet	23
3.1.1.	Inokulum és előtenyésztet.....	24
3.1.2.	Bontási kísérlet élő sejtekkel	24
3.1.3.	Bontási kísérlet sejtmentes kivonatokkal	25
3.2.	A bontás értékelése	26
3.2.2.	HPLC	28
3.2.3.	ELISA tesztek	28
3.2.4.	Statisztikai értékelés	28
4.	EREDMÉNYEK.....	29
4.1.	A BLYES, BLYR tesztrendszer előkísérletei.....	29
4.2.	A bontási kísérlet értékelése	30
4.2.1.	A bontási kísérlet értékelése analitikai módszerekkel.....	30
4.2.2.	A bontási kísérlet értékelése maradék biológiai hatás alapján	31
4.2.3.	A bontási kísérlet komplex értékelése	32
5.	ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	38
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	41
7.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	43
8.	IRODALOMJEGYZÉK.....	44
9.	MELLÉKLETEK, FÜGGELÉK.....	48
1.	melléklet: Toxikológiai/ökotoxikológiai teszteknel alkalmazott mérési végpontok.....	48
2.	melléklet: Alkalmazott tápoldatok	49

1. Bevezetés és célkitűzések

A zearalenon (ZEA) a *Fusarium* gombafajok által termelt mikotoxin, mely gabonanövényeket, elsősorban a kukoricát és a búzát fertőzi. A ZEA a természetes ösztrogénhoz hasonló hatása révén reprodukciós és szaporodásbiológiai zavart okoz a haszonállatokban és az emberekben egyaránt, valamint karcinogén, mutagén, teratogén, immunszuppresszív és citotoxikus hatású. A mikotoxinok eltávolítására az egyik legmegfelelőbb megoldást a biodetoxifikáció jelenti, melynek során mikroorganizmusok vagy enzimek végzik a káros anyagok lebontását. Sorra jelennek meg olyan tudományos cikkek, amelyek a mikotoxinok bontására képes mikroszervezetek izolálásáról és identifikálásáról szólnak. Már kereskedelmi forgalomban is kapható olyan enzimalapú takarmány-adalékanyag, amely képes bizonyos mikotoxinok (zearalenon, ochratoxin) bontásra.

Egy korábbi kutatásban már vizsgáltuk a ZEA biodegradációját, melynek screeneléséhez sikeresen alkalmaztuk a *Saccharomyces cerevisiae* genetikailag módosított BLYES/BLYR törzseinek fénykibocsátásán alapuló bioripporter rendszert. A biológiai hatáselemzés eredményeit kémiai analitikával (HPLC-FLD) és immunanalitikával (ELISA) is alátámasztottuk. A három módszer előnyeit magába foglaló komplex elemzés szerinti legígéretesebb törzseknek a *Rhodococcus* nemzetség tagjai bizonyultak.

Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal (EFSA) a takarmány- és élelmiszerláncban alkalmazható, feltételezhetően biztonságosnak minősített biológiai ágenseket a „QPS listán” (Qualified Presumption of Safety) foglalja össze. Az általunk vizsgált nemzetség ugyan nem szerepel a QPS listán, így élő sejtként nem felhasználható, de a belőlük készült enzimalapú preparátumok alkalmazása sikeres megoldást jelenthet a mikotoxinok eliminációjára.

Jelen kutatásunkban célunk a *Rhodococcus* fajok ZEA biodetoxifikációjában résztvevő enzimjeinek és az enzimatis folyamatoknak megismerése volt. Vizsgálataink fő iránya annak felderítését célozta, hogy a bontási folyamatban résztvevő enzimek extra- vagy intracellulárisan termelődnek, továbbá, hogy ezen enzimek konstitutív természetűek vagy a szennyező jelenléte váltja ki aktivitásukat. A megfogalmazott célkitűzések elérése érdekében a törzsek sejtmentes kivonataival dolgoztunk.

2. Irodalmi áttekintés

Az élelmiszer-biztonsági kérdések ma már a mindennapi élet részévé váltak, hiszen napról-napra hallani olyan szennyezett élelmiszerekről, melyek az üzletek polcaira kerülnek. A megváltozott éghajlati viszonyok következtében egyre nagyobb teret hódító természetes szennyező anyagok megjelenése miatt kapott létjogosultságot az élelmiszer-biztonság tudománya. Az Európai Unió politikájának is az egyik irányvonala a „termőföldről az asztalig” elv, mely szerint egy élelmiszeripari alapanyag életciklusát a kezdeti lépésektől a fogyasztóig nyomon kell követni és ezalatt folyamatosan biztosítani annak tisztaságát és veszélytelenségét. Mind az EU-ban és így hazánkban is igen komoly szabályzások vonatkoznak az élelmiszerekre, az adalékanyagokra valamint az élelmiszerekkel kapcsolatba kerülő természetidegen és természetes szennyezőanyagokra is ([http1](http://)).

2.1. Szennyezőanyagok a környezetben

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

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

A szennyezőanyagok biológiai hatásukat tekintve lehetnek sejtosztódást gátló (citotoxikus), sejt szintű elváltozásokat, mutációkat okozó (mutagén), rákkeltő (karcinogén), fejlődési rendellenességeket okozó (teratogén), valamint immunrendszert (immunszuppresszív) és idegrendszert károsító (neurotoxikus) anyagok is. A környezetben lévő szennyezők között

előfordulnak hormonhatású anyagok, melyek hatásuk révén az endokrin rendszer működését zavarják (Szoboszlai – Kriszt, 2012).

2.2. Hormonháztartást zavaró anyagok

Manapság egyre nagyobb veszélyt jelentenek a környezetben jelenlévő potenciális egészségkárosító anyagok, többek között a hormonháztartást megzavaró anyagok (Endocrine Disrupting Chemicals, EDC). Lehetnek természetes vagy szintetikus eredetűek, melyek megzavarják egy szervezet hormonháztartását és homeosztázisát, valamint hátrányosan befolyásolják az emberi és az állati szaporodást egyaránt (Burkhardt-Holm 2010).

Az EDC-k több csoportra oszthatók (Byrne et al. 2009, Markey et al. 2003):

- mesterséges eredetűek:
 - mesterséges hormonok
 - hormonális mellékhatással rendelkező gyógyszerek
 - ipari és háztartási eredetű vegyszerek
 - növényvédőszer és azok metabolitjai
 - ipari és háztartási eljárásokból származó melléktermékek
- természetes eredetűek:
 - természetes hormonok és azok metabolitjai
 - fito- és mikoösztrógenek
 - fémek

Az EDC-k élőlényekre gyakorolt hatását először 1996-ban Theo Colborn írta le „Ellopott jövőnk” (Our stolen Future) című könyvében, bár előtte már Rachel Carson is tett említést a növényvédőszer endokrin rendszert zavaró hatásáról.

Az EDC-k gátolják a szervezet anyagcsere folyamatait, hormonális reakcióit, vagyis a természetes hormonok eliminációját, szintézisét, szekrécióját, szállítódását, metabolizmusát és működését. Működésük során ösztrogén, androgén, progeszteron receptorokra valamint pajzsmirigy, növekedési és stressz hormonokra is hatnak (Burkhardt-Holm 2010). Hatásuk megfigyelhető homeosztatis és reprodukciós zavarokban, főként az életciklus bizonyos állomásain, azaz fejlődéskor, terhesség alatt, valamint laktációs időszakban is (Kavlock et al. 1996). Mindkét nemet veszélyeztetik, felelőssé tehető szaporodásbiológiai, idegrendszeri, pajzsmirigy, anyagcsere és szívrendszeri zavarokért, valamint növelik a mellrák és a prosztaták kialakulásának kockázatát (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). Ezenkívül összefüggésbe hoztak már bizonyos EDC-ket autoimmun betegségek kialakulásával is (Kavlock 1996). Egy egyed fejlődése alatt megzavarhatják továbbá az ivar kialakulását,

hatással vannak az agyi fejlődésre, befolyásolják a szervek növekedését és működését, hatásuk a teljes élettartamra kihathat (Guillette et al. 1995). A korábban megjelent hatások általában visszafordíthatatlanok, míg a később megjelentek visszafordíthatók, reverzibilisek.

Az Európai Unió által kiadott lista szerint az ösztrogénhatású anyagok közül 150 szintetikus eredetű és mindössze 7 található meg eredetileg a természetben (Burkhardt-Holm 2010).

Manapság már egyre nagyobb számban detektálnak EDC-ket intenzív mezőgazdasági művelés alatt álló területeken is (Kolpin et al. 2002), köszönhetően a *Fusarium* nemzetség által termelt mikotoxinoknak, a zearalenonnak (Burkhardt-Holm, 2010).

2.3. Mikotoxinok

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

Számos tudományterület foglalkozik a mikotoxinokkal, mint például az állathigiénia – mely az állatok egészségének védelme által közvetve az emberek környezetének és egészségének védelmére is irányul – valamint a növénytermesztés, az élelmiszerbiztonság és a környezetvédelem egyaránt.

Fontosabb mikotoxin csoportok és termelőik a következők (Bennett–Klich, 2003):

- Aflatoxinok (*Aspergillus spp.*)
- Citrinin (*Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*)
- Patulin (*Penicillium spp.*)
- Trichotecének (*Fusarium spp.*, *Stachybotritis spp.*)
- Fumonizinek (*Fusarium spp.*)
- Zearalenon (*Fusarium spp.*)
- Ochratoxin (*Penicillium spp.*)
- Ergot alkaloidák (*Claviceps spp.*)

2.3.1. Mikotoxin termelő gombák

Mára több mint 5000 gombafajról bizonyított az a tény, hogy gazdasági növényeket károsít (Maráz 2001), 350 fajról mutatták ki, hogy mikotoxinogének, és ezen penészgombák több mint 400 különböző mikotoxint termelnek (Deák 2006, Mézes–Balogh 2010). Egy felmérés szerint a piacon lévő élelmiszeripari árucikkek körülbelül 25%-a mikotoxinnal szennyezett (http3). A hazánkban nagy arányban termesztett szántóföldi növények úgy, mint a búza és a kukorica, fokozottan érzékenyek a mikotoxinokkal szemben.

A penészgombák a környezeti tényezőkkel szemben kevésbé érzékenyek, ugyanis főként oxigénre és nedvességre van szükségük. A legtöbb faj mezofil, melyek hőmérsékleti igénye 10–30°C, de nagy számban fordulnak elő pszichrotrófok, vagyis hidegtűrő fajok is. A kémhatással szemben sem mondhatók kényes szervezeteknek, ugyanis széles pH tartományban, akár savas körülmények között is tudnak szaporodni. Szaporodásuk és anyagcseréjük miatt szükségük van tápanyagokra, melyeket az élelmiszerekből vonnak ki, megváltoztatva azok fizikai és kémiai tulajdonságait, így okozva jelentős minőségromlást (Deák 2006).

A takarmányokban előforduló mikroorganizmusok anyagcsere folyamataik során elsődleges anyagcseretermékeket termelnek, melyeket saját életfolyamataikhoz használnak fel, így ezek más élőlények számára nem jelentenek veszélyt. Ezzel ellentétben a penészgombák a takarmányba bekerülve és ott elszaporodva, komoly veszélyt jelentenek az általuk termelt szekunder anyagcseretermékek, a mikotoxinok révén. A szaporodást elsősorban az oxigén, a hőmérséklet, a megfelelő tápközeg valamint természetesen a víz befolyásolja. Ezzel szemben a toxintermelést egy vagy több környezeti tényező hirtelen megváltozása okozza. Abban az esetben, ha a gomba számára szükséges bármely környezeti tényező megváltozik, stressz hatást vált ki a szervezetből, melyre az toxintermeléssel válaszol (Mézes 2009).

A mikotoxin-termelő penészgombákat megjelenésük alapján Christensen és Kaufmann (1969) két csoportra osztotta. Lehetnek szántóföldi és raktári penészgombák aszerint, hogy a növekedésükhöz mennyi vizet igényelnek.

Szántóföldi penészgombák fő jellemzője a nagy nedvességigény, amelyek képviselői a következők: *Acremonium*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Helminthosporium* fajok. A raktári penészgombák közé tartoznak: *Absidia*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* és a *Rhizopus* nemzetség tagjai (Kovács 1980). Ez a csoportosítás azért jelentős, mert a penészgombák eredetét ismerve választhatunk a fertőzés megelőzésének módjai közül. Fontos azonban

megjegyezni, hogy egy mikotoxint több faj is termelhet, és egy penészgomba több toxin termeléséért is felelős lehet. A raktári és szántóföldi penészek jelenléte nem feltétlenül jelenti a toxin jelenlétét is, ugyanígy megállapítható, hogy a gomba hiánya sem jelenti a toxin hiányát (Mézes, 2009).

2.3.1.1. *Fusarium nemzetség*

A mérsékelt éghajlatú országokban elsősorban a *Fusarium* nemzetség által megtermelt toxinok okoznak jelentős állat- és humánegészségügyi kockázatot (http4). A *Fusarium spp.* az összes mikotoxin termelő faj közül a legjelentősebb, ugyanis ez a nemzetség felelős a mikotoxin-termelés egyharmadáért (Deák 2006). Különböző rezolcilsav-lakton származékokat, mint a zearalenon (ZEA) és vegyületei, a trichotecéneket úgy, mint a T-2 toxin, a HT-2 toxin, dezoxinivalenol (DON), diacetoxiscirpenol (DAS), és a fumonizineket (FB1-FB6) termelnek (Mátrai et al. 2003).

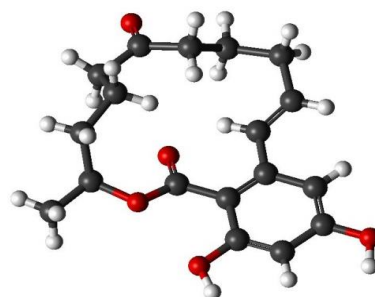
A kártétel helye szerint a szántóföldi csoportba sorolják, de a raktárban is komoly fertőzést okozhatnak (http4). A raktári perzisztencia szempontjából efemer fajok, mely szerint szaporodóképességüket a raktározás alatt gyorsan elvesztik. Nedvességigényüket tekintve az erősen nedvességigényes, vagyis a higrofil csoportba tartoznak, így elsősorban a gabonaféléket és az olajos magvakat fertőzik meg (Mézes 2009).

A fuzáriotoxikózis során a gabona veszít beltartalmi értékeiből (esszenciális aminosav és keményítő), ráadásul a gombák másodlagos anyagcseretermékei magasabb rendű szervezetekbe kerülve igen veszélyes mérgezéseket, mikotoxikózisokat okoznak (Kovács, 1980).

2.3.2. Zearalenon

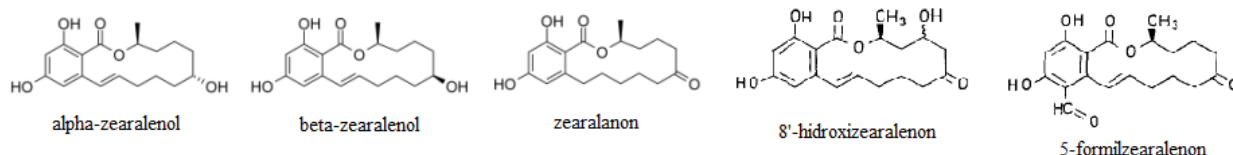
A zearalenon (ZEA), vagy más néven F-2 toxin a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fajok által termelt rezolcilsav-lakton (1. ábra). A leggyakoribb ZEA-t termelő fajok a következők: *F. avenacum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. lateritium*, *F. crookwellense*, *F. semitectum* (Betina 1989, Bennett-Klich 2003).

Származékai többek között a természetben szintén előforduló alfa-zearalenol, beta-zearalenol, zearalanon, 8'-hidroxizearalenon, 5-formilzearalenon (2. ábra) (Shier 1980).



1. ábra: A ZEA térszerkezete (saját készítésű ábra)

8'-hidroxizearalenon, 5-



2. ábra: A zearalenon származékai (Bolliger – Tamm, 1972; Bravin et al., 2009)

2.3.2.1. A ZEA felszívódása a szervezetben

A toxin elsősorban a szájon át kerül a szervezetbe, ahonnan könnyen a bélrendszerbe jut, ott megkötődik, majd a sejteken belül továbbalakul metabolitjaira, α - és β -zearalenolra (α -ZOL, β -ZOL). Metabolitjai sokszor erősebb toxicitással rendelkeznek, mint maga a ZEA. Az α -ZOL a ZEA-nál négyszerte aktívabb (Mátrai et al. 2003), míg a β -ZOL (szerkezete megegyezik az α -ZOL szerkezetével, de az atomok kapcsolódási sorrendjében térnek el, tehát a β az α sztereoizomer párja) a ZEA-val megegyező toxicitású (Mézes 2009). A ZEA-nak még három metabolitja rendelkezik nagyobb toxicitással, mely a zearalanon, az α -zearalanol (α -ZAL) és a β -zearalanol (β -ZAL). Az 1. táblázatban a ZEA és metabolitjainak a térizomériája, valamint a metabolitok toxinhoz viszonyított ösztrogénhatása látható.

Ezek a bomlástermékek aztán a glükuronsavval kapcsolódnak. Ez a glükóz oxidációjával keletkező szerves sav fontos szerepet játszik az idegen anyagok kiválasztásában, így a ZEA esetében is. A keletkezett glükuronid ugyanis megkötődik a bélnyálkahártya-sejtjeiben, majd a májba onnan pedig a véráramba kerül. Ez a hepatikus keringés okozza a toxin elhúzódó visszatartását, így gátolja eliminációját és fokozza a káros hatások időtartamát (Gromadzka 2008). A ZEA szervezetben való átalakításának a folyamata igen nagymértékben hasonlít a baktériumok által végzett lebontáshoz, így ezt részletesen a 2.4.1.2-es fejezetben fogom kifejteni.

1. táblázat: A ZEA és metabolitjainak térszerkezete és relatív ösztrogénhatása (Shier et al., 2001)

Szubsztrát	1-es és 2-es szénatomok közötti kötés	A 6-os szénatomon lévő ligandum	A ZEA-hoz viszonyított ösztrogénhatás
Zearalenon	Kettős	O	1
α-ZOL	Kettős	H- α -OH	92
β-ZOL	Kettős	H- β -OH	0,44
Zearalanon	Egyszeres	O	2,5
α-ZAL	Egyszeres	H- α -OH	18
β-ZAL	Egyszeres	H- β -OH	3,5

Vizsgálatok kimutatták, hogy az állatfajok közül leginkább a sertés érzékeny rá, mert szemben a többi állatfajjal, ennek szervezetében a metabolizáció következtében α -ZOL keletkezik, ahogyan az emberében is.

2.3.2.2. *A ZEA biokémiai hatásai*

A toxin és metabolitjai képesek ösztrogén receptorokhoz (ER α és ER β) kötődni, ennek köszönheti a ZEA az ösztrogénhatását. A megkötődést követően a ZEA-receptor komplex bekerül a sejtmagba, ahol az ösztrogén válaszelemeknek köszönhetően beindítja az ösztrogénspecifikus gének átíródását (Riley 1998).

Kuiper-Goodman (1987) társaival együtt vizsgálta az toxin receptorokhoz kötődő képességét annak metabolitjaival együtt. Patkányméh citoplazma receptorokon végzett vizsgálat eredményei szerint, a megkötődő képesség tekintetében a következő sorrendet állították fel: α -ZAL > α -ZOL > β -ZAL > ZEA > β -ZOL.

A ZEA egyrészt ligandumként szolgálhat az ösztrogén receptorokhoz, másrészt számos enzim szubsztrátja is lehet, melyek a hormonszintézisben játszanak igen fontos szerepet. A hidroxiszteroid-dehidrogenáz (HSD) fontos szabályozó enzim a hormon homeosztázis fenntartásában is és egyben a ZEA lebontásában is szerepet játszik (Fink-Gremmels – Malekinejad 2007).

Ezenfelül a toxin nemcsak az ösztrogén receptorokhoz képes kötődni, hanem az emberben lévő szteroid és xenobiotikum érzékelő SXR receptorhoz is. Ez a receptor azért jelentős, mert szabályozza azoknak a géneknek az átíródását, melyek az endobiotikumok és a xenobiotikumok lebontásában vesznek részt. Ebbe a csoportba tartozik a citokróm P450 enzimcsalád tagja a CYP3A4 is. Az SXR receptor szerepet játszik továbbá más enzimek úgy, mint a glükuronil transzferáz szabályozásában is (Ding et al. 2006). Hosszú távú kitettség esetén ezen befolyásnak köszönhetően csökken a glükuronidációs képesség, ezáltal tovább csökken a toxin és metabolitjainak az inaktiválása is.

Busk és munkatársai (2011) további vizsgálatokat végeztek, melyben arra voltak kíváncsiak, hogy a ZEA hatással van-e a proteomra (a szervezet fehérjéinek összessége). Ehhez a H295R mellékvesekéreg-karcinoma sejtvonalat használták, melynek vizsgálata során sikerült bebizonyítani, hogy a toxin igen is hatással van olyan fehérjékre, melyeknek ismert hormonrendszert befolyásoló szerepük van. Ilyenek többek között az ösztrogén tulajdonságokkal rendelkező citokróm-c oxidáz fehérjék, valamint az androgének termelését szabályzó SCARB (gyökfogó receptor fehérje osztály) fehérjék.

Mindezekből jól látszik, hogy a ZEA működése rendkívül hasonló a hormonokéhoz, minek következményeképpen válik a toxin egy jelentős hormonrendszert zavaró anyaggá.

A ZEA biológiai hatásait tekintve változatos. Az ösztrogénszerű hatásának köszönhetően származékaival együtt főként szaporodásbiológiai és ivarzási problémát

okoznak (Gromadzka et al. 2008). Elsősorban az endometrium, vagyis a méhnyálkahártya, a petefészek, a tejmirigy, a hipotalamusz, a hipofízis elülső lebenyének sejtjein található ösztrogén receptorokhoz kapcsolódnak, így tudják kifejteni a hatásaikat. A kórképét már 1927-ben megfigyelték az USA-ban sertéseken, Magyarországon a hatvanas évek óta van jelen (Cseh–Kovács 2010). Ösztrogénszerű hatását befolyásolja a receptorok típusa és eloszlása is. Ez okozza az eltérő érzékenységet a fajok között. Sokszor a fuzárium toxinok szinergizmus révén felerősítik egymás hatását még súlyosabb szaporodásbiológiai zavarokat okozva (Cseh–Kovács 2010).

A 70-es években egy magyar kutatócsoport bizonyította a ZEA hormon- és reprodukciós rendszert zavaró hatását. A kísérletben szereplő állatok hosszú ideig szennyezett takarmánnyal történő etetése következtében zavarok léptek fel a tüszőérésben valamint a spermatogenezis során is (Ruzsas et al. 1979). Erre irányuló további kutatások eredményei is igazolják a ZEA azon hatását, mely szerint csökkenti a tesztoszteron és a spermium mennyiségét, és fokozza a másodlagos női nemi jellegek kialakulását (Etienne–Dourmad, 1994). Több esetben leírták fiatal lányok korai ivaréését azok között, akik főként „reform” élelmiszereket fogyasztottak. Elsősorban a kukorica és a búza alapanyagú termékekből kerülhet ez a toxin a szervezetbe (Kovács 2010).

További káros biológiai hatása a ZEA-nak a haematotoxicitás, vagyis vérmérgező tulajdonsága (Maaroufi et al. 1996). Genotoxikus és mutagén hatását illetően 2004-ben Lioi és munkatársai vizsgálataik során kromoszómátöréseket tapasztaltak (Lioi et al. 2004). Mindezekon felül egyes vizsgálatok alapján leírták májkárosító hatását és immunotoxicitását is (Zinedine 2005). Mára bebizonyosodott, hogy a toxin megváltoztat különböző biológiai markereket. Heneweer és munkatársai (2007) leírták ZEA-val végzett patkányetetési kísérlet során, hogy a toxin hatására néhány ösztrogénfüggő génnek – mint biológiai markernek – az expressziója lecsökkent (APLN, AQP5) ill. megnövekedett (CALB3, C2).

Manapság a mikotoxinok veszélyességéből adódóan törvényi úton szabályozott az állati eredetű élelmiszerek előállítása során felhasznált takarmányok, valamint a közvetlenül emberi fogyasztásra termelt gabonafélék megengedhető mikotoxin szennyezettsége.

Az Európai Unió által elfogadott takarmányokban mérhető legmagasabb ZEA koncentráció a 2006/576/EK alapján (EC 2006):

- gabonafélék és gabonakészítmények, kivéve a kukorica melléktermékeket: 2 mg/kg
- kukorica melléktermékek: 3mg/kg
- kiegészítő és teljes értékű takarmányok malacoknak és kocaüldőknek: 0,1 mg/kg

- tenyészkocáknak és hízósertéseknek: 0,25 mg/kg
- borjaknak, tejelő teheneknek, juhoknak (beleértve a bárányokat) és kecskéknak (beleértve a gidákat): 0,5 mg/kg

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

2.4. Mikotoxinok detoxifikálása

Mivel a mikotoxinok a táplálékláncba kerülve továbbra is megtartják toxicitásukat, különösen fontossá vált azok kivonása a takarmányokból illetve az élelmiszereinkből. Különösen igaz ez az aflatoxin B1-re, az ochratoxin A-ra, a deoxinivalenolra, a T-2 toxinra és a zearalenonra. A mikotoxinokat detoxifikáló illetve degradáló ágensek számos gyakorlati felhasználása a gazdasági állatoknál indirekt módon a humán egészségvédelem egyik eszköze is lehet, ugyanis az ily módon mentesített állati termékek az emberi szervezetbe jutva már nem okoznak semmilyen káros hatást (EFSA 2009).

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

- Adszorbensek: Olyan nagy molekulású anyagok, melyek megkötődnek a mikotoxinok felületén, így csökkentik azok biológiai hozzáférhetőségét. Ez a folyamat anélkül játszódik le, hogy az állat bélrendszerét károsítaná, és az adszorbensek az ürülékkel távoznak.

Számolni kell azonban az adszorbensek negatív hatásával is. Mivel ezen ágensekre nem jellemző a szelektivitás így megköthetnek fontos ásványi anyagokat és vitaminokat is, ezáltal csökken a tápanyagok biológiai hozzáférhetősége. Sőt a vitaminok és az antioxidánsok pozitív tulajdonságaik révén komoly szerepet játszhatnak a mikotoxinok detoxifikálásában, így csökken az egészségre gyakorolt jótékony hatásuk is.

Az adszorbensek lehetnek szilikon alapú szervetlen vagy szén-alapú szerves polimerek, tejsav baktériumok vagy akár élesztő sejtfal.

- Biotranszformáló anyagok degradálják vagy átalakítják a mikotoxinokat egy nem vagy kevésbé toxikus metabolitra.

A folyamat alatt azonban számolni kell olyan bomlástermékek keletkezésével, melyek káros hatása a mikotoxinokénál nagyobb. Ezek az átalakulások lehetnek kevésbé stabilak – melynek végén a káros anyagok visszaalakulnak kevésbé káros anyagokká – és stabilak, hiszen előfordulhat, hogy az átalakított mikotoxinokból keletkező toxikusabb metabolitok hatása a folyamat végeztével sem szűnik meg.

A biotranszformáló anyagok lehetnek baktériumok, gombák vagy különböző enzimek is.

A fentiek ismeretében az EFSA 2010-ben kiadott ajánlása szerint „a takarmányok mikotoxin-szennyezettségének csökkentésére irányuló eljárások során nemcsak a mikotoxinok, hanem az eljárás során esetlegesen keletkező metabolitok, bomlási termékek biológiai hatását is vizsgálni kell” (EFSA Journal, 2010).

2.4.1. Biodegradáció

A biodegradáció a mikroorganizmusok által végzett, biológiai-kémiai történések sorozatán keresztül megvalósuló lebontási illetve átalakítási folyamatok (Szoboszlai–Kriszt 2008).

A biodegradációs folyamatokat két csoportra oszthatjuk. Megkülönböztethetünk teljes illetve részleges lebontást. Az első esetben a kiindulási vegyületek szén-dioxidra és vízre bomlanak le, ekkor mineralizációról beszélünk. A részleges biodegradáció esetében több dolog akadályozhatja az anyagok teljes lebontását. Egyes esetekben hiányzik a degradációhoz nélkülözhetetlen valamelyik enzim, ezért a folyamat megreked egy szinten. A képződött energiát a mikroorganizmusok felhasználják energiaforrásként. Előfordulhat olyan degradáció is, melynek során a szerves vegyület teljesen lebomlik, viszont a mikrobák nem hasznosítják a felszabaduló energiát. Ezt nevezzük kometabolizmusnak. A harmadik esetben a kiindulási vegyületek átalakulnak, és komplexebb, stabilabb vegyületek keletkeznek. A biodegradáció során előfordulhat, hogy az átalakítást végző mikroorganizmusokban felhalmozódnak a szennyezők, és a kiindulási vegyületeknél sokkal toxikusabb metabolitok jönnek létre.

A biodegradációt befolyásolja a szennyezőanyag kémiai szerkezete és hozzáférhetősége, valamint a megfelelő mikroszervezetek kiválasztása is.

2.4.1.1. A *Rhodococcus* nemzetség biodegradációban betöltött szerepe

A *Rhodococcus* nemzetség rendkívül heterogén csoportot foglal magába, melynek köszönhetően kiválóan alkalmas különböző szerves vegyületek bontására. A szénhidrogénbontó képességüket különböző katabolikus génjeinek köszönhetik, melyek nagyszámú lineáris plazmidokon vannak kódolva. Rendkívül nagy genommal rendelkeznek, mely meghaladhatja a 9,7 Mb-t is (Petrusma 2011). Képesek lebontani rövid- és hosszúlán-cú alkánokat, heterociklikus és policiklikus aromás valamint halogénezett vegyületeket is (Larkin et al 2006).

Hatékony aromás vegyületeket bontó képességüket a különböző dioxigenázok vezérlik, melyek a gyűrű felhasításával degradálják a vegyületeket. Nitrilek bontását is nagy hatékonysággal képesek végezni köszönhetően nitriláz és nitril-hidratáz enzimjeiknek (Martínková et al 2008).

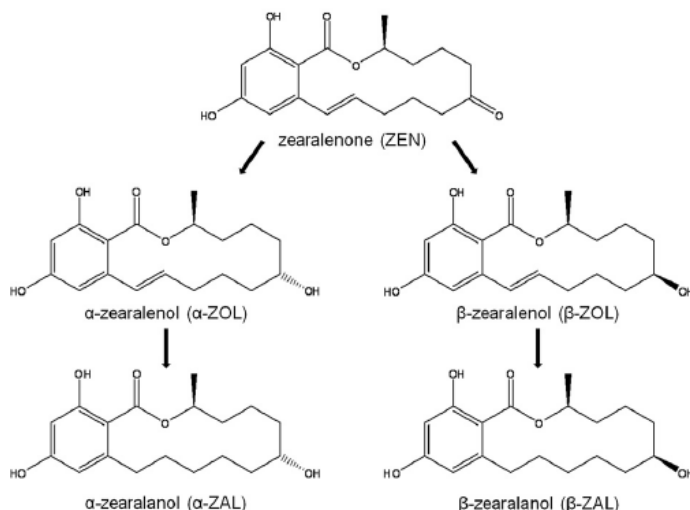
A szteroidok lebontásában is hatékony szerepet játszanak, hiszen genomjukban számos olyan enzimet kódoló gén található, mely ezt a szerepet tölti be. Szteroid-gyűrű bontására képes a 3-ketoszteroid 9 α -hidroxiláz (KSH), és a 3-ketoszteroid Δ 1-dehidrogenáz (KSTD) valamint a rövid szénláncú dehidrogenáz/reduktáz és az aldo-keto reduktáz enzimsalád tagjai, a hidroxiszteroid dehidrogenázok (HSD) is (Petrusma 2011, Kisiela 2012).

Fizikai tulajdonságaiknak is köszönhetik kiváló biodegradációs képességüket. Hatékonyan adaptálódnak a környezeti feltételekhez és toxikus vegyületekkel szemben is igen ellenállóak. (Larkin et al. 2005).

A fenti tulajdonságoknak köszönhetően került a *Rhodococcus* nemzetség a biotechnológia látóugarába, hiszen rendkívül széleskörű enzimjeinek köszönhetően az egyik legjobban alkalmazható nemzetség biodegradációs célokra.

2.4.1.2. A *zearalenon* biodegradációja

A ZEA biodegradációjában szerepet játszó enzimekről először Olsen és Kiessling számolt be 1983-ban. Ők voltak azok, akik bemutatták a folyamatot katalizáló két legfontosabb bontóenzimet, a 3- α - és 3- β -hidroxiszteroid-dehidrogenázt (3 α -HSD és 3 β -HSD). A 3 α -HSD az aldo-keto reduktáz enzimsaládba tartozik, melyek NADPH jelenlétében ketonokat alakítanak alkohollá. Több szervben is előfordulnak és elsősorban a szteroidok lebontását végzik. Ezzel szemben a 3 β -HSD a rövidláncú dehidrogenáz/reduktáz enzimsalád tagja, mely a 3 β -hidroxién-szteroid átalakítását katalizálja.



3. ábra: A ZEA átalakulása a metabolizáció során (Busk, 2011)

Ezt követően a második fázisban az α - és β -ZAL konjugálódik, melyet a glükuronil transzferáz nevű enzim végez el. Ennek következményeképpen a metabolitok a vizelettel már kiválasztódnak.

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

A ZEA lebontása két fázisban történik meg (3. ábra). Az első szakaszban a 3 α -HSD a hatos szénatomon lévő keto csoport leszakításával redukálja a toxint, mely ezáltal α - vagy β -zearalenollá alakul. Ezen bomlástermékek alakulnak tovább α - és β -zearalanollá azáltal, hogy a 11-12 szénatomok közötti kettős kötés felszakad (Fink-Gremmels–Malekinejad 2007).

mycotoxinivorans tüdőgyulladást okozott, így a mikroba emberi egészséget veszélyeztető hatása merült fel (2009).

Számos természetben jelenlevő prokarióta is rendelkezik mikotoxin-bontó képességgel. Szakirodalmi adatok alapján a *Streptomyces griseus*, és a *S. rutgersensis* fajról bizonyították toxinbontó tulajdonságukat (El-Sharkawy 1987). Ezen felül a *Rhodococcus* és *Pseudomonas* nemzetség tagjai kiemelkedő biotetoxifikációs képességgel bírnak zearalenon és aflatoxin-B1 tekintetében (Krifaton et al. 2011). Cserhádi és munkatársai (2013) 32 *Rhodococcus* törzs ZEA, aflatoxin B1 (AFB1), fumonizin B1 (FB1), T2 toxin és ochratoxin (OTA) bontási képességét vizsgálták. A vizsgált 32 törzsből a ZEA esetében 3, az AFB1 esetében 30, és a T2 esetében az összes törzs képes volt a toxin több mint 60%-át elbontani, melyek közül az AFB1 degradációja során 12, míg a ZEA bontása során pedig 3 törzs nemcsak jelentős toxinkoncentráció-csökkenést eredményezett, hanem a káros biológiai hatás (genotoxicitás, ösztrogénhatás) megszüntetésére is képes volt. Az OTA és az FB1 esetében már nem volt tapasztalható ilyen mértékű toxinbontás egyik *Rhodococcus* faj esetében sem. Hasonló eredményeket kaptak AFB1 bontás terén Alberts (2006) valamint Teniola (2005) és munkatársai is. Mindkét tudományos közlésben a *Rhodococcus erythropolis* törzs AFB1 bontási képességét vizsgálták sejtmentes kivonatokon. Alberts et al. (2006) eredményei szerint a vizsgált törzs közel 70%-os bontást végzett, míg Teniola et al. (2005) majdnem 100%-os toxinbontást tapasztalt. Mindkét esetben a törzs által végzett biotetoxifikációról beszélhetünk, mivel Ames tesztben vizsgálva nem tapasztaltak maradék mutagén vegyületeket. Teniola et al. (2005) bebizonyította, hogy az általa vizsgált törzs jóval hatékonyabb AFB1-bontásra képes, mint az ismert jól bontó *Nocardia corynebacterioides* DSM 12676 törzs (korábbi nevén *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184) (Ciegler et al 1966).

Ezidáig öt *Rhodococcus* törzs genomprojektje készült el. Ezek közül Kriszt és munkatársai elkészítették a *R. pyridinivorans* AK37-es törzs genomjának a felvételezését, mely szerint a törzs génjei között 117, aromás vegyületek bontására alkalmas enzimtermelő gént azonosítottak (Kriszt et al. 2012a).

2.5. A mikotoxinok vizsgálati módszerei

2.5.1. Kémiai analitika

A toxin elválasztására elsősorban kromatográfias módszereket használnak. A kromatográfia a kémiai analitika leggyakrabban alkalmazott módszere, mely a különböző

alkotók elválasztásán alapul. A módszer lényege, hogy a mintát egy ún. mozgófázisba juttatjuk. A rendszerben található még egy fázis is, az ún. állófázis, mely a kromatográfiás oszlopon kötött szemcsés hordozón található. A minta áthaladva az oszlopon kapcsolatba kerül az állófázissal, mely oldhatóságától függően hosszabb-rövidebb idő alatt kerül az oszlop végén található detektorba. A minta komponensei tehát eltérő oldódási sebességük következtében válnak szét (Kristóf 2000). Számos kromatográfiás eljárást alkalmaznak (vékonyréteg kromatográfia, gázkromatográfia-tömegspektrometria, magasnyomású-folyadék-kromatográfia) (Mézes 2009).

A magasnyomású-folyadék-kromatográfia (HPLC = High-Performance Liquid Chromatography) a legszélesebb körben alkalmazott kémiai analitikai módszer pontosságának és megbízhatóságának köszönhetően. A mozgófázis folyadék, mely ellentétben a gázkromatográfiával, kapcsolatba lép a mintával is. A mozgófázis két részre oszlik, egy mérő valamint egy referencia ágra. A mérés során a fölösleges gázokat eltávolítják. A HPLC vizsgálatoknál kétféle detektort alkalmaznak. Az egyik típus a mozgófázis azon tulajdonságait vizsgálja, mely a mintával való érintkezés következtében megváltozik. Ilyen lehet a sűrűség vagy a törésmutató. A másik típus a minta egyedi tulajdonságát, úgy, mint UV abszorbanciáját vagy fluoreszcenciáját méri (Kristóf 2000). A HPLC fluoreszcenciás detektálási módja sikeresen alkalmazható a ZEA és származékai esetében, köszönhetően azok természetes fluoreszkálásának (Gromadzka et al. 2008). Több toxin vizsgálatára alkalmas módszer is létezik, ilyen az összetett HPLC-MSMS, mely egy kromatográfiás elválasztást alkalmaz kiegészítve a további szelekciót lehetővé tevő kettő tömeg spektrométerrel (Búza – M. Schill 2010). Az állati takarmányokban megtalálható ZEA HPLC-vel történő vizsgálatának elfogadott szabványa az EN 15792:2009 (EFSA 2009). Hormonháztartást zavaró anyagok vizsgálatára is kiválóan alkalmazható, mely már szennyvizekből 0,1-0,5 ng/L, míg vízfelszínekből 1-2 ng/L tartományban mutatja ki ezen anyagokat (Young et al. 2004). Érzékenyebb a többi kromatográfiás módszerrel szemben. Hátrányaként említhető drágasága, időigényessége valamint, hogy megfelelő szaktudást igényel.

Számos esetben a mikotoxinok álcázottan vannak jelen, így detektálásuk kifejezetten nehézkessé válik. Jelenleg sajnos az erre alkalmas analitikai módszerek hiányoznak (EFSA, 2009).

2.5.2. Immunanalitikai módszerek

Széles körben alkalmazott módszer az ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), mely megbízhatóan alkalmazható mikotoxin vizsgálatok esetében is. A mikotoxinok

menyiségi meghatározása során a direkt ELISA tesztet alkalmazzák. A módszer alapja az antitestek azon tulajdonsága, mely szerint kiválóan meg tudják különböztetni a mikotoxinok háromdimenziós szerkezetét (Gromadzka et al. 2008). A vizsgálat microtiter lemezekon zajlik, ahol első lépésként immunglobulin G-t (IgG) kötnek a microplate falára. A megkötés után juttatják a microplate-re a toxint, vagyis az antigént. A toxin egy fehérjéhez, mint vivőanyaghoz kapcsolódik, mely az IgG-hez kötődik. A nemkötődő anyagok eltávolítása után újabb, már enzimmel jelzett immunanyagot juttatnak a plate-re, mely a megkötődött toxin másik feléhez kapcsolódik. Az alkalmazott enzim alkalikus foszfatáz, mely szubsztrátként para-nitrofenil foszfátot tartalmaz. Pozitív reakció esetén a szubsztrát para-nitrofenollá alakul, mellyel sárga színreakció következik be. A szín erőssége jelzi a mikotoxin koncentrációját (Clark – Adams 1977). Kevésbé pontos, mint a HPLC, viszont előnye, hogy olcsóbb, gyorsabb és egyszerűbben alkalmazható (http3).

2.6. Biológiai hatásmérés

Az emberi felhasználásból a környezetbe került vegyi anyagok illetve a természetes anyagok feldúsulása különös veszélyt jelent az emberekre, állatokra így az egész ökoszisztémára nézve is. Ezen anyagok élő szervezetekre gyakorolt hatásait vizsgáló és az élőlények válaszreakcióival foglalkozó tudományág a toxikológia. A toxikológia mérgekkel, mérgezést okozó hulladékokkal, anyagok toxicitásának kimutatásával, hatásmechanizmusával foglalkozik (http6). „A toxicitás tehát egy anyag káros hatása egy biológiai szervezetre” (Gruiz et al. 2001).

A biológiai hatáselemző tesztrendszerek célja pedig, hogy biológiai módszerekkel vizsgálják a szennyezőanyagok hatásait. Ismert és ismeretlen szennyezőanyagok környezeti hatásait is megismerhetjük a tesztrendszer válaszreakcióiból.

A biotesztek tervezése során elsődleges szempont a tesztrendszer kiválasztása, mivel azok reakciói alapján lehet következtetni a hatásokra, ezért ismernünk kell azok érzékenységét. Legalkalmasabbnak a legérzékenyebb szervezetek tekinthetők, mert azok engednek következtetni az egész ökoszisztéma érzékenységére is. Fontos szempont, hogy a választott tesztrendszer laboratóriumi körülmények között fenntartható legyen (Gruiz et al. 2001). A módszer és a mikroba kiválasztásakor tehát elsősorban a vizsgálati célt, valamint a vizsgálandó szennyezőanyagot és annak koncentrációját kell figyelembe venni (http7).

Az biológiai hatásmérésen alapuló tesztek lehetnek akut, néhány óra alatt lezajló, illetve krónikus, a tesztrendszer egész élettartama vagy reprodukciós ciklusa alatt zajló tesztek. Ezek a módszerek különböző toxicitási dózisokat és/vagy koncentrációkat mérnek,

különböző végpontokat vizsgálnak. A dózis a toxikológiai által alkalmazott azt a konkrét anyagmennyiséget jelöli, melyet egy organizmus különböző expozíciós útvonalakon felvesz. Ezzel szemben a biológiai hatásmérésnél dózis helyett környezeti koncentrációt alkalmazunk, mivel a környezetben jelenlevő szennyezés során nem tudjuk, hogy mely anyagok milyen arányban, mekkora mennyiségben vannak jelen, csak az általuk kiváltott biológiai hatás vizsgálható. A kapott eredmények függvényében rajzolhatjuk fel a szigmoid vagy S-alakú koncentráció-válasz görbét, mely megmutatja a növekvő koncentráció által kiváltott hatást (Gruiz et al. 2001).

A biológiai hatásmérő teszteknel alkalmazott mérési végpontok

Különböző mérési végpontok különböztethetők meg a krónikus és akut vizsgálatok kapcsán, amelyeket az 1. melléklet tartalmaz. Ezen vizsgálatok során a különböző szennyező anyagok koncentrációiban adjuk meg a kiválasztott tesztorganizmusokon mért hatást (fénykibocsátás változás, mozgásképtelenség, halál). A különböző koncentrációk mellett végpontként szolgálhat a különböző enzimek aktivitásának csökkenése is ([http7](#)).

A biológiai hatáselemző módszerek előnyei és hátrányai

A biológiai tesztrendszer kiválóan alkalmasak környezeti minták vizsgálatára, ugyanis általuk olyan hatásokra is fény derülhet, melyek a fizikai-kémiai módszerek számára rejtve maradnak, mivel a vizsgált paraméterek között nem szerepelnek. A biológiai hatásmérő és kémiai analitikai vizsgálatok együttesen alkalmasak annak a megállapítására, hogy mekkora kockázattal, milyen változás bekövetkeztével és milyen hatással jár az élő szervezetekre a szennyezőanyagok felszabadulása. A biológiai és a kémiai analitikai eredmények a következő módon térhetnek el egymástól:

- Az analitikai eredmények nagy szennyezőanyag koncentrációt mutatnak, míg a biológiai hatás kicsi. Ennek oka lehet, hogy a vegyi anyagok olyan kötött állapotban vannak, hogy kioldásuk biológiai folyamatokkal nem lehetséges, vagyis nem hozzáférhetőek.
- Előfordulhat az a jelenség is, hogy a kémiai analitikai eredmények nem támasztják alá a tapasztalt biológiai hatást. Ennek oka lehet, hogy olyan új ismeretlen anyag okozza a toxikus hatást, amely jelenlétét nem sejtjük, így analitikai módszerekkel nem is vizsgáljuk. Ezen kívül a fentebb említett, természetben tapasztalható antagonist/szinergista hatások is okozhatnak olyan toxikus körülményeket, amelyek analitikai módszerekkel nem elemezhetőek ([http7](#)).

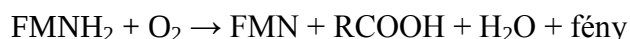
A biológiai hatáselemző módszerek számos előnnyel bírnak: gyorsak, pontosak, jól reprodukálhatók és a kémiai analitikához viszonyítva olcsóbbak is. Az vizsgálati módszerekre jellemző, hogy minél bonyolultabb a módszer annál nagyobb a környezeti realizmusa, de ezzel együtt egyre inkább nő a hely- és időigénye, valamint a költsége. A biológiai tesztrendszerek hátránya, hogy sokszor a laborban kapott eredmények nem vonatkoztathatók ténylegesen a környezetben lejátszódó folyamatokra, így alkalmazásuk csak az analitikai módszerekkel együttesen vezetnek célhoz (Calow 1993).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a négy alapvető szempont, melyet a biológiai hatáselemző módszerektől elvárhatunk: a reprodukálhatóság, az érzékenység, a megbízhatóság és a környezeti realizmus (Gruiz et al. 2001).

2.6.1. Biolumineszcencia, mint a toxicitás indikátora

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

A biolumineszcenciát a luciferáz enzim katalizálja, melynek szubsztrátja egy hosszú szénláncú alifás aldehid, flavin mononukleotid (FMN), elsődleges elektron donor a NADH, és szükség van továbbá oxigénre. A fénykibocsátást a lumineszcencia rendszer vezérli, melynek meghatározó *lux* génjeit izolálták például *Vibrio* és *Photobacterium*, valamint a szárazföldi *Xenorhabdus* fajokból. A biolumineszcens baktériumok a *luxCDABE* operont tartalmazzák, mely egy heterodimer luciferáz enzimet (luciferáz α - és β -alegység), valamint annak szubsztrátját, egy hosszú szénláncú zsíraldehidet előállító enzimkomplext kódol. A luciferáz a zsíraldehidet és a redukált flavin mononukleotidot (FMNH₂) oxidálja, mely reakció során az energia kékeszöld, 490 nm körüli hullámhosszú fény formájában szabadul fel.



A luciferáz és a szubsztrátok keveredése gyorsan zajlik le. Ezt követően az enzim keresztülmegy egy körfolyamaton, mely alatt a fénykibocsátás eléri a maximumát. Ha a FMNH₂ ellátása a sejtben folyamatos, akkor a fény állandó szinten marad.

A bakteriális *lux* génkazetta (*luxCDABE*) által indított fénykibocsátáshoz nincs szükség külső szubsztrátra, így viszonylag gyors reakcióról beszélhetünk.

A biolumineszcencia szoros kapcsolatban áll a sejt életképességével, metabolikus állapotával. Ennek köszönhetően egy szennyezőanyaggal kapcsoltba kerülve, a sejten beüli változásokra utalva következik be a fénykibocsátás.

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

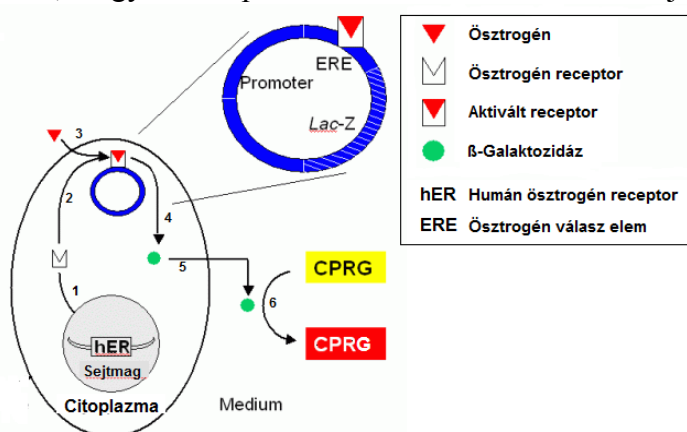
2.6.2. Ösztrogén kimutatására alkalmas módszerek

Az ösztrogénhatás mérésére számos *in vivo* és *in vitro* módszer áll a rendelkezésre, melyek magas érzékenységgel bírnak, így alkalmasak a receptorkapcsolt agonista és antagonisták hatásainak mérésére. *In vitro* kategóriában a következő tesztek léteznek:

- Ligandumkötő módszer
- Sejtszaporodás vizsgálat
- Utólagos sejtfelhalmozódás vizsgálata
- Fehérjeátírás illetve enzimaktivitás indukálása
- Rekombináns receptor/riporter gén vizsgálat: speciális endokrin receptorok által keltett biológiai folyamatok előidézésének illetve elnyomásának vizsgálata

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

Az *Saccharomyces cerevisiae* mikroszkópikus élesztőgomba DNS-ébe egy humán ösztrogén receptort integráltak, illetve a sejt plazmidon kódolt ösztrogén válasz elemeket tartalmaz, melyek szabályozzák a *lacZ* gén átíródásának folyamatát. A receptor és az ösztrogén válasz elem kapcsolódását követően az átíródásért felelős faktorokkal szabályozzák a *lacZ* gén átíródását. Annak érdekében, hogy a receptorok aktivitása mérhetővé váljon, szükség van egy szubsztrát, a vörös színű klorofenol- β -D-galaktopiranozid (CPRG) hozzáadására, mely indukál egy enzimátikus terméket, a színreakciót előidéző β -galaktozidázt. Ez a sárgából vörösbe váltó kolorimetriás reakció mérhető 540 nm-en (4. ábra).



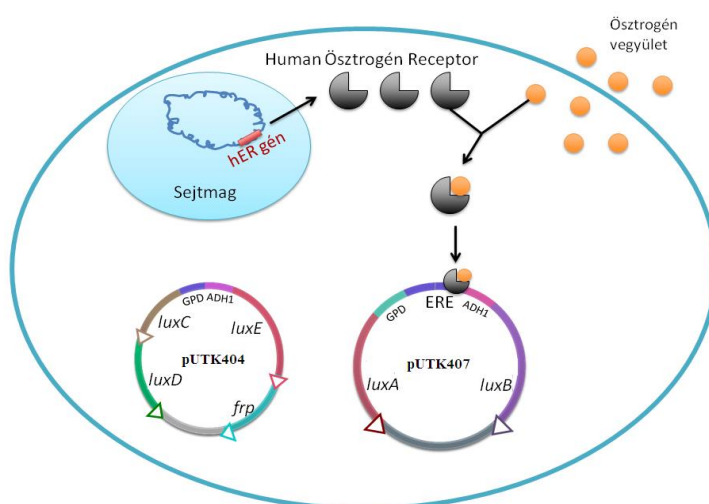
4. ábra: A YES-teszt működési elve (Routledge–Sumpter 1995)

A reakció 3-5 napos inkubáció alatt zajlik le, így igencsak lassú tesztről van szó. A folyamatot bonyolítja az említett szubsztrát hozzáadása is (Routledge–Sumpter, 1995).

2.6.3. A BLYES/BLYR tesztrendszer

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

Mindkét plazmidon divergens (szétágazó) promóterek (GPD és ADH1) találhatóak, így az átírás egyszerre kétirányú folyamatban játszódik le. A pUTK407 promótereinek közé beillesztettek tandem (egymás után ismétlődő) ösztrogén válaszelemeket, amelyek elindítják a plazmid átíródását, és egyszerre expresszálják a luxA és luxB gént. Ezzel együtt a másik plazmidra (pUTK404) egy közbenső riboszóma belépési hely (IRES) lett inszertálva, amely az eukarióta szervezeteken az összetett gének átíródásához szükséges. Így lehetséges a plazmidon a luxC, -D, valamint a luxE és az frp gének együttes átírása (5. ábra).



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

A BLYES törzssel egy időben alkalmazott konstitutív kontroll törzs a citotoxicitás mérésére alkalmas *Saccharomyces cerevisiae* BLYR törzs (Sanseverino et al. 2008, [http8](http://8)). A BLYR törzs esetében a biolumineszcenciáért felelős gének átíródása állandó, viszont a sejt életfeltételeire károsan ható anyagok következtében lumineszcencia gátlás tapasztalható

(Sanseverino et al. 2008).

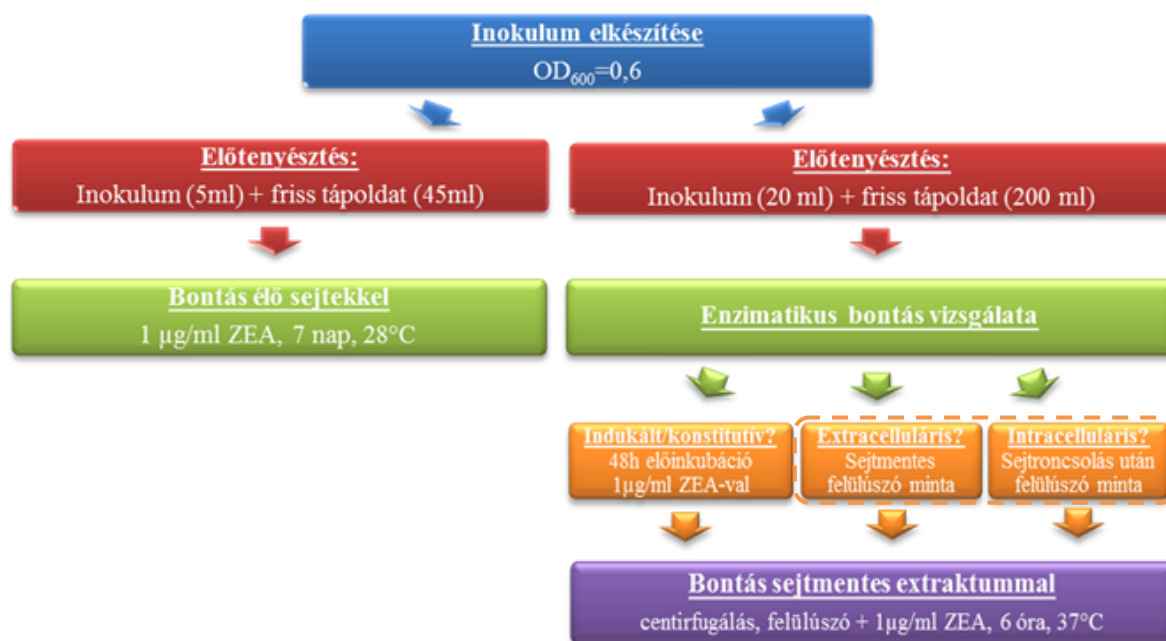
A hormonhatás és a citotoxikus hatás mérésére alkalmas bioripporter rendszerrel már 3-5 órás inkubációs idő elteltével is megbízható információt kapunk a vizsgált mintáról. A BLYES és a BLYR rendszerek esetében szubsztrát hozzáadására nincs szükség (Sanseverino 2005, Sanseverino 2008).

3. Módszerek

3.1. Bontási kísérlet

Vizsgálataink során szénhidrogénnel szennyezett területekről izolált, már meglévő törzsgyűjteménybe tartozó mikroszervezetekkel dolgoztunk, amelyek előzetesen igazolt mikotoxin-bontó képességgel rendelkeznek. Ezen mikroszervezeteket bontási kísérletbe állítottuk, a bontási rendszerekből származó felülúszó mintákat pedig egy komplex vizsgálati rendszerrel vizsgáltuk, amely magába foglalta a biológiai (BLYES és BLYR), kémiai analitikai (HPLC-FLD), és immunanalitikai (ELISA) módszereket. A kísérlet felépítését és a különböző vizsgálati irányokat az 6. ábra foglalja össze.

A kísérletekhez a ZEA toxint a Fermentek Kft-től (Izrael) szereztük be és acetonban oldottuk. Törzsoldatot készítettünk 1000 µg/ml-es koncentrációban, amelyet a különböző vizsgálati irányokhoz használtunk fel.



6. ábra: A bontási kísérlet lépései

A bontási kísérletbe vont mikroszervezetek

- *Rhodococcus erythropolis* NI1
- *Rhodococcus pyridinivorans* AK37
- *Rhodococcus pyridinivorans* K402
- *Rhodococcus pyridinivorans* K404
- *Rhodococcus pyridinivorans* K408

- *Rhodococcus ruber* N361
- *Rhodococcus gluberulus* N58
- *Rhodococcus aetherivorans* AK44

3.1.1. Inokulum és előtenyészet

A bontási kísérletre választott, -80°C-on tárolt törzseket LB agarra szélesztve inkubáltuk 28°C-on 72 órán keresztül. A telepek tisztaságának ellenőrzése után inokulumot készítettünk, melynek során egyetlen tiszta telepet oltottunk frissen készített LB tápoldatba és rázattuk (28°C, 170 rpm) 24 órán keresztül.



1. kép: A bontási rendszerek a termosztátban (saját fotó)

Az inokulumok sejtsűrűségét beállítottuk $OD_{600} = 0,6$ -ra, amelyből a bontási kísérletek előtenyészetéhez 5 ml-t oltottunk 45 ml friss tápoldatba, ezután összeállítottuk az élő sejt bontási kísérletet.

3.1.2. Bontási kísérlet élő sejtekkel

Az élő sejt biodegradációs kísérlet 50 ml LB tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikban (300 ml), 3 párhuzamos rendszer beállításával történt (1. kép). A bontási kísérletek során az előtenyészetet 1 µg/ml ZEA-val kontamináltuk. A bontás során alkalmaztunk egy mikrobamentes kontrollt, amely szintén 1 µg/ml ZEA-val kontaminált 50 ml LB tápoldatot tartalmazott.

A kísérleti rendszereket 7 napon keresztül inkubáltuk (28°C, 170 rpm), és a párhuzamos bontási rendszereket 24 óránként mintáztuk (2. kép). A mintákat lecentrifugáltuk (15000 rpm, 4°C, 20 min.), a felülúszót dekantáltuk és a pellettől külön tároltuk -20°C-on a további vizsgálatokig.



2. kép: Mintavételezés (saját fotó)

A felülúszót és a pelletet akkreditált kémiai analitikai laboratóriumok vizsgálták, a Wessling Hungary Kft. nagyteljesítményű folyadék-kromatográfia módszerrel (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), illetve a Soft Flow Hungary Kft. ELISA módszerrel. A degradációs kísérlet felülúszó mintáit pedig biológiai hatáselemzés

alá vontuk, amely során a két biolumineszcens élesztő alapú bioripporter tesztorganizmust, a BLYES (hormonhatást vizsgáló) és a BLYR (citotoxikus hatást vizsgáló) tesztorganizmust alkalmaztuk.

3.1.3. Bontási kísérlet sejtmentes kivonatokkal

A sejtmentes kivonatokkal végzett bontáshoz a fent említett törzsek mintáit alkalmaztuk, amelyben a pelletet a felülúszótól szétválasztottuk. Annak felderítésére, hogy a bontásban résztvevő enzimek termelődése konstitutív (állandóan termelődő) vagy indukált (a szennyezőanyag jelenléte váltja ki a bontóenzimek termelődését) az alábbi módszereket alkalmaztuk. A ZEA által indukált enzimek jelenlétét előkezeléssel vizsgáltuk, mely során a rázatott sejtes előtenyészeteket (3.1.1. alfejezet) 1 µg/ml-es ZEA-koncentrációval 48 órán keresztül előinkubáltuk, míg a konstitutívan termelődő enzimek vizsgálatához nem alkalmaztunk előkezelést.

További kísérleteket folytattunk az extra- és az intracelluláris enzimek vizsgálatára, így a mintákat kétféle módon kezeltük: az extracelluláris enzimeket az inokulum (3.1.1 fejezet) lecentrifugálása (4°C, 4000 rpm, 20 perc) után annak felülúszó frakciójában vizsgáltuk, míg az intracelluláris enzimek hozzáférhetősége érdekében a felszaporított sejtszuszpenzióból ultrahangos feltárás után nyertük ki a sejtmentes extraktumot. Ennek folyamata során a felszaporított előtenyészetek előállítását követően a sejteket kétszer átmostuk és a kinyert enzimek stabilitásának biztosítására foszfát puffert (pH=7) alkalmaztunk. A sejtek átmosása után 1 g biomasszát 3 ml pufferben oldottunk vissza. Ezután cirkónium port adtunk a sejtszuszpenziókhoz, majd azokat ultrahangos roncsolóba (Branson Digital Sonifier®) helyeztük és 6*1 percreg szonikáltuk. Ezt követte a szintén 20 perces centrifugálás 4°C-on 4000 rpm-en. A centrifugálást követően az előzetesen ultrahangos roncsoláson átesett sejtek felülúszó mintáit 0,2 µm-es pórusátmérőjű membránon szűrtük át, majd ezekből állítottuk össze az újabb bontási rendszereket.

A teszt Eppendorf csövekben zajlott, melyekbe 1 ml kivonatot mértünk, amit ZEA-val kontamináltunk 1 µg/ml végkoncentráció eléréséig. A bontási rendszer az egyes törzsekből 3 párhuzamost tartalmazott, melyek mellé ZEA-val kezelt tápoldatot tartalmazó kontrollt állítottunk be. A sejtmentes extraktumokkal végzett kísérletet 37°C-on végeztük. A kísérlet 6 órán keresztül zajlott, a kísérleti rendszereket pedig óránként mintáztuk, majd -20°C-on tároltuk a BLYES/BLYR hatáselemző rendszerekkel történő feldolgozásig.

A maradék hormonhatás értékelése minden kísérletnél az élesztő alapú tesztrendszerrel történt.

3.2. A bontás értékelése

3.2.1.1. Előkísérletek és a teszt standardizálása

Az élesztők szaporításához uracil és leucin szelektív tápoldatot (YMM_{ura-, leu-}) alkalmaztunk, amelyet 5 további oldattal egészítettünk ki: vitamin oldat (mely tiamint, piridoxint, pantoténsavat, inozitolt és biotin oldatot tartalmaz), 20%-os glükóz oldat, L-aszparaginsav oldat, L-treonin oldat és réz-szulfát oldat (2. melléklet). Minden összetevőt autoklávbán sterilizáltunk (121°C, 1,2 bar) a vitamin oldat és a réz-szulfát oldat kivételével, amelyeket pedig 0,2 µm pórusátmérőjű membránszűrőn szűrtünk át. Az összeállítást lamináris boxban, steril eszközökkel végeztük a befertőződés elkerülése végett. Miután a tápoldat elkészült a -80°C-on tárolt BLYES (3. kép) és BLYR (4. kép) inokulumot 250 ml-es Erlenmeyer lombikban szaporítottuk 30 ml tápoldatban, majd termosztátban rázattuk (30°C, 200 rpm). A törzsszuspenziót egy éjszakán keresztül szaporítottuk, majd sejtsűrűségét 600 nm-en (OD₆₀₀) 1-re állítottuk be (Sanseverino, 2008).



3. kép: A BLYES törzs táptalajon



4. kép: A BLYR törzs táptalajon

A vizsgálatok során a mintákat fehér microtiter lemezekben vizsgáltuk. Először a pozitív kontrollok beállítása történt. A lemezekben elkészítettük a ZEA-nak és annak két fő metabolitjának (α - és β -zearalenol) hígítási sorát. Hígító oldatként metanolt használtunk. A kiindulási koncentráció Sanseverino és munkatársai leírását követve 31,84 µg/ml volt, melyet 3,18E-05 µg/ml végkoncentrációig hígítottunk.

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

A minták és a kontrollok kiadagolása (20 µl/microwell) után a beállított sejtsűrűségű tesztstruktúrát 200 µl-ét adagoltuk a microplate megfelelő részeibe és a microlemezt 30°C-on

inkubáltuk 5 órán keresztül. Ellenőriztük a kezdő fénykibocsátást, majd óránként mértük VictorX Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer Inc.) segítségével.

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

A BLYES tesztszervezet értékelése során meghatároztuk a pozitív kontroll EC_{50} értékét, amely az 50%-os lumineszcencia változást okozó hatásos koncentráció értéket fejezi ki. A hormonhatás és a citotoxicitás meghatározása során első lépésként felrajzoltuk a mért értékekből kapott grafikonokat, melyek szabályos szigmoid alakot mutattak. Az S-görbe egyenes szakaszára lineárist illesztettünk, melynek egyenlete alapján kaptuk meg a minta fénykibocsátásának 50%-os csökkenését eredményező toxicitási értéket.

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

3.2.1.2. BLYES/BLYR biológia hatáselemző rendszerek adaptálása a ZEA bontási kísérlethez

A tesztszervezetek előkészítése a 3.2.1.1. pontban leírtaknak megfelelően történt. Az élő sejt bontási kísérlet mintáiból 1:2 hígítási sort készítettünk, míg a sejtmentes kivonatok esetében pontmintákat alkalmaztunk, melyekből 20 μ l-t adagoltunk a microplate megfelelő részeibe. A vizsgálatok során pozitív kontrollként a bontási kísérletben alkalmazott ZEA oldatot alkalmaztunk, illetve az tesztet a 3.2.1.1. pontban ismertetett módon folytattuk.

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

Az intenzitási érték egyenlete:

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

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

3.2.2. HPLC

A kémiai analitikai tesztelést a Wessling Hungary Kft. akkreditált laboratóriuma végezte. A mért koncentrációt HPLC-FLD módszerrel, vagyis fluoreszcens detektorral felszerelt folyadék-kromatográffal határozták meg. A metanol-víz 1:1-es keverékéből álló hígítás után a minta 50 µl-e lett a HPLC-FLD rendszerbe injektálva (AOAC Official Method 985.18, melynek számszerűsítési határa 10 µg/l). A szétválasztás a C18-as oszlopon (Vydec Denali, 4.6x150 mm; 5 µm) izokratikus körülmények között történt. Ehhez 45:55 arányú víz-acetonitril oldatot használtak. A ZEA-t 274 nm (extinkció) és 440 nm (emisszió) hullámhosszon detektálták.

3.2.3. ELISA tesztek

A toxinkoncentrációk meghatározását a Soft Flow Hungary Kft. végezte ELISA Kittel, Toxiwatch rendszerben, melynek kimutathatósági tartománya 8–1 ng/ml, a detektálási határ 0,142 ng/ml, a mérési határérték pedig 0,79 ng/ml volt. A vizsgálatok a gyártó útmutatásai szerint folytak. A Toxiwatch ELISA Kit metanol (7,5%) alapú toxin extrakciós módszert használ, ezért a standard sornak is tartalmaznia kellett metanolt. Mivel a bakteriális sejtfelülűszo mátrixa LB médium, amely nem tartalmaz metanolt, így metanolt nem tartalmazó standard pontokat is alkalmaztak. A mintákat három párhuzamos rendszerben vizsgálták.

3.2.4. Statisztikai értékelés

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

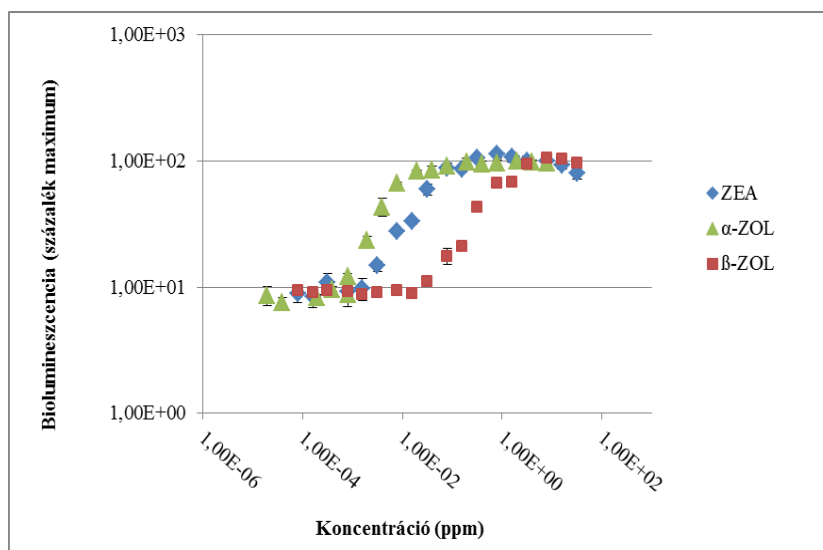
4. Eredmények

Eredményeink bemutatását a BLYES/BLYR tesztrendszer validálásával és érzékenysége megállapításával kezdeném, hiszen ennek a tesztnek az ZEA-ra vonatkoztatott érzékenysége dózis-válasz összefüggésben, valamint kimutathatósági határa meghatározta a további bontási kísérletekben alkalmazott ZEA koncentrációkat.

4.1. A BLYES, BLYR tesztrendszer előkísérletei

A biológiai hatáselemzés kivitelezésekor a vizsgálatok első részeként a tesztrendszer működését ellenőriztük. Szakirodalmi adatok alapján a ZEA EC_{50} értéke $1,90E-06$ mol/dm³ (Sanseverino et al. 2008), míg az α - és β -zearalenol esetében nem állt rendelkezésre szakirodalmi adat.

A ZEA-nak és annak két fő metabolitjának (α - és β -zearalenol) fénykibocsátási értékei alapján a 7. ábrán látható görbéket kaptuk, melyek lineárisa alapján kiszámítottuk az 50%-os fénykibocsátást okozó koncentrációs értéket (EC_{50}) és emellett meghatároztuk a legkisebb hatást okozó koncentrációs (LOEC) értékeket is, melyek a 2. táblázatban láthatóak.



7. ábra: A BLYES tesztrendszer zearalenon hatására mutatott biolumineszcencia értékei

2. táblázat: A zearalenonnak és metabolitjainak toxicitási értékei

	ZEA	α -ZOL	β -ZOL
EC_{50} (μ g/ml)	0,09	0,066	0,95
LOEC (μ g/ml)	0,003	0,002	0,016

A ZEA BLYES tesztrendszerre kifejttet hatásos koncentráció értéket alapul véve (tesztben 0,09 μ g/ml hatóanyag okozott 50% lumineszcencia változást) az alkalmazott oldatkonzentráció 0,99 μ g/ml volt. Ebből kiindulva a bontási kísérletek kiindulási koncentrációját az élesztő érzékenységéhez igazítva 1 μ g/ml koncentrációra állítottuk be,

valamint azt is megállapíthattuk, hogy a tesztorganizmus a ZEA mellett annak két metabolitját is detektálni tudja. Az α -ZOL esetében már kisebb koncentráció is kimutatható, köszönhetően a szakirodalomból is ismert tulajdonságának, miszerint erősebb ösztrogén receptor affinitást mutat (erősebb ösztrogénhatással rendelkezik), mint a ZEA vagy a β -ZOL. Mindenesetre a β -ZOL ösztrogénhatása is kimutatható a BLYES teszttel.

A BLYR citotoxicitást mérő törzzsel nem mértünk gátló hatást.

4.2. A bontási kísérlet értékelése

A kísérleteink során a vizsgálni kívánt mikroszervezetek esetében a bontási potenciált hasonlítottuk össze a mikroszervezetek azon képességével, hogy milyen mértékben képesek a káros biológiai hatás megszüntetésére.

4.2.1. A bontási kísérlet értékelése analitikai módszerekkel

Az analitikai eredmények alapján a mikroszervezetek bontási potenciáljuk szempontjából három csoportra oszthatók (3. táblázat):

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

3. táblázat - A zearalenon bontási kísérletbe vont mikrobatorzsek mikotoxin-bontási potenciálja kémiai analitikai (HPLC) és immunanalitikai (ELISA) mérésekkel

		HPLC Bontási potenciál (%)	ELISA Bontási potenciál (%)
I.	<i>R. pyridinivorans</i> K402	93,63 $\pm$ 4,31	93,02 $\pm$ 0,76
	<i>R. pyridinivorans</i> K404	90,93 $\pm$ 0,53	93,00 $\pm$ 0,36
II.	<i>R. pyridinivorans</i> K408	87,24 $\pm$ 2,83	85,39 $\pm$ 1,02
	<i>R. erythropolis</i> NI1	75,95 $\pm$ 1,00	70,93 $\pm$ 2,56
	<i>R. pyridinivorans</i> AK37	61,14 $\pm$ 2,77	64,67 $\pm$ 1,77
	<i>R. ruber</i> N361	54,70 $\pm$ 3,46	54,60 $\pm$ 3,33
III.	<i>R. aetherivorans</i> AK44	27,12 $\pm$ 2,24	30,64 $\pm$ 2,13
	<i>R. globerulus</i> N58	26,24 $\pm$ 20,93	19,92 $\pm$ 15,87

Az analitikai eredmények alapján két törzs esetében tapasztaltunk kiváló ZEA bontást. A *R. pyridinivorans* K402 és a *R. pyridinivorans* K404 90%-hoz közeli bontást mutattak, így majdnem teljes mértékben képesek voltak csökkenteni az ösztrogénhatást.

A vizsgált törzsek nagy százalékban eredményesnek bizonyultak, így a következő négy törzs hatékony, több mint 50%-os ZEA biodegradációs képességével jól bontó

mikrobáknak mondhatók. Ezek közül is kiemelkedő volt a *R. pyridinivorans* K408 több mint 80%-os ZEA bontási képességgel. A *R. erythropolis* NI1 jelzésű törzs az 1 µg/ml ZEA több mint 70%-át volt képes eliminálni, míg a *R. pyridinivorans* AK37 több mint 60%-át bontotta a toxinnak. Ezekhez képest kismértékben alulmarad a *R. ruber* N361 50%-közeli biodegradációs képességével.

A harmadik csoportba tartozó mikroszervezetek a toxinnak csak jóval kevesebb, mint a felét degradálták. A *R. aetherivorans* AK44 és a *R. globulus* N58 20-30% körüli bontásával még képes volt a ZEA szerkezetének kismértékű megbontására, de eszerint a százalékos eredmény szerint már a ZEA bontására nem alkalmasak.

A HPLC és az ELISA eredmények között szoros egyenes arányú összefüggés tapasztalható. A statisztikai értékelésnél Pearson-féle korrelációt alkalmaztuk, amely a lineáris korrelációs együttható speciális esetének tekinthető. A módszer a kapcsolat szorosságának mérésére a két változó rangszámainak különbségét használja fel. Amennyiben szoros kapcsolat fedezhető fel a változók között, úgy az együttható nagyobb, mint 0,6. Esetünkben a Pearson-féle korreláció a HPLC és ELISA eredmények tekintetében 0,92 volt, tehát két módszer eredményei szoros egyenes arányú összefüggést mutatnak egymással.

4.2.2. A bontási kísérlet értékelése maradék biológiai hatás alapján

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

A bontási kísérletek ideje alatt naponta ill. óránként levett, 3 párhuzamosból álló mintáinkat biológiai hatáselemzésnek vetettük alá. A BLYR tesztsszervezettel maradék citotoxikus hatást egyik esetben sem tapasztaltunk, így eredményeinket extrapolálva magasabb szerveződési szintekre, azt feltételezhetjük, hogy a törzsek esetében nincs káros sejtnövekedést gátló hatás. Mindezek mellett ezen eredmények azt is jelentik, hogy a tesztsszervezet növekedésgátlásának vizsgálatára alkalmazott kontroll esetében a *S. cerevisiae* tesztsszervezetre a minták nem fejtenek ki gátló hatást, tehát a hormonhatás vizsgálatára alkalmazott BLYES törzs eredményei megbízhatóan fogják a hormonhatást jelezni. A minták hormonhatását a bontás során alkalmazott mikrobamentes kontrollhoz viszonyítottuk, amelyben bontó mikroorganizmusok hiányában hormonhatás a bontás ideje alatt állandó maradt.

Az előinkubációs kísérlet nem eredményezett eltérést az előinkubáció nélkül történő kísérletekhez képest, így a továbbiakban az élő sejtes kísérletet, valamint az intra- és az

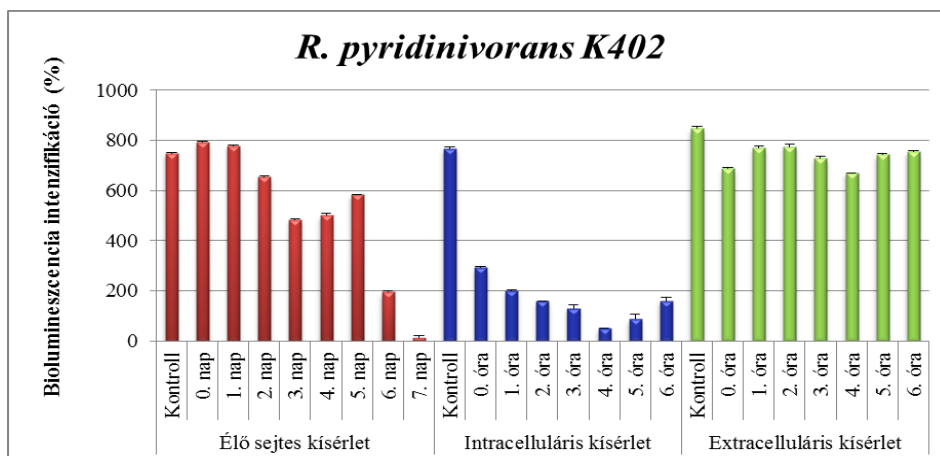
extracelluláris kísérletet részletezném. A három kezelésből kapott eredményeket az összehasonlíthatóság érdekében egy grafikonon, minden törzsnél külön ábrázoltuk, melyeket a következőkben ismertetnék.

4.2.3. A bontási kísérlet komplex értékelése

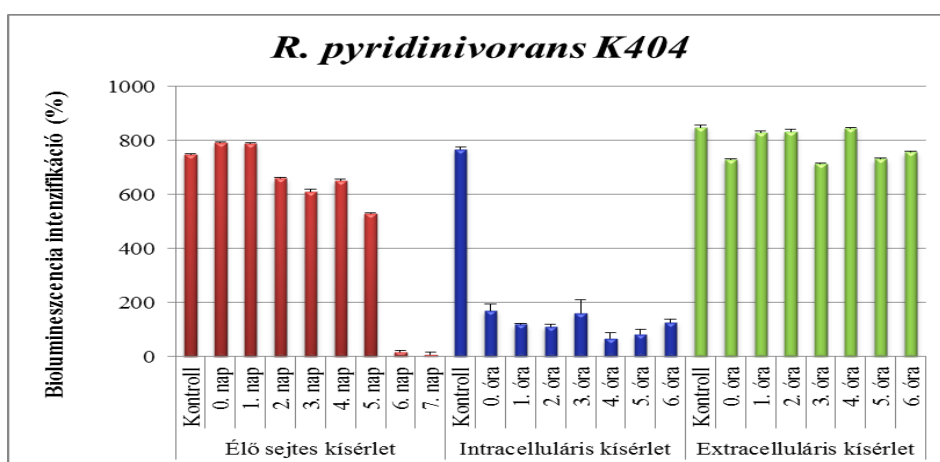
A bontási kísérlet során tapasztalt hormonhatás részletező értékelése következik a mikroszervezetek bontási potenciálja alapján, amelyet az analitikai eredmények alapján alakítottuk ki (4.2.1. fejezet). A hormonhatás csökkenése minden esetben a ZEA biotransformációjára enged következtetni. Az értékelés során az ábrák (8-19. ábra) az egyes mikroorganizmusokkal végzett ZEA-biodegradációt mutatják a kísérletek teljes időtartama alatt. A x tengelyen minden esetben a három különböző kísérleti beállítást tüntettük fel: az élősejtes biodegradációt, illetve a sejtmentes extraktummal végzett, intra- és extracelluláris enzimek vizsgálatára irányuló beállítást. Az y tengelyen a BLYES teszt eredményei láthatók, ahol a nagyobb biolumineszcencia intenzitási érték, nagyobb maradék hormonhatást mutat, amely gyengébb biodegradációs képességre enged következtetni. Az eredmények három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a szórás értékeket pedig hibaszalakkal tüntettük fel minden esetben.

I. Kiváló bontási potenciállal rendelkező törzsek

Az analitikai eredmények szerinti kiváló bontótörzsek, a K402 és K404 eredményei a 8. és a 9. ábrán láthatóak. A három kísérleti beállítás (élő sejtes, intracelluláris, extracelluláris) közül hormonhatás csökkenés két esetben látható. Az élő sejtes kísérletben a 7. napon tapasztalt ösztrogénhatás megszűnése igazolta az analitikai eredmények alapján mért biodegradációt. A sejtmentes kivonatokkal végzett kísérlet során az élő sejtes kísérletben tapasztalt biodegradációt az ultrahangos roncsoláson átesett törzsek vizsgálata során mért ösztrogénhatás csökkenés igazolta. A K402 és a K404 jelzésű törzsek intracelluláris enzimjeit tartalmazó mátrix a ZEA-val érintkezve rögtön csökkentette annak ösztrogénhatását és a kísérlet végére nagymértékű biológiai hatáscsökkenés volt tapasztalható, így feltételezhető a ZEA biodegradációja. Ezzel ellentétben a kezeletlen felülszóval végzett biodegradációs kísérletben számottevő biolumineszcencia csökkenés nem volt mérhető, hiszen egyik törzs extracelluláris kivonata sem tudta a ZEA hormonhatását csökkenteni.



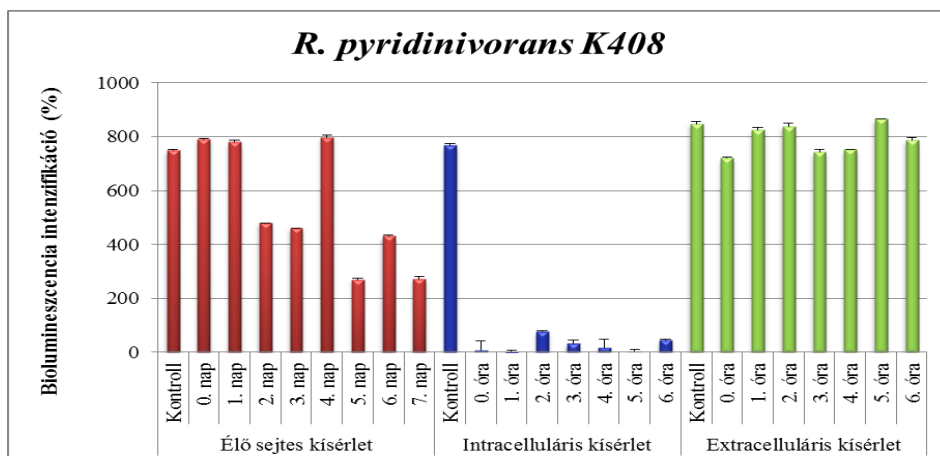
8. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *R. pyridinivorans* K402 jelzésű törzs élősejtes és sejtmentes extraktumával (intracelluláris és extracelluláris beállítás zearalenon biodegradáció esetén)



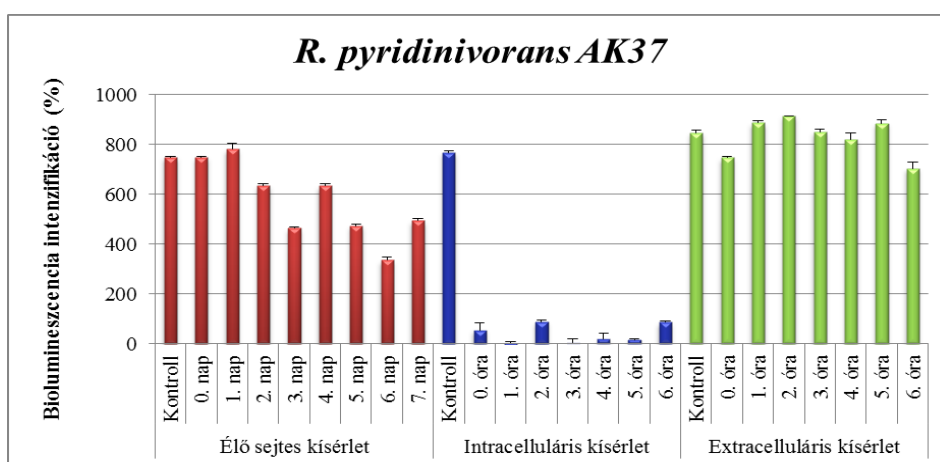
9. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *R. pyridinivorans* K404 jelzésű törzs élősejtes és sejtmentes extraktumaival (intracelluláris és extracelluláris beállítás) zearalenon biodegradáció esetén

II. Jó bontási potenciállal rendelkező törzsek

A K408 és az AK37 esetében érdekesség figyelhető meg, melyet a 10. és a 11. ábra szemléltet. Az analitikai eredmények alapján elmaradt a biodegradáció a kiválóan bontó törzsekhez képest, és biodetoxifikációs szempontból (bár jelentős volt a hormonhatás csökkenés) az élő sejttes kísérletek is mutattak maradék hormonhatást. A sejtmentes kivonatok esetében viszont jelentős hormonhatás csökkenést mutatott mindkét törzs ugyanazokban a kísérletekben. Az ábrákon jól látszik, hogy ez esetekben is az élő sejttes és a szonikált sejttes (intracelluláris) kísérlet eredményezett fénykibocsátás csökkenést, ám amikor a sejtfalat a bontás előtt ultrahanggal roncsoltuk a fénykibocsátás csökkenés jóval nagyobb mértékű volt, mint mikor élő sejttel történt a biodegradáció. A tiszta felulúszós kísérletben biolumineszcencia csökkenés nem történt.



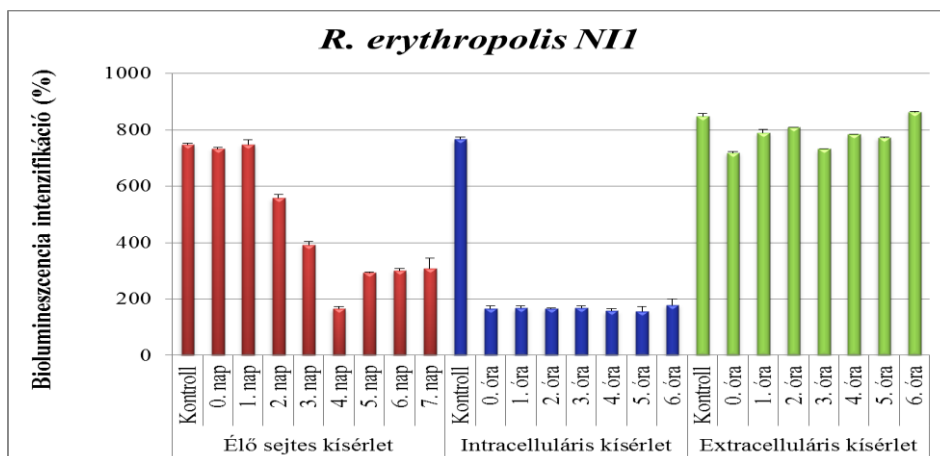
10. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *R. pyridinivorans* K408 jelzésű törzs élősejtes és sejtmentes extraktumával (intracelluláris és extracelluláris beállítás) zearalenon biodegradáció esetén



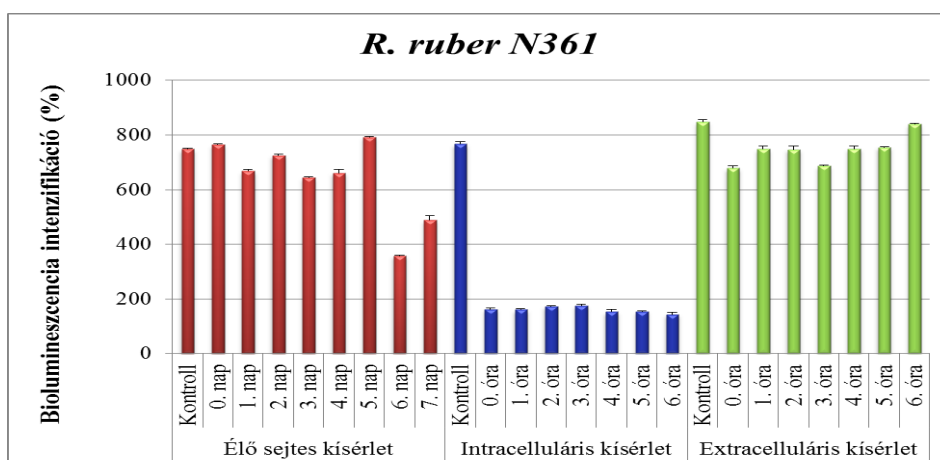
11. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *R. pyridinivorans* AK37 jelzésű törzs élősejtes és sejtmentes extraktumával (intracelluláris és extracelluláris beállítás) zearalenon biodegradáció esetén

A soron következő törzseknél, az NI1 és az N361 jelű törzseknél mért eredmények a 12. és 13. ábrán láthatók. A nevezett törzsek jó ZEA-bontását ezekben az esetben is az ultrahangos roncsolással kezelt extraktumban tudtuk megismételni. Figyelemreméltó eredményt mutat az N361, melynél az intracelluláris kísérletben az élő sejt biodegradációval összehasonlítva jóval nagyobb mértékű fénykibocsátás csökkenés volt mérhető.

Az extracelluláris kísérletekben pedig egyik törzs esetében sem volt tapasztalható ösztrogénhatás csökkenés.



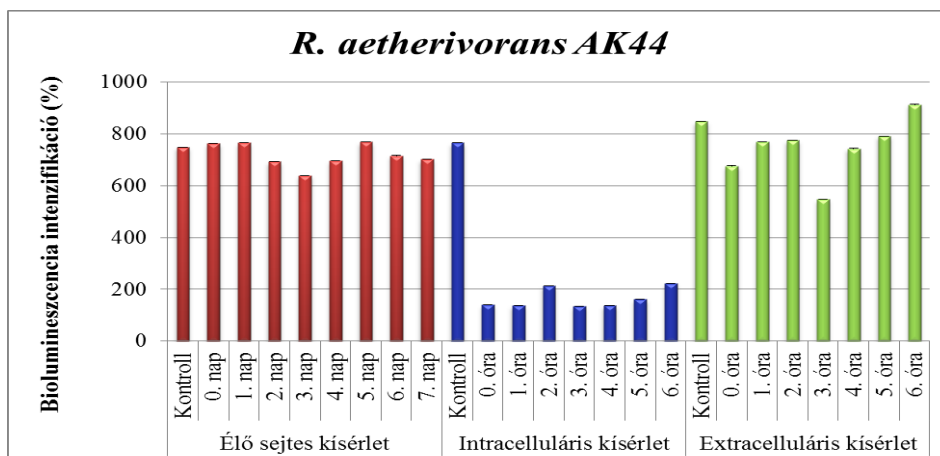
12. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *R. erythropolis* NI1 jelzésű törzs élősejtes és sejtmentes extraktumával (intracelluláris és extracelluláris beállítás) zearalenon biodegradáció esetén



13. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *R. ruber* N361 jelzésű törzs élősejtes és sejtmentes extraktumával (intracelluláris és extracelluláris beállítás) zearalenon biodegradáció esetén

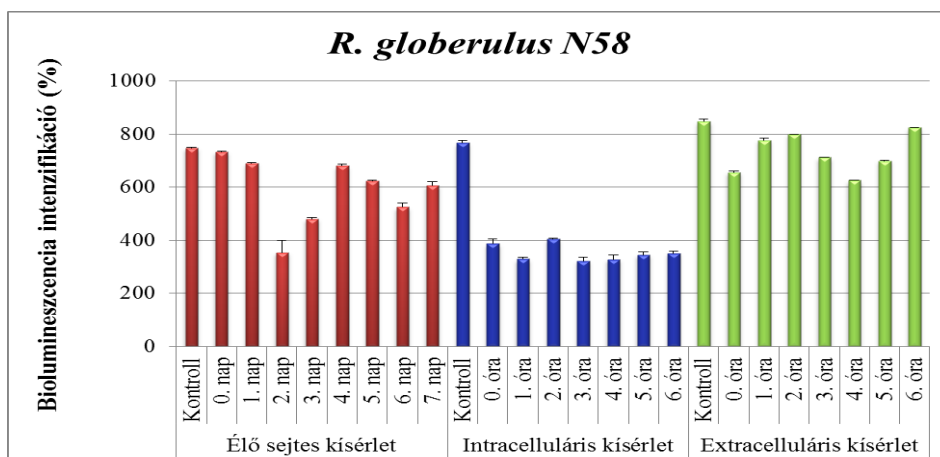
III. Elégtelen bontási potenciállal rendelkező törzsek

Az AK44 esetében (14. ábra) az analitikai eredmények kismértékű degradációt mutattak, amelyet az élő sejttes kísérlet hormonhatás eredményei is alátámasztottak biotetoxifikációs szempontból. Ezzel ellentétben az intracelluláris kísérletek számottevő hormonhatás csökkenést mutattak, így az analitikai mérések megismétlése javasolt lehet. Az extracelluláris kísérlet során a fénykibocsátás csökkenni kezdett, de ez végül újra megemelkedett, így a biodegradáció nem ment végbe.



14. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *R. aetherivorans* AK44 jelzésű törzs élősejtes és sejtmentes extraktumával (intracelluláris és extracelluláris beállítás) zearalenon biodegradáció esetén

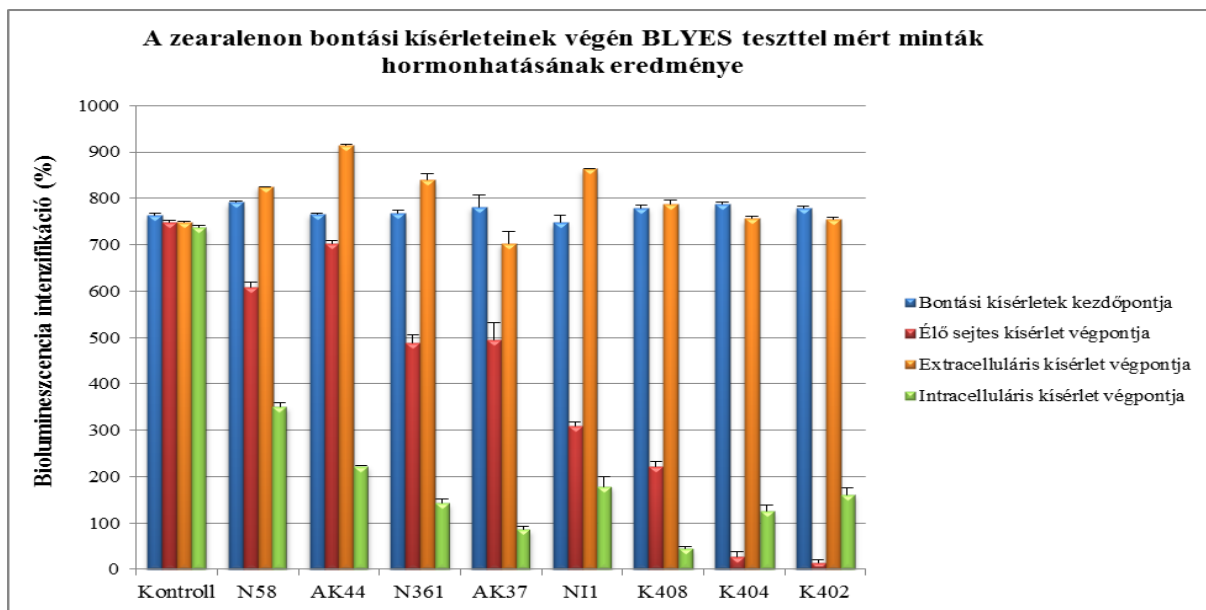
Az elégtelen törzsek közül az N58 az egyetlen, melynél egyik kísérlet esetében sem volt mérhető nagymértékű biolumineszcencia csökkenés, mely 15. ábrán látható. Az élő sejtes kísérlettel összehasonlítva az intracelluláris kísérletben csökkent a hormonhatás, ám ez így is alulmarad a többi vizsgált törzs eredményeihez képest.



15. ábra: A BLYES teszttel mért hormonhatás-változás a *R. globerulus* N58 jelzésű törzs élősejtes és sejtmentes extraktumával (intracelluláris és extracelluláris beállítás) zearalenon biodegradáció esetén

4.2.3.1. A bontási kísérlet végpontján tapasztalt hormonhatás összegző értékelése és összevetése a kémiai- és immunanalitikai vizsgálatokkal

A hormonhatást tekintve tehát érdekes eredményeket kaptunk a ZEA sejtes illetve sejt nélküli biodegradációja során. A különféleképpen összeállított bontási kísérletek kezdetén és végén mért értékeket a 16. ábra foglalja össze. A grafikon a BLYES teszt-szervezettel tapasztalt lumineszcencia intenzitási értékeket mutatja a bontási kísérletek végpontjában, ahol a három párhuzamos minták közötti szórás Y hibasávokkal jelöltük. Minél nagyobb lumineszcencia intenzitást mutat adott bontótörzs esetében kapott felülúszó minta, annál inkább kifejezett a minta hormonhatása.



16. ábra: A ZEA bontási kísérleteiből származó minták hormonhatásának elemzése BLYES tesztel

A bontótörzsek részletes értékelése alapján megállapíthatjuk, hogy az elégtelen bontási képességgel rendelkező törzsek közül még az N58 és az AK44 bontási folyamatából származó minták hormonhatása is kisebb, az extracelluláris kísérletből származó minták fénykibocsátása pedig nagyobb, mint a bontási kísérletekből származó mikrobamentes kontroll lumineszcencia értéke.

A jó bontási törzsek közül az NI1 estében az élő sejtek általi lebontással szinte megegyező eredményt kaptunk az intracelluláris kísérletben. Ezzel szemben a többi jól bontó törzs, az N361, az AK37 és a K408, viszont abban az esetben, mikor a törzs sejtfalát előzetesen roncsoltuk, sokkal intenzívebb ösztrogénhatás csökkenést eredményezett, mint amit az élő sejtteszt során tapasztaltunk.

A kiváló bontási képességgel rendelkező törzsek rendkívül hatásosnak bizonyultak. Mindkét törzzsel, a K404-gyel és a K402-vel végzett élő sejtteszt kísérletet nagyban reprodukálta az ultrahangos roncsolást kapott sejtek felülúszóival végzett vizsgálat. Az enzimek általi lebontás nem volt teljes, viszont így is rendkívül jelentős hormonhatáscsökkenést mértünk. Mindezek mellett nem szabad elfeledkezni az AK37 és K408 jelzésű törzsek kiváló biotransformációs képességéről az intracelluláris enzimekkel végzett kísérlet során, bár ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek.

A kezeletlen felülúszó mintával végzett kísérlet egyik törzsnél sem mutatott eredményt, ami arra enged következtetni, hogy mindegyik törzsnél a bontásban fő szerepet intracelluláris enzimek játszanak.

5. Értékelés és következtetések

Vizsgálataink során alkalmazott, biolumineszcencián alapuló hormon és citotoxicitás vizsgálatra alkalmas tesztrendszerrel (BLYES, BLYR) rendkívül jól screenelhető az ösztrogénhatású ZEA biodetoxifikációja, hiszen a ZEA mellett, annak fő metabolitjai is kimutathatók a teszttel. Ezt a biológiai hatáselemző rendszert adaptáltuk *Rhodococcus* törzsek enzimatis bontásának a nyomon követésére.

A BLYES tesztrendszer érzékenysége beállítása során ZEA-ra kapott hatásos koncentráció érték ($EC_{50} = 0,99 \text{ mg/kg}$) és a legkisebb kimutatható koncentráció (LOEC = $0,031 \text{ mg/kg}$) alatta marad a ma hatályban lévő takarmánybiztonsági határértékeknek, melyek gabonafélék és gabonakészítmények esetében 2 mg/kg , kukorica melléktermékek esetében pedig 3 mg/kg . Így **a BLYES teszt érzékenysége alkalmassá teszi azt a ZEA esetében takarmánybiztonsági vizsgálatokban való alkalmazásra.**

Munkánk során négyféle különböző biodegradációs kísérletet állítottunk össze, melyekkel célunk volt, hogy az elismerten jó aromás vegyületeket bontó *Rhodococcus* nemzetség néhány tagjának a ZEA biodegradációjában résztvevő enzimjeit vizsgáljuk. Ehhez egy korábbi kísérletet vettünk alapul, melyben élő sejtekkel bontottuk a toxint. Ennek eredményei alapján kialakított három csoporthoz hasonlítottuk a sejtmentes extraktummal végzett tesztek eredményeit, hogy vizsgáljuk milyen enzimek (extra-/intracelluláris, konstitutív/indukált) vesznek részt a lebontásban.

Első lépésként arra voltunk kíváncsiak, hogy a bontó enzimek konstitutívan termelődnek-e, vagy a ZEA jelenléte indukálja az őket termelő gének átírását. Ennek vizsgálatára a bontási kísérlet előtt 48 óras előinkubációt végeztünk a toxin jelenlétében. A vizsgálat során nem tapasztaltunk eltérést az előinkubáció nélküli kísérlethez képest. Ennek alapján az enzimtermeléshez nincs szükség a toxin megjelenésére, tehát **a biodegradációban résztvevő enzimek konstitutívan termelődnek.**

A következőkben az enzimek extra- ill. intracelluláris voltát vizsgáltuk. A kezeletlen felülszóval végzett kísérletben csak azok a törzsek voltak képesek hormonhatás csökkenést elérni, melyek enzimjei a sejten kívüli mátrixba excretálódtak. Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy az általunk vizsgált törzseknél **az extracelluláris enzimek kis vagy elhanyagolható mértékben vesznek részt a biodegradációban**, hiszen az extracelluláris kísérletben nem tapasztaltunk jelentős bontást.

Annak a feltevésnek az igazolására, hogy a toxinbontó enzimek főként intracellulárisak, a felszaporított sejtszuspenziót szonikáltuk, hogy ultrahanggal roncsoljuk a

sejtfalat, ami által az intracelluláris enzimek is a sejtmentes mátrixba kerülhettek. Az így kezelt törzsek extraktumaival végzett kísérlet eredményesnek bizonyult, hiszen az itt bekövetkezett degradáció szinte teljes mértékben megegyezett az élő sejtekkel végzett degradációs kísérlet eredményeivel, néhány törzsnél pedig jelentősebb volt. Eszerint különösen érdekes az élő sejt kísérlet eredményei szerint elégtelen bontónak besorolt AK44 és a jól bontónak sorolt N361, AK37 és K408, melyek enzimeit a sejtől kiszabadulva már jóval hatékonyabbnak bizonyultak. Ezekkel ellentétben a legjobban bontó K404 és K402 törzsek esetében csupán az enzimekkel végzett biodegradációs kísérlet bontási eredményei kismértékben lemaradtak az élő sejt kísérlethez képest. Ezen ellentmondások fényderítésére további vizsgálatokra van szükség. Egyrészt lehetséges, hogy az intracelluláris enzimek aktivitását kiegészítik az extracelluláris enzimek, így tervezzük egy komplex intra- és extracelluláris enzimeket tartalmazó rendszer összeállítását ezeknél a törzseknél, másrészt tervezzük az indukálhatóság vizsgálatára irányuló tesztek ismétlését. Ám hozzá kell tenni azonban azt is, hogy a sejt nélküli mátrixban az enzimek nem termelődnek újra, hatékonyságuk az idő elteltével pedig csökken. Érdekes továbbá az AK37 és a K408 jelzésű törzsek esetében vizsgálni az intracelluláris enzimekkel végzett kísérletet. Ezeknél a törzseknél az enzim már a toxinnal történt érintkezés után rögtön megszüntette a hormonhatást. Javasolt ezeknek a mintáknak az analitikai vizsgálata, mert feltételezhető, hogy az intracelluláris enzimek jóval hamarabb véghezvitték a toxin bontását, mint az élősejt kísérlet során. Amennyiben bebizonyosodik analitikai vizsgálatokkal is az AK37 és K408 kiváló biodegradációja intracelluláris enzimekkel, úgy érdemes azokat további vizsgálatokba bevonni a már korábban említett K402 és K404 mellett.

Munkánk eredményei azt feltételezik, hogy **a vizsgált *Rhodococcus* törzsek intracelluláris enzimekkel végzik a ZEA lebontását, valamint ezen enzimek a sejt élete folyamán konstitutívan termelődnek.** Kísérleteink, amelyben a bontási maradék affinitását mértük humán ösztrogén receptort tartalmazó biorporter rendszeren, igazolják **a *R. pyridinivorans* AK37, K408, K404 és K402-es törzs kiemelt hatékonyságát a ZEA bontásában, hiszen ezek a törzsek ösztrogénhatású metabolitok termelése nélkül végzik a biodegradációt.**

Hosszú távú céljaink között szerepel egy enzimalapú biodetoxifikációs ágens fejlesztése, amelyhez elengedhetetlen az (1) enzimátikus folyamatok megismerése, amelyhez a jelen dolgozat járul hozzá, (2) az enzimtermelésért felelős gének azonosítása, a genetikai

alapok megismerése és annak igazolása, hogy a (3) bontás során a célszervezetekre toxikus hatás nem tapasztalható.

A genetikai alapok megismeréséhez járul hozzá – az általunk biztonságosnak ítélt, és rendkívül jó bontási potenciállal rendelkező törzs – az AK37 teljes genomjának a feltérképezése, amelyet Kriszt és mtsi. (2012a) publikáltak. Egy transzpozon mutagenézis könyvtár létrehozásával és annak ZEA biodegradációra történő screenelésével kiválaszthatóak a nullmutánsok, és beazonosíthatók a ZEA lebontását végző enzimek termeléséért felelős génszakaszok.

Az általunk alkalmazott törzsek közül a *R. pyridinivorans* K408 biodetoxifikációs hatékonyságát magasabb szerveződési szinteken, rágsáló-modellkísérletben ellenőrizték Kriszt és munkatársai (2012b). A vizsgálat során nőstény pre-pubertás állatokat kezeltek ZEA-val szennyezett, ám *R. pyridinivorans* K408-as törzsszel detoxifikált tápoldattal 3 napon keresztül. A kísérlet alatt folyamatosan mértek különböző biológiai markereket, mint az állatok testtömegét, méhüknek tömegét és a toxin hatására bekövetkezett morfológiai változásokat, valamint ösztrogénfüggő gének expresszióját is vizsgálták. Az eredmények a detoxifikált minta esetében nem mutattak szignifikáns változást a testtömeget illetően, míg a kontrollként szolgáló 5 és 10 mg-os ZEA dózis esetében már a méhnek a szignifikáns növekedése valamint a méhfal megvastagodása volt tapasztalható. A ZEA-val fertőzött takarmánnyal etetett állatok esetében két ösztrogénfüggő gén (C2, CALB3) expressziója növekedett, másik kettőnek (APLN, AQP5) pedig csökkent. A biodegradáció hatékonyságát mutatta, hogy a mikrobával kezelt takarmánnyal etetett állatok esetében – a baktériummal nem kezelt takarmányt evőkkel szemben – a biológiai hatás 2,5-ször kisebb volt, hiszen a génexpressziós vizsgálatok nem eredményeztek eltérést a kontrollcsoportéhoz képest és a méhszövetre sem volt semmilyen káros hatással. Eszerint bebizonyosodott, hogy a K408 képes volt a toxin biodetoxifikációjára (Kriszt et al. 2012b).

Mindezek után és minden feltételnek eleget téve a későbbiekben létrehozott enzimpreparátumok rendkívül eredményes biodetoxifikáló ágensek lehetnek takarmányok illetve élelmiszerek ZEA eliminációjának céljából.

6. Összefoglalás

A *Fusarium* nemzetség által termelt zearalenon rendkívül nagy veszélyt jelent világszerte. Elsősorban a búzán és a kukoricán termelődő mikotoxin takarmányokba és élelmiszerekbe kerülve ösztrogénhatása révén reprodukciós és ivarzási problémát okoz. Az ilyen és ehhez hasonló megbetegedések elkerülése végett vált sürgetővé a mikotoxinok eliminálása az élelmiszer és takarmánytégelekből, melynek egyik legmegfelelőbb módja mikroorganizmusok ill. enzimek által végzett lebontás, a biodetoxifikáció.

Kísérleteink során egy korábbi kutatást használtunk fel, melynek során a *Saccharomyces cerevisiae* genetikailag módosított BLYES/BLYR törzseinek fénykibocsátásán alapuló bioripporter rendszert alkalmaztuk a ZEA lebontásának vizsgálatára. Ennek alátámasztására eredményeinket kémiai analitikával (HPLC-FLD) és immunanalitikával (ELISA) támasztottuk alá és a komplex módszer által legígéretebbnek bizonyult törzsekkel, a *Rhodococcus* nemzetség tagjaival dolgoztunk tovább.

Jelen munkánkban előzetesen igazolt mikotoxin-bontási potenciállal rendelkező *Rhodococcus* törzsek biodegradációs potenciáljának enzimátikus alapjait vizsgáltuk. Ennek fontosságát mutatja, hogy az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal (EFSA) közzé tette a biztonságosnak minősített (QPS - Qualified Presumption of Safety) mikroorganizmusok listáját, amelyek a takarmány és élelmiszerláncban alkalmazhatóak. Ezenfelül Hickey és munkatársai is egy kiváló mikotoxinbontó mikrobáról bizonyították be annak humán patogenitását; így egy enzimalapú takarmányadalék, amely biodetoxifikációs ágensként alkalmazható lenne, nagyban növelné az élelmiszer- és takarmánybiztonságot.

Mindezekből kifolyólag *Rhodococcus* fajok sejtmentes kivonatait alkalmaztuk, hogy a ZEA bontásában résztvevő enzimeket és enzimátikus folyamatokat megismerjük. Eszerint három különböző kezelést alkalmaztunk. A ZEA-val történő előinkubációs kezelés az enzimek indukált vagy konstitutív termelésének felderítésérét célozta. Annak érdekében, hogy megtudjuk, a bontásban résztvevő enzimek intracellulárisan termelődnek-e, azokat ultrahanggal tártuk fel a sejtekből. Ezzel szemben a kezeletlen felülúszó mintában történő változásokat extracelluláris enzimeket eredményezik.

Kísérleteink során a vizsgált törzsek nem igényeltek a ZEA sikeres biodegradációjához előinkubációt, így nagy valószínűséggel a ZEA bontásáért felelős enzimek konstitutív módon termelődnek. Bontási kísérletünkben az ultrahangos feltárással nem kezelt szuszpenzióból készített felülúszó folyadékban nem volt mérhető biodegradáció; a roncsoláson átesett sejteknél viszont több törzs sejtmentes kivonata is képes volt a

hormonhatást csökkenteni. Eredményeink igazolják, hogy a ZEA degradációjáért konstitutívan termelődő, intracelluláris enzimek felelősek. Vizsgálataink alapján – bár további toxikológiai és molekuláris vizsgálatok szükségesek – a kiváló biotetoxifikációs képességgel rendelkező törzsek enzimalapú készítményei lehetőséget adhatnak takarmányadalékként történő alkalmazásra, így egy gyakorlatban is alkalmazható biotetoxifikációs ágens kifejlesztésére.

7. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

Végül, de nem utolsó sorban köszönet illeti a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék és a Regionális Egyetemi Tudásközpont jelenlegi és volt munkatársait, közöttük *Háhn Juditot*, *Dr. Kukolya Józsefet*, *Baka Erzsébetet* és *Dr. Táncsics Andrást*, akik mind gyakorlati, mind elméleti tanácsokkal láttak el laborban végzett munkám során és *Benséné Fekete Ildikót*, aki a laboratóriumi munkám során mindenben a segítségemre volt.

Ezt a munkát a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence - 17586-4/2013/TUDPOL, és a KTIA_AIK_12-1-2012-0017 támogatta. Köszönetemet fejezem ki J. Sanseverinonak és G. Saylernek a BLYES és BLYR tesztsszervezetekért (The University of Tennessee, Knoxville, Tennessee).

8. Irodalomjegyzék

- ALBERTS, J.F., ENGELBRECHT, Y., STEYN, P.S., HOLZAPFEL, W.H., VAN ZYL, W.H. (2006): Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 109:121-126. p.
- BENNETT, J. W., KLICH, M. (2003): Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16:497-516. p.
- BETINA, V. (1989): Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, 437 p.
- BOLLIGER, G., TAMM, CH. (1972): Vier neue Metabolite von *Giberella zeae*: 5-Formyl-zearalenon, 7'-Dehydrozearalenon, 8'-Hydroxy- und 8'-epi-Hydroxy-zearalenon. *Helvetica Chimica Acta*, 55:3030-3048. p.
- BRAVIN, F., C. DUCA, R., BALAGUER, P., DELAFORGE, M. (2009): *In vitro* cytochrome P450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: possible occurrence of this metabolite *in vivo*. *International Journal of Molecular Sciences*, 10:1824-1837. p.
- BURKHARDT-HOLM, P. (2010): Endocrine disruptors and water quality: A state-of-the-art Review, *Water Resources Development*, 26(3): 477- 493. p.
- BUSK, Ø.L., NDOSSI, D., VERHAEGEN, S., CONNOLLY, L., ERIKSEN, G., ROPSTAD, E., SØRLIE, M. (2011): Relative quantification of the proteomic changes associated with the mycotoxin zearalenone in the H295R steroidogenesis model. *Toxicon*, 58:533-542. p.
- BÚZA L., M. SCHILL J. (2010): A mikotoxinok vizsgálati módszerei, eredményei, előfordulásuk a hazai takarmányokban. In: Kovács M. (szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Agroiinform Kiadó, Budapest, 156 p., 13-19. p.
- BYRNE, C., DIVEKAR, S. D., STORCHAN, G. B., PARODI, D. A., MARTIN, M. B. (2009): Cadmium – a metallohormone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3):266-271. p.
- CALOW, P. (eds.) (1993): *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Science Ltd., 487 p.
- CHRISTENSEN, C. M. – KAUFMANN, H. H. (1969): Grain storage. The role of fungi in quality loss. Univ. Minnesota Press, Minneapolis, USA 159 p.
- CSEH S., KOVÁCS M. (2010): Mikotoxinok reprodukcióra kifejtett hatásai. In: Kovács M. (szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Agroiinform Kiadó, Budapest, 156 p., 73-83. p.
- CSERHÁTI M., KRISZT B., KRIFATON CS., SZOBOSZLAY S., HÁHN J., TÓTH SZ., NAGY I., KUKOLYA J. (2013): Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 166:176-185. p.
- DEÁK T. (szerk.) (2006): Élelmiszer-mikrobiológia. Mezőgazda kiadó, Budapest, 382 p.
- DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J-P., GIUDICE, L. C., HAUSER R., PRINS, G. S., SOTO, A. M., ZOELLER, R. T., GORE, A. C. (2009): Endocrine-Disrupting Chemicals, An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30(4):293-342. p.
- DING, X., LICHTI, K., STAUDINGER, J.L. (2006): The mycoestrogen zearalenone induces CYP3A through activation of the pregnane X receptor. *Toxicol. Sci.*, 91:448–455. p.
- EFSA SCIENTIFIC OPINION; Statement on the establishment of guidelines for the assessment of additives from the functional group 'substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *EFSA Journal*, 8:1693. p.
- EFSA: BOUDERGUE, C., BUREL, C., DRAGACCI, S., FAVROT, M-C., FREMY, J-M., MASSIMI, C., PRIGENT, P. (AFSSA); DEBONGNIE, P., PUSSEMER, L. (CODA-CERVA); BOUDRA, H., MORGAVI, D. (INRA Clermont-Ferrand); OSWALD, I. (INRA Toulouse); PEREZ, A. (IRTA); AVANTAGGIATO, G. (ISPA) (2009): Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *Scientific Report, EFSA, CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01*, 1-192. p.
- EL-SHARKAWY, S. H. (1989): Microbial transformation of zearalenone, III. Formation of zearalenone-2-4-O-β-diglucoside. *Acta Pharm. Jugosl.* 39:303-310. p.

- ETIENNE, M., DOURMAD, J. Y. (1994): Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. *Livestock Production Science*, 40:99-113. p.
- FINK-GREMME, J., MALEKINEJAD, H. (2007): Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137:326–341. p.
- FROEHNER, K., MEYER, W., GRIMME, L. H. (2002): Time-dependent toxicity in the long-term inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 46:987-997. p.
- GROMADZKA, K., WASKIEWICZ, A., CHELKOWSKI, J., GOLINSKI, P. (2008): Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal*. 1(2):209-220. p.
- GRUIZ K., HORVÁTH B., MOLNÁR M. (2001): *Környezettoxikológia*. Műegyetem Kiadó, 171 p.
- GUILLETTE, L. J., JR., CRAIN, D. A., ROONEY, A. A., PICKFORD, D. B. (1995): Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 103(7):157-164. p.
- GUPTA, R. K., PATTERSON, S. S., RIPP, S., SIMPSON, M. L., SAYLER, G. S. (2003): Expression of the *Photobacterium luminescens* lux genes (luxA, B, C, D, and E) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 4: 305-313 p.
- HAMMER, R., HARPER, D. A. T., RYAN, P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaentologia Electronica*, 4(1): 9 pp.
- HICKEY, P.W., SUTTON, D.A., FOTHERGILL, A.W., RINALDI, M. G., WICKES, B.L., SCHMIDT, H.J., WALSH, T.J. (2009): *Trichosporon mycotoxinivorans*, a novel respiratory pathogen in a patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 47:3091-3097. p.
- KAVLOCK, R. J., DASTON, G. P., DEROSA, C., FENNER-CRISP, P., GRAY, L. E., KAATTARI, S., LUCIER, G., LUSTER, M., MAC, M. J., MACZKA, C., MILLER, R., MOORE, J., ROLLAND, R., SCOTT, G., SHEEHAN, D. M., SINKS, T., TILSON, H. A. (1996): Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U. S. EPA-sponsored Workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104(4):715-740. p.
- KISIELA, M., SKARKA, A., EBERT, B., MASER, E. (2012): Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria – A bioinformatic perspective. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 129:31-46. p.
- KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S., BARBER, L. B., BUXTON, H. T. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36(6):1202-1211. p.
- KOVÁCS F. (szerk.) (1980): *Állathigiénia*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 603 p.
- KOVÁCS M. (2010): A mikotoxinok humán-egészségügyi vonatkozásai. In: Kovács M. (szerk.) (2010): *Aktualitások a mikotoxin kutatásban*, Agroinform Kiadó, Budapest, 156 p., 85-102. p.
- KRIFATON CS., KRISZT B., SZOBOSZLAY S., CSERHÁTI M., SZÜCS Á., KUKOLYA J. (2011): Analysis of aflatoxin-B1-degrading microbes by use of a combined toxicity-profiling method. *Mutation Research*, 726:1-7. p.
- KRISTÓF J. (szerk.) (2000): *Kémiai analízis II. (Nagyműszeres analízis)*. Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém, 192 p.
- KRISZT B., TÁNCICS A., CSERHÁTI M., TÓTH Á., NAGY I., HORVÁTH B., NAGY I., TAMURA, T., KUKOLYA J., SZOBOSZLAY S. (2011a): De novo genome projekt for the aromatic degrader *Rhodococcus pyridinivorans* strain AK37. *J. Bacteriol*, 194(5):1247. p.
- KRISZT R., KRIFATON CS., SZOBOSZLAY S., CSERHÁTI M., KRISZT B., KUKOLYA J., CZÉH A., FEHÉR-TÓTH S., TÖRÖK L., SZÓKE Z., KOVÁCS K.J., BARNA T., FERENCZI S. (2012b): A new zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 strain. *PLoS One*, 7(9): e43608.
- KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M., WATANABE, H. (1987): Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 7:253–306. p.
- LARKIN, M. J., KULAKOV, L. A., ALLEN, C. CR. (2005): Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3):282-290. p.
- LARKIN, M. J., KULAKOV, L. A., ALLEN, C. CR. (2006): Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology and genetic adaptation. *Adv Appl Microbiol*, 59:1-29. p.

- LÁNG I. (2002): Környezetvédelmi lexikon I-II., Akadémiai kiadó, Budapest, 664 p., 588 p.
- LIOI, M. B., SANTORO, A., BARBIERI, R., SALZANO, S., URSINI, M. V. (2004): Ochratoxin and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell deaths induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research*, 557:19-27. p.
- MAAROUFI, K., CHEKIR, L., CREPPY, E. E., ELLOUZ, F., BACHA, H. (1996): Zearalenone induces modifications in haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicon*, 34:534-540. p.
- MARÁZ A. (2001): Eukarióta mikroorganizmusok. In: Pesti M. (szerk.) (2001): Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 308 p., 117-163. p.
- MARKEY, C. M., RUBIN, B. S., SOTO, A. M., SONNENSCHN, C. (2003): Endocrine Disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83(1-5):235-244. p.
- MARTÍNKOVÁ, L., UHNÁKOVÁ, B., PÁTEK, M., NESVERA, J., KREN, V. (2008): Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35:162-177. p.
- MÁTRAI T., RAFAI P., SZIGETI G: A takarmányok penészgombás fertőzöttségének állat-egészségügyi jelentősége. In: Rafai P. (szerk.) (2003): Állathigiéna. Agroinform Kiadó, Budapest, 343 p., 208-229. p.
- MEIGHEN, E. A. (1993): Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J*. 7:1016-1022. p.
- MÉZES M. (szerk.) (2009): Takarmánytoxikológia, Egyetemi Jegyzet, Gödöllő, 99 p.
- MÉZES M., BALOGH K. (2010): Mikotoxinok hatása a szervezet lipidperoxidációs folyamataira és antioxidáns rendszerére. In: Kovács M. (szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Agroinform Kiadó, Budapest, 156 p., 59-71. p.
- MOLNAR O., SCHATZMAYR, G., FUCHS, E., PRILLINGER, H. (2004): *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. Nov., A New Yeast Species Useful in Biological Detoxification of Various Mycotoxins. *System. Appl. Microbiol.*, 27:661-671. p.
- OLSEN, M., KIESSLING, K.H. (1983): Species differences in zearalenone-reducing activity in subcellular fractions of livers from female domestic animal species. *Acta Pharmacol. Toxicol*, 52:287-291. p.
- RILEY, R.T. (1998): Mechanistic interaction of mycotoxins: theoretical considerations. In: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (szerk.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, 227-253. p.
- ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P. (1995): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (1996) 15(3): 241-248 p.
- RUZSAS C., BIRO-GOSZTONYI M., WOLLER L., MESS B. (1979): Effect of the fungal toxin (zearalenone) on the reproductive system and fertility of male and female rats. *Acta biologica, Academia Scientia Hungarica*, 30:335-345. p.
- PETRUSMA, M., HESSELS, G., DIJKHUIZEN, L., VAN DER GEIZE, R. (2011): Multiplicity of 3-Ketosteroid-9 α -Hydroxylase Enzymes in *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269 for Specific Degradation of Different Classes of Steroids . *J Bacteriol*, 193(15):3931-3940. p.
- SANSEVERINO, J., ELDRIDGE, M. L., LAYTON, A. C., EASTER, J. P., YARBROUGH, J., SCHULTZ, T. W., SAYLER, G. S. (2008): Screening of potentially Hormonally Active Chemicals using Bioluminescent Yeast Bioreporters. *Toxicological Sciences*, Oxford University Press, 1-56 p.
- SANSEVERINO, J., GUPTA, R. K., LAYTON, A. C., PATTERSON, S. S., RIPP, S. A., SAIDAK, L., SIMPSON, M. L., SCHULTZ, T. W., SAYLER, G. S. (2005): Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid, Sensitive Detection of Estrogenic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8): 4455-4460 p.
- SHIER, W.T., SHIER, A.C., XIE, W., MIROCHA, C.J. (2001): Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon*, 39:1435-1438. p.
- SZEITZNÉ SZABÓ M. (2010): A mikotoxinok ellenőrzésére vonatkozó jogi háttér, az EU élelmiszerekre és takarmányokra vonatkozó gyors veszélyjelző (RASFF) rendszerébe érkező bejelentések értékelése. In:

- Kovács M. (szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Agroinform Kiadó, Budapest, 156 p., 103-118. p.
- SZOBOSZLAY S., KRISZT B. (szerk.) (2010): Környezeti elemek védelme, Egyetemi Jegyzet, Gödöllő, 130 p.
- TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S., SHIBATA, T., HAMAMOTO, H., YAMAGUCHI, I., KIMURA, M. (2004): Metabolism of Zearalenone by Genetically Modified Organisms Expressing the Detoxification Gene from *Clonostachys rosea*. Applied and Environmental Microbiology, 70(6):3239-3245. p.
- TENIOLA, O.D., ADDO, P.A., BROST, I.M., FÄRBER, P., JANY, K.-D., ALBERTS, J.F., VAN ZYL, W.H., STEYN, P.S., HOLZAPFEL, W.H. (2005): Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp.nov. DSM44556^T. International Journal of Food Microbiology 105:111-117. p.
- VEKIRU, E., HAMETNER, C. MITTERBAUER, R., RECHTHALER, J., ADAM, G., SCHATZMAYR, G., KRŠKA, R., SCHUMACHER, R. (2010): Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a novel non-estrogenic metabolite. Applied Environmental Microbiology, 10.11258/AEM.01438-9, 1-23. p.
- YOUNG, W. F., WHITEHOUSE, P., JOHNSON, I., SOROKIN, N. (2004): Proposed Predicted-No-Effect-Concentration (Pnecs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters. R&D Technical Report P2-T04/1
- ZINEDINE, A., SORIANO, J. M., MOLTÓ, J. C., MANES, J. (2005): Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An estrogenic mycotoxin. Food and chemical toxicology. 45(1): 1-18. p.

Internetes hivatkozások:

- http1: http://www.euvonal.hu/index.php?op=mindennapok_fogyasztovedelem&id=3
letöltés ideje: 2013.10.25.
- http2: <http://www.inventor.hu/ceco/kock/konyv/kbzt.pdf>,
Damjanovich I.: Környezetbiztonság, letöltés ideje: 2011.07.29.
- http3: http://www.allaboutfeed.net/PageFiles/10616/001_boerderij-download-AAF10646D01.pdf, Eijk, C. van der (2003): New technologies improve mycotoxin elimination, Feed mix, 11(1): 8-10. p., letöltés ideje: 2013.07.29.
- http4: <http://www.kfki.hu/chemonet/osztaly/eloadas/mesterhazya.html>, Mesterházy Á. (2002): A mikotoxinok és az élelmiszerbiztonság, a megoldás lehetőségei, Szeged, letöltés ideje: 2011.02.15.
- http5: http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/07_NRKP/01_berichte_nrkp/00_ErgaenzendeDokumente_2000_2001/lm_nrkp_bericht_2000_2001_basepage.html?nn=1934934, letöltés ideje: 2011.08.10.
- http6: <http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/kiadvanyok/karmkezikk2/2-14.htm> Kármentesítési kézikönyv 2., letöltés ideje: 2011.07.20.
- http7: <http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/kiadvanyok/karmkezikk3/3-09.htm>, Gruiz K., Dura Gy.: Ökotoxikológiai vizsgálatok és a környezeti kockázat felmérése, Kármentesítési kézikönyv 3., letöltés ideje: 2011.07.19.
- http7: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/Biodegradáció.pdf>, Gruiz K., Molnár M.: Biodegradáció alapuló remediáció, szerves szennyezőanyagok biodegradációja, letöltés ideje: 2011.06.23.

9. Mellékletek, függelék

1. melléklet: Toxikológiai/ökotoxikológiai teszteknel alkalmazott mérési végpontok (Calow, 1993)

Krónikus teszteknel alkalmazott mérési végpontok

- NOEC – No Observed Effects Concentration: az a toxinkoncentráció, melynél nincs megfigyelhető hatás
- NOEL – No Observed Effects Level: az a legmagasabb dózis, melynél nincs megfigyelhető hatás
- NOAEC – No Observed Adverse Effects Concentration: az a legnagyobb koncentráció, mely nem okoz káros hatást
- NOAEL – No Observed Adverse Effect Level: az a legnagyobb dózis, melynél nincs megfigyelhető káros hatás
- LOEC – Lowest Observed Effects Concentration: az a legkisebb koncentráció, mely hatást okoz
- LOEL – Lowest Observed Effects Level: az a legkisebb dózis, mely hatást okoz
- MATC – Maximum Allowable Toxicant Concentration: egy szennyezőanyag megengedhető legnagyobb koncentrációja
- MNTD – Maximum Non-Toxic Dose: az a legnagyobb mennyiség, mely még nem idéz elő klinikai tüneteket (Mézes, 2009)
- MTD – Maximum Tolerated Dose: az a mennyiség, amelyet a szervezet még tolerál, vagyis nincs letális hatás (Mézes, 2009)

Akut teszteknel alkalmazott mérési végpontok

- LD₁₀, LD₂₀, LD₅₀, LD₉₀ – Lethal Dose: az a mennyiség, melynek hatására a kísérleti állatok 10, 20, 50 vagy 90%-a meghatározott időn belül elpusztul
- ED₁₀, ED₂₀, ED₅₀, ED₉₀ – Effective Dose: az a mennyiség, mely a mérési végpont 10, 20, 50 vagy 90%-os csökkenését okozza
- LC₁₀, LC₂₀, LC₅₀, LC₉₀ – Lethal Concentration: az a letális koncentráció, mely mellett az adott faj egyedeinek 10, 20, 50 vagy 90%-a elpusztul
- EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀, EC₉₀ – Effective Concentration: az a koncentráció, mely az adott faj egyedeinek valamely aktivitását 10, 20, 50 vagy 90%-kal csökkenti

2. melléklet: Alkalmazott tápoldatok

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

1 liter desztillált vízre vonatkoztatva	• KH_2PO_4	13,61 g
	• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,98 g
	• KOH (lemezés)	4,2 g
	• MgSO_4	0,2 g
	• Fe_2SO_4 oldat (40 mg/50 ml víz)	1 ml
	• L-hisztidin	50 mg
	• Adenin	50 mg
	• L-arginin-HCl	20 mg
	• L-metionin	20 mg
	• L-tirozin	30 mg
	• L-izoleucin	30 mg
	• L-lizin-HCl	30 mg
	• L-fenilalanin	25 mg
	• L-glutánsav	100 mg
	• L-valin	150 mg
	• L-szerin	375 mg

Growth Medium

1 liter desztillált vízre vonatkoztatva	• YMM alapmédium	854,5 ml
	• Vitamin oldat	10 ml
	• Glükóz oldat	100 ml
	• L-aszparaginsav oldat	25 ml
	• L-treonin oldat	8 ml
	• Réz-szulfát oldat	2,5 ml

Összetevők:

1. Vitamin oldat: 20 mg Tiamin, 20 mg Piridoxin, 20 mg Pantoténsav, 100 mg Inozitol, 50 ml Biotin oldat (2mg/100ml)
500 ml desztillált vízben oldottuk fel, majd 0,2 μm pórusátmérőjű szűrőn átszűrve sterilizáltuk. 4°C-on tároltuk.
2. D-glükóz oldat:
20%-os glükóz oldatot készítettünk, majd autoklávban 10 percig sterilizáltuk. Szobahőmérsékleten tároltuk.
3. L-aszparaginsav oldat:
4 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk desztillált vízben oldva. Sterilizálás után szobahőmérsékleten tároltuk.
4. L-treonin oldat:
Desztillált vízben oldva mg/ml-es oldatot állítottunk össze. Sterilizálás után, szintén szobahőmérsékleten tároltuk.
5. Réz-szulfát oldat:
20 mM-os oldatot készítettünk desztillált vízben oldva. 0,2 μm pórusátmérőjű szűrőn átszűrtük, és szobahőmérsékleten tároltuk.