



Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

AFLATOXINNAL SZENNYEZETT ABRAKTAKARMÁNY HATÁSA A PONTY ÉLETTANI FOLYAMATAIRA

Készítette: Balog Attila
Vadgazda Mérnök MSc, II. évfolyam

Belső konzulens: Dr. Hegyi Árpád, tudományos főmunkatárs
Dr. Bokor Zoltán, tudományos munkatárs
Dr. Cserhádi Mátyás, egyetemi adjunktus

Gödöllő
2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
1. Bevezetés és célkitűzések	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. Hagyományos tógazdasági pontytermelés.....	6
2.1.1. Abraktakarmányozás	8
2.1.2. Keveréktakarmányozás.....	10
2.2. A gabonákban előforduló toxinok	10
2.2.1. Az aflatoxin előfordulás biológiája	14
2.3. Toxikózis az állattenyésztésben.....	16
2.4. A toxinok előfordulása és hatása a humán táplálkozásban.....	18
3. Anyag és módszer.....	20
3.1. A kísérleti körülmények, helyszín bemutatása	20
3.2. A vizsgálatok helyszínei és azok jellegzetességei	20
3.3. A telelő tavak népesítése	22
3.4. Az aflatoxinnal szennyezett takarmány előkészítése.....	22
3.5. A takarmányozás rendje	24
3.6. Lehalászás.....	25
3.7. Mintavételi eljárások, módszerek	26
3.7.1. Tavak vizsgálata	26
3.7.2. Víztest állapotának fizikai, kémiai vizsgálata	27
3.7.3. Halak fejlődésének vizsgálata	27
3.7.4. A takarmány toxinkoncentrációjának meghatározási módszertana.....	27
3.7.5. Hematológiai vizsgálatok	28
3.7.6. Hisztológiai vizsgálatok	29
3.7.7. A májszövet aflatoxin koncentrációjának meghatározása.....	30
3.8. Alkalmazott statisztikai módszerek	30

4. Eredmények	31
4.1. Tavi vizsgálatok során elért eredmények	31
4.2. A tóvíz fizikai, kémiai tulajdonságainak eredményei	31
4.3. Termelési eredmények bemutatása.....	31
4.4. A takarmány toxinkoncentrációjának alakulása a kísérleti idő alatt	33
4.5. Hematológiai eredmények bemutatása	34
4.6. Májszöveti eredmények bemutatása	34
4.6.1. A kontroll csoportokban kapott májszöveti eredmények	34
4.6.2. A kezelt csoportokban kapott májszöveti eredmények	36
4.7. A májszövet aflatoxin koncentrációinak eredménye.....	38
5. Eredmények értékelése, következtetések	40
6. Összefoglalás	41
7. Köszönetnyilvánítás	43
8. Irodalomjegyzék	44
9. Nyilatkozat	47

1. Bevezetés és célkitűzések

A magyarországi haltenyésztés egyik legfontosabb halfaja a ponty (*Cyprinus carpio*). A halfogyasztás döntő hányadát is ez a faj teszi ki. Egészségünk megőrzése szempontjából fontos élelmünk a halhús. A hazai pontytakarmányozás gyakorlata az elmúlt 100 évben lényegében nem sokat változott. Tógazdaságainkban a gabona magvakkal történő haltakarmányozás a legelterjedtebb hozamfokozó eljárás.

Az előrejelzések szerint a jövőben nem csak a kieső és csökkenő takarmánymennyiséggel kell számolni, hanem számos adat azt bizonyítja, hogy a növényeket fertőző járványok az időjárási jelenségekkel nagyon szoros kapcsolatban állnak. Ezen változás egyik veszélyforrása a mikotoxinok és elterjedtségük változása, és az élelmiszer (takarmány) a jelenleginél nagyobb gyakorisággal történő szennyeződése. A Föld átlaghőmérséklete közel 2 °C-kal növekedhet az elkövetkező 100 évben. Ez a jelenség éghajlati övek eltolódásához és azokon belül időjárási jelenségek átalakulását eredményezheti. Évszakok tűnhetnek el, csapadékeloszlás kiszámíthatatlanná válhat.

Egy 2010-ben történt felmérés bizonyítja, hogy az országban megjelent az aflatoxin B1 termelő *Aspergillus* penészgomba. A gombák gyors terjedésében szerepet játszik a szélsőséges időjárás, technológiai hibák sora, illetve komoly probléma lehet még a fertőzött importtermékekkel történő behurcolás is. Az Európai Unió rendelete alapján a takarmányok aflatoxin koncentrációjának felső határértéke 20µg/kg. A gyakorlat azt mutatja, hogy minden, az aflatoxinnal kapcsolatba került gazdasági állatfajban kimutatható májkárosodás, takarmány fogyasztás csökkenése, csökkenő termelés, elhullás. Édesvízi halfajok esetében viszont minimális adat áll rendelkezésünkre.

A mikotoxinok az alapanyagok szállítása, feldolgozása, tárolása útján közvetlen, vagy közvetett úton juthatnak be az élelmiszerekbe. Ezek állandó, kis dóziséjú jelenléte a lakosságot is folyamatosan veszélyezteti. A kis mennyiségű, folyamatos expozíció hozzájárulhat a daganatos betegségek számának növekedéséhez, a lakosság immunállapotának csökkenéséhez.

„Az akvakultúra ágazat kitörési pontjainak komplex, versenyképességet szolgáló fejlesztése” röviden „AquaFuture” konzorcium keretében (VKSZ-12-1-2013-0078) lehetőségem nyílt egy takarmányozási kísérletben koordinátorként részt venni. A munkánk során cél annak megállapítása, hogy az aflatoxinnal szennyezett gabonatakarmanly milyen élettani hatásokat eredményez a fél intenzív pontynevelésben, valamint, hogy az aflatoxin megjelenik-e az emberi fogyasztásra szánt halszövetekben. Munkánkkal célunk volt ismert koncentrációjú aflatoxinnal szennyezett takarmány etetése ponty halfajban és a toxin

hatásainak megfigyelése: alaki elváltozás, elhullás, súlygyarapodás csökkenése, étvágytalanság, környezetre gyakorolt hatás és halélettani hatások. Az aflatoxin koncentrációt igyekeztünk az etetésre szánt takarmányban az Európai Unió által megengedett felső határértékre beállítani.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Hagyományos tógazdasági pontytermelés

A halászat a magyar nép körében ősi foglalkozás. A Kárpát-medence vízrajzának köszönhetően az itt lakó népek mindig is foglalkoztak a halászattal. Több okirat is igazolja, hogy már az Árpádok uralkodása alatt is foglalkoztak haltenyésztéssel.

A modernkori magyar tógazdasági haltenyésztés több mint fél évszázados múltra tekinthet vissza, ami idő alatt nagyon sokat fejlődött. Folyamatosan épültek az ország különböző helyein a tógazdaságok (Maucha et al. 1954).

A haltenyésztés tudatosan, tervszerűen végzett állattenyésztési tevékenység. A szakembereknek olyan ismeretekkel kell rendelkezniük, amelyekkel biztosítják a tenyészcél gazdaságos előállítását (Internet 1).

Összes haltermelésünk mintegy 80-85%-át a ponty (*Cyprinus carpio* L.) teszi ki. Nemcsak hazánkban, hanem az egész világon is egyike a legnagyobb arányban tenyésztett halfajoknak (Internet 1).

A ponty (*Cyprinus carpio*), a sugarasúszójú (*Actinopterygii*) csontos halak (*Osteichthyes*) közé tartozik, a pontyalakúak (*Cypriniformes*) rendjének és a pontyfélék (*Cyprinidae*) családjának névadója. Palearktikus elterjedésű faj. Eredeti őshazája Ázsia, valamint Kelet-Európa, de tenyésztési céllal betelepítették, szinte az egész világ édesvízeiben megtalálható.

A ponty környezeti igényét tekintve melegvizet kedvelő faj, igaz hőmérsékletűrése igen nagymértékű (Lajkó, 1999).

Ezen halfaj haszonnal ott tenyészthető, ahol kellő vízmennyiség megvan, kevés munkával tóvá dagaszthat, de oly módon, hogy a víz esésének szintvonala a tó feneké alá essen. Erre azért van szükség, hogy a tó könnyen lecsapolható legyen. A talaj alakulásának úgy kell lennie, hogy egy nagy, úgynevezett „hizlaló” tó és azon kívül több kisebb tó és telelő haltartó alakítható legyen. A tavak háromfélék lehetnek, ívó tavak, ez lehet kicsiny 0,1 ha is, szélei sekélyek, jól benőttek vízinövényekkel. A növendéktavak nagyobbak, 2-5 ha, a víz tavasszal kerüljön bele, itt a halak csak néhány hétig tartózkodnak, míg eléri a néhány cm-es nagyságot. Ez a harmadik tavaszig folytatódik, amikor is a pontyivadékok a „hizlaló” tóba kerülnek (Herman, 1887).

A ponty optimális növekedéséhez elengedhetetlen 20-25°C körüli víz hőmérséklet. A hőmérséklet csökkenésével táplálkozása is egyre jobban visszaesik, 8 °C-nál gyakorlatilag megszűnik. Az állat ilyenkor hibernált állapotba kerül (anyagcsere folyamatai lelassulnak).

Ez a faj jól tűri a víz alacsony oldott oxigén szintjét, ami alatt azt értjük, hogy 3-4 mg/liter oxigénszint mellett még táplálkozik és átvészeli a 0,5 mg/literes kritikus értéket is. Állományszintet tekintve ezen kritikus érték alatt kezd pusztulni. Növekedése gyors. A mérsékelt égövön az első három tenyészidőszakban gazdaságos a hústermelése (1. ábra).



1. ábra Pontyok (*Cyprinus carpio*) (Hegyi, 2012)

A ponty alapvetően mindenevő, ami azt jelenti, hogy szívesen fogyasztja az álló és folyóvizekben élő aprótestű, zooplankton részét képező kiskirákokat, az iszapban élő férgeket, csigák és rovarlárvákat, vízínövények magvait, hajtásait, mocsári növények termését. Mesterséges halastavakban ezt a tulajdonságát hasznosítják úgynevezett kiegészítő takarmányként gabonafélékkel, mezőgazdasági melléktermékekkel (Hegyi et al., 2014).

A haltenyésztők nehezebb helyzetben vannak, mint a többi állattenyésztő, mivel vízben nevelik halaikat és csak másodlagos jelekből tudnak következtetni mindazon történésekre, amelyeket a szárazföldi állatokat nevelő kollégái közvetlen megfigyelhetnek. Ez egy mesterségesen létrehozott termelési egység, ahol haszonhalaink fogyasztják a természetes táplálékforrásokat (plankton, bentosz, vízi vegetáció). A tógazdának ismernie kell a szóba jöhető táplálék, vagy ellenséggként szóba jöhető vízi élőlényeket, amelyeket halai elfogyaszthatnak, vagy károsak lehetnek. A vízi környezettel, vízzel foglalkozó tudományág a hidrobiológia. Ha valaki nem tud eleget a vízről, abban lejátsszódó fizikai, kémiai, biológiai történésekről, könnyen előidézhetheti a halai pusztulását. A víz sűrűsége 775-ször nagyobb, mint a levegőé. A vizek lúgossága- savassága is fontos tényező lehet. Az élővízben kívánatos pH

6-8,5 érték közé esik. A pH-t az alapkőzetből beoldódó vegyületek és a vízi növények napszakos asszimilációs tevékenysége befolyásolja. Akkor nagy a pH stabilitás, ha a rendszerben jelentős a Ca és Mg ionok mennyisége, labilissá válhat Na és K ionok túlsúlya következtében. A pH-nak a víz toxicitásában van nagy jelentősége. Az extrém magas (8,5 feletti) pH befolyásolja a vízben lévő ammónium-ammónia disszociációját a mérgező ammóniagáz felszabadulásán át. Savas közegben (6 alatt) a kénhidrogén gáz képződésének kedvez, ami szintén mérgező. Fontos tényező még a víz fizikai tulajdonsága, ami alatt a vízmozgásokat értjük. Teljes nyugalmi állapotú vizet nem találunk. Többfajta oka is lehet a vízmozgásnak, a tógazdaságokban a szél, illetve különböző vízrétegek sűrűsége és hőmérsékleti különbsége lehet a fő kiváltó ok.

A vízben történő legfontosabb elemek forgalmánál nagyon fontos az oxigén, széndioxid, nitrogén, sók és ionjai, kén, foszfor. Ezen vegyületek mind hatással vannak a halak állapotára (Horváth et al., 2011).

A tavak előkészítésénél nem csak a tótálajt kell előkészítenünk, hanem a tóvizet is alkalmassá kell tennünk a termelésre. A szárazon állás időszakában beszórt mészevegyületek fertőtlenítenek, illetve az árasztás során egy részük be is oldódik a vízbe és ott kedvező, stabilizáló hatást fejt ki. Kora tavasszal nagyadagú trágyázást (szarvasmarha vagy sertés) végzünk. Erre azért van szükség, mert a még hideg vízben nehezebben, lassabban indulnak be a biológiai folyamatok. Ennek a célja megteremteni a tóban élő alacsonyabb rendű növényi és állati szervezeteknek a környezetet, amelyben azok élni és hatékonyan szaporodni tudnak, illetve elengedhetetlen szerepe van a biogén makro elemek pótlásában. Egyes mérések szerint 100 kg trágyának körülbelül közvetlen 3-4 kg hozamgyarapodása lehetséges. Átlagosan 1,5-2 méter mély tavakban 2-4 t/ha évi trágyamennyiség előnyös hatással van. A haltermelés során szerencsés esetben a természetes hozam az összes hozam legalább 40%-a. A tavak népesítésére pontos tervezésre, számolásra van szükség (Horváth et al., 2011).

2.1.1. Abraktakarmányozás

Energiahordozó takarmányoknak is nevezzük őket. Szénhidrátokban igen gazdagok, keményítőértékük jelentős. Fehérjékben szegény, koncentrációja 10% körül mozog. Táplálóanyaguk 60-70%-a keményítő, zsírtartalmuk 2-3%. Nyersrost tartalom 1-5%. Gazdag a B1-2, E vitaminban. C és D vitamint nem tartalmaznak. Csak, mint kiegészítő takarmányokként vehetők számításba. A tógazdaságok legfontosabb kiegészítő takarmányai a gabona magvak. Talán leggyakrabban etetett abraktakarmány a takarmánybúza. Fehérjéinek biológiai értéke igen csekély, ennek oka az, hogy lizinben és metioninban nagyon szegény. A

következő elengedhetetlen haltakarmány a kukorica. Keményítőértéke magas, csíraolaj zsírsavban gazdag, lágyítja a zsírt, fehérjékben szegény, karotinban gazdag. A törtszem és a darája gyorsan avasodik, tárolására megfelelő gondot kell fordítani. Árpa, mint haltakarmány visszaszorulóban van. Csak az őszi árpát használják takarmányozási célra. Nagy rosttartalma (maghéj) miatt bélgyulladást okozhat. Fehérjében gazdag, zsírt keményíti (2. ábra) (Tasnádi, 1983).

Hüvelyes magvak (édes csillagfürt, takarmányborsó, szója) fehérjében gazdag pontytakarmányok. Foszfort és magnéziumot is tartalmaz. Természetes táplálék csökkenésekor etetésük ajánlott. Fontos, hogy hüvelyes magvakat hőkezelés nélkül nem etetünk, kivéve a nyárvégi fehérje kiegészítés céljára 10-15%-ban, áztatott borsót, szójadarát. Az abraktakarmányokat minden esetben áztatni kell. A megpuhult, áztatott szemeket szívesebben fogyasztják a halak és jobban is értékesítik. 100 kg takarmányra körülbelül 40 liter vizet számíthatunk. Ezt 10-12 órán át érdemes áztatni. A napi takarmányadagot tapasztalati úton az aktuális becsült összes tömeg százalékban fejezik ki. Az adag mennyiségét a vízhőmérséklet paramétereit figyelembe véve növelik, vagy csökkentik. A pontyok növekedését kéthetente próbahalászattal ellenőrizzük. A feletethető takarmány mennyiség ivadék halaknál a testtömeg 10-15%-nak megfelelő takarmány mennyiség, míg idősebb korosztálynál 2-5% (2. ábra) (Horváth, 2011).



2. ábra Klasszikus takarmányozás (Hegyi, 2012)

2.1.2. Keveréktakarmányozás

A keveréktakarmányok különböző adalékokból vannak összeállítva, ahol a szemcsékben az alapanyagok tulajdonságai is megvannak (pl. búza, borsó, halliszt). Ezeket a takarmánykeverékeket üzemekben készítik. Hátrány lehet a nagyfokú porlás, táplálóanyagok vízben való könnyű kioldódása, nehezebb szállítás, nagy csíraszám, vitaminok és zsírok miatt fokozott oxidációs károsodás. Szállítás, mozgatás közben könnyen szétkeveredik, így sokat veszít értékéből. Fontos, hogy ilyen takarmány megfelelően homogén legyen. Ha egyes részekben túl sok van egy-egy tápanyagból és a hal azt fogyasztja, mérgezést is okozhat. A helyesen összeállított keverékkel lényegese növelhető a területegységre jutó hozam, csökkenthető a fajlagos takarmány felhasználás, nagy energiatartalma fehérje kiegészítéssel a testtömeg gyarapodásban jobban hasznosul, vitaminok és ásványi anyagok hozzáadásával növelhető a szervezet ellenálló képessége (3. ábra) (Tasnádi, 1983).



3. ábra Keveréktakarmány (Hegy, 2012)

2.2. A gabonákban előforduló toxinok

Közel 1000 mikotoxin ismert jelenleg, valamint több 100 gombafaj, amik termelhetik a különféle mikotoxinokat. Az egyes gombanemzetségen belüli fajok is termelhetnek eltérő kémiai szerkezetű toxinokat, továbbá taxonómiaiilag távol álló fajok is termelhetnek azonos toxinokat. Ennek következtében többféle csoportosítás lehetséges:

1. A mikotoxinok bioszintézisének prekursorai alapján történő csoportosítás (Smith és Moss, 1985). Ez a csoportosítás azonban jelenleg nem teljes körű, hiszen számos mikotoxin bioszintézisének útja még nem ismert. A mikotoxinok egy része az acetyl-KoA és a malonil-KoA kondenzációjából vezethető le. Az aminosavakból származtatható toxinok csoportja heterogén, mivel N-heterociklikus vegyületeket és ciklikus polipeptideket is tartalmaznak.
2. A toxinok kémiai szerkezetéből adódó rokonság alapján való csoportosítás; furanokumarin származékok (pl. aflatoxinok); trichotecénvázak (pl. *Fusarium* penészek által termelt toxinok).
3. Farmakológiai hatás alapján történő csoportosítás; ebben az esetben átfedések lehetnek mikotoxinok között, mivel egy adott mikotoxinnak többféle hatása is lehet (Kovács, 2001; Rafai, 2003).
4. Egy régebbi csoportosítási mód a penészgombák előfordulását veszi alapul, azonban ez a csoportosítás mai ismereteink alapján már nem képez éles határokat a különböző penészgombák és az általuk termelt mikotoxinok besorolása között.

A szántóföldi-raktári penész csoportosítás (1. táblázat) azon alapszik, hogy a takarmánynövények nedvességtartalma a betakarítással egyidejűleg jelentősen lecsökken. Annak ellenére, hogy a mindkét csoportba tartozó gombák a szántóföldön, a talajban és a raktárakban is megtalálhatók, az elszaporodásukhoz a megfelelő feltételeket az egyik csak a vegetációs periódusban, a másik pedig a tárolás során is megtalálja. A toxintermelő gombák közül azokat, amelyek szaporodásukhoz magasabb nedvességtartalmat (20% fölött) igényelnek, szántóföldi penészeknek nevezzük. Rendszerint még a vetésterületen károsítják a növényeket. A szántóföldi gombák szaporító képletei a légmozgás hatására könnyedén szállítódnak és a levegő állandó képleteiként tekinthetünk rájuk (Rafai, 2003), azokat pedig, amelyek ennél alacsonyabb víztartalom mellett is képesek szaporodni, raktári penészeknek nevezzük. A szántóföldön történő raktári penészgomba fertőzés veszélye minimális, de talajlakó életformájuknak köszönhetően a spóráik a légmozgással, mind a lábonálló növényeket, mind a raktározott terményt fertőzheti. A legkisebb relatív nedvességtartalom mellett (14%) az *Aspergillus* sp., ennél valamivel magasabb páratartalom mellett (~16%) a *Penicillium* fajok fertőznek, 20% felett pedig a *Mucor* félék (Mézes, 1997).

Természetesen ezt a csoportosítást sem lehet mereven alkalmazni, mert pl. a *Fusarium* fajok – amennyiben túlélnek a betakarítást és a tárolást – a raktározás során is képesek tovább

szaporodni. Ezen képesség alapján már nem nevezhető élesnek a szántóföldi és raktári penészek közötti határvonal. A világgazdasági folyamatok (globalizáció) és a klímaváltozás következtében a legkülönbébb penészgombák és az általuk termelt toxinok fordulnak elő olyan helyeken, ahol eddigi előfordulásuk nem volt regisztrálva, vagy nem várták a megjelenését ennek a problémának (Dobolyi et al., 2011).

Penészgomba nemzetség	Penészgomba fajok	Mikotoxin(ok)
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nigrus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. versicolor</i>	aflatoxin-B1, B2, G1, G2 ochratoxin-A Patulin ciklopiazonsav
<i>Fusarium</i>	<i>F. verticilloides</i> <i>F. moniliforme</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. avenaceum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. poae</i> <i>F. equiseti</i> <i>F. acuminatum</i> <i>F. sambucinum</i> <i>F. sporotrichoides</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. sporotrichoides</i>	Fusarium B1, B2, B3 trichothecén vázasok: T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol, DON Zearalenon
<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i> <i>P. viridicatum</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. verrucosum</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. cyclopium</i> <i>P. camamberti</i> <i>P. expansum</i> <i>P. claviformae</i> <i>P. roqueforti</i>	ochratoxin-A Citrinin roquefortin, PR toxin ciklopiazonsav Patulin
<i>Stachybotrys</i>	<i>S. chartarum</i>	trichothecén vázasok
<i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>	alternariol, alternariol-metil-éter, altenuen, tenuazon-sav

1. táblázat A leggyakoribb mikotoxinokat termelő penészgombák (Mézes, 2009 nyomán)

Mikroszkopikus penészgombák, a természetben nagy számban előforduló heterotróf élőlények. Gabonaféléket megfertőzve, azokból nyerik a számukra szükséges

táplálóanyagokat. Eközben másodlagos anyagcseretermékeket választanak ki. Ezek a mikotoxinok. Ma már ezernél is több toxikus gomba metabolit ismert. Ezek közül körülbelül száz káros hatását bizonyították. Humán és állategészségügyi jelentőséggel 15-20 mikotoxin rendelkezik. A gombák közül vannak olyanok, amelyek toxinjai már a szántóföldön szennyezik a növényeket, mások raktározás közben termelnek toxinokat.

Fusarium penészgomba toxinjainak fertőzése:

- Zearalenon (F-2 toxin). Szinte minden állatfaj érzékeny a toxinra. Legfontosabb tünetek szaporodásbiológiai rendellenességek. Sertésnél megfigyelték a kocák vemhesülési arányát, nőtt a visszaivarzó egyedek száma, meddőség is kialakulhat. Tyúk kivételével valamennyi madárfaj érzékeny a toxinra (Internet 2).
- Trihotecén (T-2, DON, DAS). Főbb káros biológiai hatásai lehetnek a hányás, takarmány visszautasítás, ideg és immunrendszer károsodása. Elváltozások mértéke fajonként eltérő lehet. Szarvasmarha kevésbé érzékeny, juhok érzékenysége magasabb, sertésnél különösen magas, azonban táplálék visszautasítás miatt a heveny mérgezés ritka. Baromfifajoknál csökken a takarmányfogyasztás és testsúlygyarapodás, illetve tojáshozam és keltethetőség (Internet 2).
- Fumonizin B1 (FB1). Sertéseknél figyelték meg először. Tüdőödéma jelentkezett náluk. Lovaknál agylágyulás jelentkezett. Kezdeti tünetek lehetnek a bágyadtság, étvágytalanság, idegrendszeri tünetek, fokozott ingerlékenység. Kérődző állatok viszonylag rezisztensek a toxinra (Internet 2).

Aspergillus, Penicillium penészgombák toxinjainak fertőzése:

- Ochratoxin-A, vágóhídi sertésben veseelváltozásokat okoz. Baromfifajok érzékenyek rá, tünetei testtömeg gyarapodás, takarmányértékesítés, tojástermelés csökkenése.
- Patulin toxinja elsősorban emésztőszerveket károsítja. Fekélyek, immunrendszer csökkentő, rákkeltő és magzatkárosító hatása ismert.
- Citrin, vesekárosító hatása ismert, önmagában ritkán, más toxinokkal együtt szinergista hatású lehet (Internet 2).
- Aflatoxin (AFB1) szervezetre gyakorolt hatása alapján rákkeltő (karcinogén) hatású és a normális fejlődésre is hatással van (Internet 6).

A mikotoxin egy stressz termék. A növényeket és a penészeket érő bármilyen stresszhatás kiválthatja vagy fokozhatja a mikotoxinok termelődését. A szélsőséges időjárás mindkét véglete segítheti a terjedést.

2.2.1. Az aflatoxin előfordulás biológiája

Jelenlegi ismereteink alapján csak az *Aspergillus* nemzetség tagjai termelnek aflatoxinokat. Elsősorban az *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* fajok. Legjelentősebbek az aflatoxinB1, B2, G1, G2, amelyek nevüket a vékonyréteg kromatogramon UV fényben látható foltok színe alapján kapták, blue (kék) és green (zöld). Az *A. flavus* B1, B2, az *A. parasiticus* B1, B2, G1, G2 toxint termelik. A leggyakrabban és a legnagyobb mennyiségben az AFB1 fordul elő a növényi terményekben, a toxikológiai adatok zöme is az AFB1-re vonatkozik. A B2, G1, G2 toxinok gyakorlatilag nem találhatók az AFB1 nélkül, az összes aflatoxin szint 50-70%-át az AFB1 teszi ki (WHO, 1998). Az aflatoxinnal szennyezett takarmányt fogyasztó emlősök tejében (szarvasmarha, juh, kecske) az AFM1 és M2 (milk) hidroxilált metabolitok jelennek meg. Az aflatoxinok stabil molekulák, főzésnek, mikrohullámú kezelésnek ellenállnak, az UV fény hatására viszont bomlanak. Az AFM1 koncentráció pasztörözéskor nem változik (MacDonald és Castle, 1996).

Az *Aspergillus flavus* aflatoxin termelő törzsei a világon szinte mindenhol megtalálhatóak, jelen vannak a talajban, a levegőben. Mind a szántóföldön, mind a raktári körülmények között képesek megfertőzni a terményt. Magyarországon a klimatikus viszonyoknak köszönhetően a hazai élelmiszerek esetében aflatoxin szennyezettséggel napjainkig nem kellett számolni. Azonban sajnálatos módon a klimatikus változások következtében már több helyről jeleztek magas aflatoxin tartalmú Magyarországon termelt gabonát, sőt több esetben mutattak ki nagy aflatoxin termelő képességgel rendelkező élőnövényről izolált *Aspergillus* törzseket az utóbbi években (Dobolyi et al., 2011).

Az aflatoxinok metabolizmusa és egészségkárosító hatása

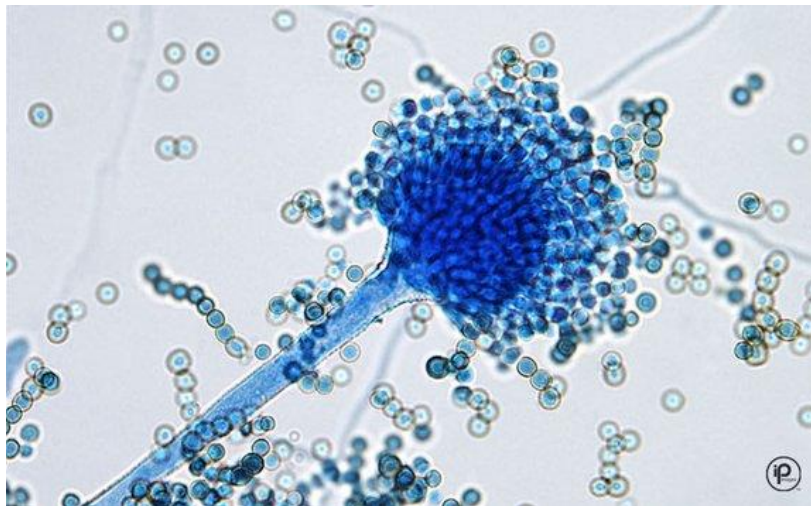
Az aflatoxinok erős mérgek: LD50 értékük állatfajonként változó 0,3-20 µg/testtömeg kg (Kovács, 2004). Akut toxikus hatásuk minden tanulmányozott állatfajban a máj nekroziséval jellemezhető, hosszabb expozíciós idő után kis dózisok fogyasztása esetén is májkárosító, genotoxikus és immunszuppresszív hatásúak. Májtumor előfordulását növelő hatását valószínűsítik epidemiológiai vizsgálatok Afrikában, Indiában, Délkelet-Ázsiában (Biró, 1999). Az IARC (International Agency for Research on Cancer) az aflatoxin csoportot, kiemelten az AFB1 típust humán 1A rákkeltőnek minősítette, míg a többi aflatoxint és azok metabolitjait 1B, azaz potenciálisan rákkeltő besorolást kaptak (Zinedine et al., 2007).

Ahhoz, hogy a felvett AFB1 genotoxikus hatást tudjon gyakorolni egy szervezetre, át kell alakulnia reaktív epoxiddá. Ezt az átalakítást a mono-oxigenáz enzim rendszerhez tartozó citokróm P450 enzimcsalád végzi. Ezek az enzimek a szervezetbe került idegen anyagok I. fázisú metabolikus folyamataiban játszanak szerepet. A májban történik az AFB1 aktiválása, a monooxigenázok által AFB1-8,9-epoxiddá oxidálódik, amelynek két izomere van, az exo és az endo forma. Az exo izomer kialakulását a CYP3A4 citokróm oxidáz enzim végzi. Hatására oxirán-származékot képez, egy oxigénatom kapcsolódik a 8. és 9. számú szénatomra. A létrejött AFB1-8,9-exo-epoxid molekula nagy affinitással kötődik a nukleinsavak guanin bázisához kovalens kötéssel, így AFB1-N7-guanint formálva. Ez a kötődés guanin-timin báziscserét, mutációt, DNS és RNS károsodást okozhat. A szervezetben zajló metabolizációs folyamatok második fázisának nagy szerepe van az AFB1-8,9-exo-epoxid DNS-hez való kötődésének megakadályozásában. A konjugációs kapcsolatot az epoxiddal a glutation-S-transzferázok képesek kialakítani. A kapcsolat eredményeként AFB1-GSH-konjugátum jön létre, amely már nem képes a szervezet molekuláival reakcióba lépni, és amit a szervezet a kiválasztó folyamatai révén az epén és részben a vesén keresztül a vizelettel kiürít (Wang és Groopman, 1999; Bedard és Massey, 2006).

A tárolás során a terményt és a penészt is stresszhatás éri. A nagy nedvességtartalommal betakarított takarmány betárolása esetén növekedni fog az aflatoxin tartalom. Ez a szint átszellőztetési hibákkal tovább nőhet. Amennyiben hirtelen jut oxigénhez a takarmány, annak mikotoxin tartalma is hirtelen növekedni fog. A kártevők is gondot okozhatnak, a rágcsálók és a rovarkártevők egyaránt. Az *Aspergillus* fajoknál (4. ábra) a mikotoxin termelés egyik befolyásoló tényezője, ha a magban elkezdődik a keményítő depozíciója, a másik tényező lehet a pH. Alkalikus közegben a toxintermelés nő. (Internet 4). Aflatoxin nagyon sok előfordulása közül a legveszélyesebb az aflatoxin B1. Ez karcinogén, mutagén, teratogén, citotoxikus és immunszuppresszív hatású. Az Európai Unió kiemelten foglalkozik ezen mikotoxin csoportok ellenőrzésével (Krifaton et al., 2011).

Az európai unió 574/2011/EU rendelete alapján a takarmány alapanyagok maximális AFB1 tartalma 20µg/kg, tejelő tehenek esetében 5µg/kg (Internet 3). Emlősökben, madarakban és halakban májgyulladást és májdaganat kialakulását idézi elő (Robens et al., 1992).

Az aflatoxinok stabil molekulák. Főzésnek, mikrohullámú kezelésnek ellenállnak, az UV fény hatására bomlanak (MacDonald et.al., 1996).



4. ábra *Aspergillus* gomba mikroszkópikus képe (Internet 9)

2.3. Toxikózis az állattenyésztésben

A tünetek súlyossága nagymértékben függ az elfogyasztott toxinmennyiségtől (Internet 5). A penészgombák a növény-és állattenyésztés számára egyaránt gazdasági és egészségügyi problémákat jelentenek. Növényeknél termés csökkenést, vetőmag minőség romlást okoz. A gomba növényi táplálóanyagokat használ fel. Ebből kifolyólag csökken a takarmány energia és esszenciális aminosav tartalma. Állattenyésztésben megfigyelhetjük a takarmányfelvétel csökkenését, rossz értékesülését, szaporodásbiológiai zavarokat, immunzavarokat és egyes toxinokra jellemző megbetegedéseket okozhatnak. A mikotoxikózis felismerését megnehezíti, hogy általában kis koncentrációban vannak jelen, ebből kifolyólag kimutatásuk nehézkes, tünetek nem jelentkeznek rögtön az állatban, illetve nem biztosan kórjelzőek, gyakran előfordul multitoxikus hatás, ami azt jelenti, hogy több toxin egyidejűleg van hatással (Internet 2).

A mikotoxikózisok minden esetben takarmányozási eredetűek, betegség nem fertőző, szennyezett takarmány elvonásával a tünetek csökkennek, szennyezett takarmány etetésével a tünetek mesterségesen kiválthatók (Internet 2).

A mikotoxinok takarmánnyal szájon át az állat szervezetébe jutnak, a bélcsatornából felszívódva a vérbe és szövetekben akkumulálódva egészségkárosító hatásúak (Kovács, 2011).

Abban az esetben, ha már kialakult a takarmányok előállítása során a mikotoxin szennyezettség (Paster et al., 1985), mód van olyan anyagok takarmány adalékanyagként való alkalmazására, amelyek képesek a takarmányban jelen levő mikotoxinok megkötésére

(Kovács, 2011). A mikotoxin adszorbens vegyületek hatása azon az elven alapszik, hogy nagy aktív felülettel, illetve jelentős számú, főképp poláros vegyületek megkötésére alkalmas kötőhellyel rendelkezik. Poláros jellege elsősorban az aflatoxinoknak van, így ennél a toxinnál lehet a legjobb eredményt elérni (Jouany, 2007). Mikotoxin megkötésre alkalmas szerves adalékanyagok szilícium polimerek és aktív szén (Cast, 2003). Szerves adalékanyagok pedig a nagy rosttartalmú takarmányok, élesztősejtfal kivonatok és egyes huminsav származékok (Smith, 1980).

A szakirodalmat áttekintve ponttyal történő aflatoxinos kísérletet még nem végeztek.

Shi-Xi és munkatársai 2010-ben tilápiákat etettek 20 héten keresztül aflatoxin B1 tartalmú földimogyoró őrléménnyel (hat kezelési csoport, AFB1 cc= 19,85,245,638,793 és 1641µg/kg), ezáltal vizsgálva annak hatását az állatok fejlődésére. Az első 10 hét alatt nem tapasztaltak változásokat. A 11-20 hétig azonban a 245µg AFB1/kg-al, vagy annál magasabb koncentrációban etetett csoportokban növekedési erély csökkenést, májfunkciós zavarokat, fokozott citokróm P450 A1 aktivitást és májszövet morfológiát tapasztaltak. A tünetek nem eredményezték az állatok elpusztulását. A halhúsban nem, de a májban sikerült AFB1-et kimutatni a kezelési dózistól függő koncentrációban (Shi-Xi et al., 2010).

Ying és munkatársai 2011-ben ezüstkárászokkal végeztek 16 hetes etetési kísérletet, 0, 10, 20, 50, 100, 200, 1000µg/kg AFB1/kg tartalmú tápbeállításokkal. A különböző koncentrációval kezelt csoportok esetében nem tapasztaltak elhullást és szénnövést. Az elvégzett májvizsgálatok alapján nem volt különbség a kontroll és az aflatoxinnal kezelt csoportok között. A 12 hetes etetést követően a 20µg/kg aflatoxin koncentrációval kezelt csoport esetében 5µg/kg AFB1-et mértek nedves tömegre számítva a hasnyálmirigyben. Míg az 1000µg/kg koncentrációval kezelt csoportoknál 2,5µg/kg AFB1-et mutattak ki nedves tömegre számítva az izomszövetben (Ying et al., 2011). 2014-ben publikált cikkükben ugyanezen eredményekre jutottak (Ying et al., 2014).

Tengeri sügérnél vizsgálva, az AFB1 mérgezésnél azt figyelték meg, hogy nagyon érzékeny a toxinnal szemben. Bizonyították, hogy fogyasztása egészségügyi problémát idézhet elő a humán táplálkozásban (Internet 4).

Következő esetben két halfajon vizsgálták az aflatoxin hatását. Az egyik a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) a másik pedig a pettyes harcsa (*Ictalurus punctatus*) volt. Itt azt tapasztalták, hogy a szivárványos pisztrángra mind rövid, mind hosszú távon a toxin DNS károsodást eredményezett, valamint a májsejtek károsodását is megfigyelték. Ezzel ellentétben a pettyes harcsánál nem találtak sejt károsodásra utaló jeleket (Internet 7).

2.4. A toxinok előfordulása és hatása a humán táplálkozásban

Mikroszkopikus gombák a környezetünkben mindenhol megtalálhatóak. Ma még nem teljesen tisztázott okokból kifolyólag olyan bonyolult szerkezetű, jelentős biológiai aktivitású, úgynevezett másodlagos anyagcsere termékeket is szintetizálnak, amelyekre a gombának a növekedéshez nincs szüksége. Csaknem minden növényi és állati termék szolgálhat szubsztrátként a gombák növekedéséhez. Penész jelenléte az élelmiszerekben nem jelenti automatikusan a mikotoxinok előfordulását. Toxinképződéshez megfelelő hőmérséklet, oxigén, szubsztrátum és levegő páratartalom szükséges. Egyazon gombafaj többféle mikotoxin egyidejű szintetizálására képes, ugyanakkor egy adott gombafaj számos mikotoxint képes termelni. Ezért egy-egy élelmiszer egyazon időben több mikotoxinnal lehet szennyezett (Sohár, 2007).

A mikotoxinok szállítás, feldolgozás és tárolás során közvetlen, vagy közvetett módon juthatnak be az élelmiszerbe és azok alapanyagába is, illetve már az alapanyagban is jelen lehetnek. A mikotoxinok állandó, kis dózisú jelenléte a lakosságot is folyamatosan veszélyezteti. A kis mennyiségű folyamatos expozíció hozzájárulhat a daganatos betegségek számának növekedéséhez, a lakosság immunállapotának gyengüléséhez (Szabó et al., 2007).

Az ember főleg a táplálkozás és táplálkozási alapanyagául szolgáló növényi és állati részekkel történő érintkezés és azok elfogyasztása során kerül kapcsolatba ezen másodlagos anyagcsere-termékekkel. A szervezetbe került mikotoxin még az emésztési folyamatoknak is nagymértékben ellenáll. A toxinok jelentős része áthalad a bélcsatornán és bélsárral ürül. Bélbaktériumok hatására egyes mikotoxinok részben detoxifikálódnak, míg egyes emésztőenzimek hatására metabolizálódhatnak. Felszívódás a vékonybélből történik. Ezután a toxin egy része a májon és az epén keresztül, részben konjugált formában, ismét visszajut a bélcsőbe és a májból a másik (rendszerint kisebb) része kerül a vérkeringésbe, ahonnan tejjel és vizelettel kiürül a szervezetből. Ezen okokból kifolyólag a tejmirigy és a vese is koncentrálna a mikotoxinokat. Az izomzatba csak a keringésben lévő mikotoxinok akkumulálódnak (Kovács, 2011).

A szervezetbe kerülve a mikotoxinok metabolizációs folyamaton mennek keresztül. Ez lehet közömbösítés, oxidáció, redukció, bontás, szintézis.

ELISA mérés

Mikotoxin vizsgálatok esetében megbízhatóan alkalmazható az enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). A módszer alapja, hogy az adott mikotoxint nagy antigenitású vegyülettel konjugáltatják, majd az így képződött konjugátumot annak háromdimenziós szerkezete alapján a receptorok felismerik és jelentős titerű antitest termelés indul meg (Gromadzka et al., 2008).

A mérés elve antigén-antitest kötésen alapul folyadék fázisban. A biotin-streptavidin a legerősebb ismert fehérje-ligandum kölcsönhatás. A mikrotitráló lemez celláiba, amelyek streptavidinnel fedettek bemérjük a toxin-standardokat, vagy mintákat; továbbá a toxinnal konjugált torna peroxidázt (konjugátum). A toxin és a konjugátum az ezt követően bemért, biotinnal kapcsolt, toxin-specifikus antitest antigén-kötő helyeiért vetélkedik (kompetitív enzim-immunoassay) kezdetben a folyadék fázis teljes térfogatában. Ezzel egy időben a biotinilált antitest, amely igen erősen kötődik a streptavidinhez, a vetélkedő komponenseket a cellák felszínéhez köti. Az inkubálást követő mosással minden nem kötődött komponenst eltávolítunk a rendszerből. Így a cellákba mért szintelen szubsztrátot csak a kötve maradt konjugátum képes kék terméké alakítani, ami az ellenanyaghoz kötődött szabad toxin mennyiségével fordított arányban áll. Az enzimreakciót leállító stop oldat a kék színt sárgára változtatja. Ennek optikai denzitása mikroplate-fotométerrel mérhető. A 450 nm-en mért abszorbancia tehát fordítottan arányos a mikotoxin koncentrációjával. A standard pontokból nyert kalibrációs görbe (x: lg(konc.), y: OD450) segítségével a minták koncentrációja egyértelműen meghatározható (Internet 8).

3. Anyag és módszer

3.1. A kísérleti körülmények, helyszín bemutatása

A Czikkhalas Halastavai Kft. 1982-ben alakult 6 db Szekszárd környéki halbolt létrehozásával, a Duna menti nagy halfogyasztás (8-15kg/fő/év) folyamatos kielégítése érdekében. A hal iránti nagy kereslet következtében azonban hamar kiderült, hogy a saját haltermelés elengedhetetlen. Az 1992-ben Varsádon megépült a gazdaság első két tava, majd ezeket 2003-ig nyolc új termelő tó követte. A tavak 130km² vízgyűjtő területű, tiszta vizű Donát-patakra épültek. Ma a gazdaság 10 termelő halastóval (234ha), 23 telelővel és két halboltal rendelkezik.

A cég úgynevezett részüzemű gazdaságként működik, nem rendelkezik saját keltetővel és az egynyaras nevelés volumene is igen alacsony. Kétnyaras halat három tóban nevelnek, mintegy 22ha területen, évi 50-55t mennyiségben. A cég fő profilját alkotó, a piaci haltermelés 212ha-on, évi 550-580t mennyiségben folyik. A megtermelt hal mennyiség 90%-a ponty, 6%-a ragadozó (csuka, süllő, lesőharcsa) és 4%-a amur.

A megtermelt mennyiség kb. 40%-át horgászegyesületek vásárolják meg, 40%-át szupermarketeknek értékesítik, a maradék 20%-ot pedig a saját halboltokon keresztül juttatják a fogyasztóhoz.

A tervezett kísérlet rövid ismertetése: egy és kétnyaras pontyok ismert aflatoxin tartalmú takarmánnyal történő etetése egy teljes időszakon keresztül. A takarmányban a jogszabályban megengedett 20,51µg aflatoxin B1 koncentrációt állítottuk be. A halakat több csoportra osztottuk: kontroll és kezelt, melyeket az alábbi telelőkbe helyeztünk ki: kontroll 12, 13-as telelők, toxinos: 14, 15, 16 és 17-es telelőkbe 2014. május 14-én. A szennyezett kukoricát a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék állította elő, mivel ők rendelkeznek aflatoxin B1 termelő *Aspergillus flavus* gombatörzsszel. A szennyezett takarmánnyal történő etetés 2014. július 22-i időpontban indult el. Az etetés megkezdése előtt a tavak nulla állapot felvételezése víz és iszap mintavétellel megtörtént 2014. június 2-án.

3.2. A vizsgálatok helyszínei és azok jellegzetességei

A kísérletekhez a nyári hónapokban üresen álló, 6 telelő tó biztosított helyet (5. ábra). Ezen tavak a kísérlet előtt fertőtlenítve lettek, telelőnként 50-50kg klórmésszel. Feltöltés során mindenképp törekedtünk a gyomhal mentesség megőrzésére, ezért a befolyó vizet haltörő rácson engedték keresztül. A telelők nem átfolyó rendszerűek voltak, nem volt rajtuk folyamatos vízcsere, csak az elpárolgó vizet pótoltuk. Elektromos levegőztetőket is elhelyeztünk a tavakon, melyeknek oxigénhiányos időszakban volt fontos szerepük.



5. ábra A Czikkhalas Halastavai Kft. teleltavai (Czikkhalas Kft., 2010)

A teleltó tavak eltérő méretűek, területűek és térfogatúak voltak (2. táblázat). Alakjuk téglalap, átlagos vízmélységük 1,5m. A tavak falainak vízszint alatti része geotextiliával van fedve. Ennek partvédelemben van fontos szerepe, mivel megakadályozza, hogy a pontyok kitúrják a gát oldalát a természetes táplálkozó tevékenységük révén. A tavak fenéke kemény, vékony iszapréteggel borítva.

A víz feltöltése a gátban lefektetett csővezeték rendszeren keresztül történik, szivattyúk segítségével. Mind a hat teleltőnek saját, csappal ellátott leágazása van erről a csőrendszerről, így az egyes medencékben külön is lehet szabályozni a befolyó víz mennyiséget. A víz leeresztése barát-zsilipeken keresztül történik. Ezek a műtárgyak egymással szemben, átlósan helyezkednek el a gátakon, így az esetleges vízcsere alatt a lehető legnagyobb vízmennyiséget lehet megmozgatni.

	12 teleltő	13 teleltő	14 teleltő	15 teleltő	16 teleltő	17 teleltő
Terület (m²)	1084	974	851	838	785	441
Térfogat (m³)	1800	1600	1400	1400	1300	900

2. táblázat A teleltó tavak méretei és térfogatai

3.3. A telelő tavak népesítése

A telelő tavakba történő kihelyezés a célkitűzésben meghatározott szempontok szerint történt, azaz egy és kétnyaras pontyok ismert aflatoxin tartalmú takarmánnyal történő etetése egy meghatározott időszakban és a kísérlet befejeztével a toxin halakra és a környezetre gyakorolt hatásának vizsgálata. A 3. táblázatban látható, hogy jóval kisebb telepítési sűrűséggel dolgoztunk, mint az a hagyományos technológiánál megszokott. Kihelyezéskor minden telelőnél pontos leszámolást, súlymérést és egészségügyi szemrevételezést végeztünk. A kihelyezéseket úgy végeztük el, hogy 3 telelőtóba egynyaras (P1), 3 tóba pedig kétnyaras (P2) korosztályú pontyegyedek kerültek. A kihelyezéskor a 12-es (P2), és 13-as (P1) számú telelőtavakba szántuk a kontrollnak szánt egyedeket, a 14 (P2), 15 (P2), 16 (P1) és 17-es (P1) tavakba pedig a toxinnal fertőzni kívánt halak kerültek. A 3. táblázatban láthatjuk a kísérleti kihelyezés irányszámait.

A halak kihelyezésére május 14.-én került sor. A tiszta, toxinmentes takarmány etetése május 15.-én kezdődött, mind a 6 telelőtóban.

Telelők száma	12 (P2,kontroll)			13 (P1,kontroll)			14 (P2, toxin)			15 (P2,toxin)			16 (P1,toxin)			17 (P1,toxin)		
	db	Átl. kg	Össz kg	db	Átl. kg	Össz kg	db	Átl. kg	Össz kg	db	Átl. kg	Össz kg	db	Átl. kg	Össz kg	db	Átl. kg	Össz kg
Kihelyezés	130	0.246	32	300	0.043	13	85	0.247	21	83	0.241	20	235	0.074	17.5	130	0.073	9.5

3. táblázat A kísérlet kihelyezési irányszámai

3.4. Az aflatoxinnal szennyezett takarmány előkészítése

Az aflatoxin B1 tartalmú kukorica előállítása:

Az aflatoxin B1 tartalmú kukoricát a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék munkatársai állították elő Gödöllőn.

Tiszta toxinmentes kukoricát a Tanszék által Magyarországon izolált Zt80 jelzésű *Aspergillus flavus* gombatorzzsal kezeltek, majd 30 napon keresztül inkubálták 28 °C-on az így előkészített kukoricát. A mikotoxin termelődést 3 alkalommal ellenőrizték az inkubáció alatt, ELISA vizsgálattal.

A 30. nap végére 10,6 mg/kg aflatoxin B1 koncentrációt sikerült elérni laboratóriumi körülmények között. Az így előállított kukoricát sterilizálás és 65 °C-on történő szárítást követően elszívófülkében ledarálták és a keletkezett darát 1,365 liter étolajban felvéve jutatták

el zárt edényzetben az etetési kísérlet helyszínére. Az olajban történő felvételre a kiporzás elleni védelme és a jobb elkeverhetőség (homogenizálhatóság) miatt volt szükség. Az így előkészített aflatoxin B1 tartalmú kísérleti takarmány összesen 3 kg olajos-kukoricadara 16 mg aflatoxin B1 koncentrációval, melyből naponta történt kiadagolás az etetésre szánt takarmányhoz az etetés helyszínén.

A toxinnal szennyezett takarmány etetését július 22.-én kezdtük meg. Minden egyes etetési napot megelőzően, július 22.-e és augusztus 23.-a között a 12-es kontroll telelőbe szánt 3 kg törtszemet 3 liter tiszta vízbe beáztattuk, hasonlóképp jártunk el a 13-as kontroll telelővel is, csak 4 kg takarmányhoz 4 liter vizet adtunk hozzá. A 14, 15, 16, 17-es telelőkbe már toxinos takarmány kijuttatása volt a cél. Ezen esetben 10 kg törtszemű kukoricát egy nagy edénybe kimértünk, 10 liter vízben elkevertük-feloldottunk 80 gramm toxinos-olajos kukoricát. Ez a mennyiség kellett ahhoz, hogy a 10kg törtszemben 20µg/kg körüli toxin értéket kapjunk. Augusztus 24.-e után ezt a mennyiséget megemeltük, mivel a halak átlagsúlya megnőtt, így több takarmányra volt szükségük. A 12-es telelőben a törtszem mennyisége 4 kg-ra növekedett, melyhez 4liter vízre volt szükség, a 13-telelő pedig 5 kg törtszemet kapott, 5 liter vízbe áztatva. A toxinos (14, 15, 16, 17) telelőkbe szánt mennyiséget 14 kg-ra emeltük, emellett a 14 liter vízben feloldott olajos-toxinos kukorica mennyiség, a 20 µg/kg toxin eléréséhez 120 µg-ra emeltük.

A napi takarmánymennyiséget (4. táblázat) a halak átlagtömege, a tóban lévő darabszám és a testtömeg százalék alapján határoztuk meg. Az alkalmazott takarmányozási szint (testtömeg százalék) a halak korától, étvágyától, vízhőmérséklettől függ. Átlagosan elmondható, hogy az egynyaras pontyok (13, 16, 17-es telelők) testtömegük 4%-át, a kétnyaras halak (12, 14, 15-telelők) pedig 2%-át kapták. A takarmány súlyát száraz állapotában számítva értelmezzük. A beáztatott mennyiség, amit megkaptak a halak ennek a duplája.

Telelők	12(P2) kontroll	13(P1) kontroll	14(P2) toxinos	15(P2) toxinos	16(P1) toxinos	17 (P1) toxinos
Kg (júl.22-aug.23)	3	4	2	2,5	3,5	2
Kg (aug.24-szept.14)	4	5	3	3,5	4,5	3

4. táblázat Kijutatott takarmány mennyiségek kg/nap

3.5. A takarmányozás rendje

Takarmányozásnál figyelniünk kell arra, hogy a takarmány mennyiséget minden nap ugyanabban az időben kapják meg. Ez azért fontos, mert a halak megszokják az etetés idejét és a megszokott időben már összegyűlnek és várják a táplálékot.

Fontos, hogy a pontyok maradéktalanul elfogyasszák a kijuttatott takarmányt. Helytelen, ha azt nagy területen szórjuk szét, ekkor ugyanis a sok takarmányszem az iszapba, növények közé esik és azt azután még a jól kereső pontyok sem találják meg. A pontyok a rendszeres, pontos etetést és állandó etetőhelyeket megszokják. A takarmány elfogyasztásának megfigyelése érdekében úgynevezett „takarmány felnézőt” (6. ábra) használtunk, amellyel minden nap le tudtuk ellenőrizni, hogy elfogyasztották-e a bejuttatott takarmány mennyiséget. Ez úgy történt, hogy egy aprólyukú dróttal bevont keretet a vízbe helyeztünk az etetés közvetlen közelébe és egy kisebb mennyiségű kukoricát minden nap rászórtunk a keretre is és ezt a következő nap reggelén kiemelve a vízből meg tudtuk állapítani, hogy elfogyasztották-e az előző nap kijuttatott takarmányt. Ezt rendszerint minden nap leellenőriztük és csak utána adtam ki az aznapi takarmányt.

Törekedniünk kellett arra is, hogy egyszerre minél több egyed jusson a takarmányhoz. Ez a mi esetünkben nem okozott gondot, a kis halsűrűségnek köszönhetően könnyedén oda juthatott minden egyed.

Nem kellett több helyre etetniük, mivel kis vízterületről volt szó, ahol a halak könnyedén megtalálhatták a kijuttatott takarmányt.

Fontos dolog volt az is, hogy miután kijuttattuk a takarmányt, igyekeztünk elkerülni a nagy mozgást, zúgást az etetőhely körül, így nyugodtan el tudták fogyasztani a napi táplálékmennyiséget a pontyok.

Az előkészített, beáztatott toxinos és toxinmentes törtszemű kukoricát minden reggel 7 és 8 óra között juttattam ki a telelőkbe.



6. ábra Takarmány felnéző (Hegyí, 2012)

3.6. Lehalászás

A takarmányozási kísérlet végét jelentő lehalászás szeptember 16-án történt. Ekkorra a halak étvágya már csökkenni kezdett, hiszen a víz hőmérséklete 20°C alá esett. A lehalászást a 12-es, kontroll tóval kezdtük, és haladtunk tovább a 17. sz. telelőtőig. Egy nap elegendő volt erre, a telelőkben levő kevés halmennyiség miatt. A kifogott halakat megszámtoltuk, megmértük a súlyukat, és minden telelőből 5-5 db halat külön választottunk a mintavételezések elvégzése céljából. A többi halat méret és a toxinos mérgezés szerint szétválogattuk és ezen csoportokat összevonva telelőkbe helyeztük.

Termelési eredmények meghatározásának módszere: kihelyezett állomány, tömeg (x), illetve lehalászott tömeg (y). A nettó hozamot úgy kapjuk meg, hogy a lehalászott tömegből kivonjuk a kihelyezett tömeget ($y-x$). A nettó hozamnak két része van. Természetes és takarmány hozam. A természetes hozamot nem tudjuk pontosan kiszámítani. A takarmány hozam kiszámításának két féle módja lehetséges. Első esetben amikor a takarmány keményítő értékét vesszük figyelembe. Itt tudni kell pontosan milyen és mekkora mennyiségű takarmányt juttatunk ki és ezeknek a takarmányoknak pontosan mennyi a keményítő értékük. 1kg halhozamhoz 3,5kg keményítő érték szükséges. A másik módszer egy standard elfogadott szám, ami azt jelenti, hogy 1kg halhozam eléréséhez 4,5kg takarmányra van szükségünk. Tehát miután a kietetett összes takarmány mennyiséget elosztjuk 4,5-tel megkapjuk a takarmány hozam mennyiséget.

3.7. Mintavételi eljárások, módszerek

3.7.1. Tavak vizsgálata

A kísérletbe állított telelőtavakat a kísérletek megkezdése előtt és után vontuk vizsgálat alá.

A teleltető tavak nulla, kiinduló állapotának felvételére 2014. június 2. került sor. A 6 tóból a toxinos kezelésre kijelölt 4 esetében (14, 15, 16, 17) végeztünk iszap- és vízmintavételezést (7. ábra).

Az iszapmintákat 65 °C-on szárítottuk 24 órán keresztül, majd porrá őröltük. Ezt követően ToxiWatch ELISA kit segítségével elvégeztük a gyártó által előírt módon az aflatoxin B1 tartalom mérését.

A vízminták esetében ugyan ezt a ToxiWatch ELISA kit tesztet alkalmaztuk, a folyadékminták feltárására vonatkozó protokoll elvégzése mellett

Az etetési kísérlet befejezésekor mind a 6 tavat mintáztuk (iszap és víz mintavétel). A minták feltárását a már fent leírt módon végeztük el.

Az aflatoxin koncentrációkat ELISA teszt segítségével határoztuk meg.



7. ábra Üledékminta gyűjtése (Bokor, 2014)

3.7.2. Víztest állapotának fizikai, kémiai vizsgálata

Napi rendszerességgel a víz hőmérsékletét, az oxigén koncentrációt, telítettséget és pH értéket is feljegyeztük. A méréseket minden reggel a takarmány kijuttatása előtt végeztük (8. ábra).



8. ábra Multiparaméteres kézi műszer (Hegyi, 2014)

3.7.3. Halak fejlődésének vizsgálata

A kihelyezett állomány növekedésének és egészségi állapotának felmérése érdekében kéthetente próbahalászatot végeztünk. A halakat a napi etetést követően, próbahalászatkor a beszórt takarmány helyén dobóhálóval fogtuk meg. Minden alkalommal a legtöbb hal megfogására törekedtünk. Megszámoltuk és mérlegeltük őket. Megkaptuk a csoportok átlagsúlyát és ebből kiszámoltuk az összes kifogott hal átlagsúlyát. Így pontos képet kaptunk az állomány növekedéséről. A méréshez nagy teherbírású, körszámlapos mérleget használtunk.

3.7.4. A takarmány toxinkoncentrációjának meghatározási módszertana

A takarmányba belekevert aflatoxin mennyiséget minden nap megmértük. Ezt Reveal Q + aflatoxin szintmérő műszerrel végeztük. Ez a Neogen AccuScan Pro rendszer egy immunokromatográfiás tesztcsíkból és egy adatkezelő szoftverből áll. Ez egy egylépéses laterális immunokromatográfiás vizsgálat az aflatoxin mennyiségi vizsgálatára kukoricában és kukorica termékekben.

ELISA Toxi Watch metodikája

- Az ELISA lemezt 250 µl WASH oldattal mossuk. (Használat előtt a koncentrátumot 10x-ére hígítjuk.)
- A megfelelő mintahígítást követően bemérjük a standard sor elemeit és a mintákat. AFB1 esetén 75 µl-t kell bemérni egy well-be.
- Bemérjük a konjugátumot (CONJ). AFB1 esetén 25 µl-t egy well-be.
- Minden well-be 100-100 µl antitest oldatot pipetázunk.
- A mikrolemezt szobahőmérsékleten sötétben inkubáljuk. AFB1 esetében 1 órán át
- Az ELISA lemezt 250 µl WASH oldattal mossuk 5-ször.
- Bemérünk 150 µl TMB-szubsztrát (SUB) oldatot.
- A mikrolemezt szobahőmérsékleten sötétben inkubáljuk. AFB1 esetében 15 perig,
- Bemérünk 50 µl STOP oldatot a reakció leállításához
- 450 nm-en megmérjük az OD értékeket.
- Megrajzoljuk a kalibrációs görbét és kiszámítjuk a minták toxin koncentrációit.

	Aflatoxin-B1
Kimutatási tartomány	0,03-40
Kimutatási határ (LOD)	0,025
Meghatározási határ (LOQ)	0,04

5. táblázat A TOXIWATCH ELISA Kitek mérési jellemzői (ng/ml) a gyártói útmutatások alapján

3.7.5. Hematológiai vizsgálatok

Ezen vizsgálatainkban a teljes vért, illetve a vérplazma aflatoxin koncentrációját határoztuk meg.

A vérvételt tekintve minden egyedtől minimálisan 10-12 ml vért vettünk (9. ábra). A halakat oldalukra fordítottuk, a tűt a farok alatti úszó és az oldalvonal között szúrtuk be, a halak farokvénájába (*vena caudalis*). A vér alvadását heparinnal gátoltuk. A vérvételhez steril, eldobható 21-25 G nagyságú tűket és minden esetben 20 ml-es fecskendőt használtunk fel. A heparinnal kezelt vérmintákból centrifugálással (3000 fordulat/perc, 10 perc) választottuk el az alakos elemeket. A vérplazma leszívása után a fehérvérsejteket és vérlemezeket tartalmazó réteget eltávolítottuk. Ezek után a vérmintákat hűtőtáskában

szállítottuk a további vizsgálatok helyszínére. A vérvétel és a vérplazma feldolgozása között a mintákat -32°C-on tároltuk. A vérplazmából ELISA módszerrel határoztuk meg az aflatoxin koncentrációját minden egyes csoportban.



9. ábra Vérminták (Hegy, 2014)

3.7.6. Hisztológiai vizsgálatok

A kísérletek befejeztével kórszövettani vizsgálatokat végeztünk a májszövetből az aflatoxin koncentráció ellenőrzésére (10. ábra). A 6 telelőből 5-5 példányt véletlenszerűen kiválasztottunk, ezeken megfelelő módszerekkel boncolásokat végeztünk. A májminták egy részét falconcsőbe helyeztük, a másik részét pedig fixáltuk szövettani vizsgálatokhoz. A máj aflatoxin koncentrációját ugyancsak ELISA teszt (Toxi Watch Kit) segítségével határoztuk meg. A szövettani vizsgálatokhoz a mintákat bouin folyadékban fixáltunk. 12-16 órás fixálást követően a mintákat 75%-os etilalkoholba helyeztük át a feldolgozásig. Dehidratáció felszálló alkoholsorban történt (75-95%-os etilalkohol), amit xilolos átmosás és paraffinba ágyazás követett. A beágyazott mintákból szánkás mikrotóm segítségével 2-5µm-es metszeteket készítettünk. A metszeteket hematoxin-eozinnal, valamint perjódsv-Schiff-reakcióval (PAS) festettük meg. A kórszövettani metszeteket Nikon Eclipse E600 mikroszkóp segítségével vizsgáltuk és dokumentáltuk.



10. ábra Szövet mintavételezés (Hegyi, 2014)

3.7.7. A májszövet aflatoxin koncentrációjának meghatározása

A mintaként -78°C -on tárolt szöveteket felolvasztás után Ika Turax homogenizátorral homogenizáltuk ACN: víz (84:16) oldószerrel, 3X mennyiséggel. 30 perces rázatás, és az ezt követően centrifugálás (5 perc 3000 rpm), után acetonitrilt bíró 22 μm -es fecskendőszűrőn a felülúszó leszűrtük. Ezt PBS-sel történő hígítás követte (total aflatoxin kit esetében: 3X és 5X hígítás), AFM1 esetében 5X és 10X hígítással. A spike-olt minta visszanyerése AFB1 esetében 70 és 83 % volt, az AFM1 esetében 80 és 92% közé esett a visszanyerés.

Mindezek mellett a hasúri zsiradékból (ahol megtalálható volt) és halhúsból is mintákat gyűjtöttünk későbbi vizsgálatok, mérések céljából.

3.8. Alkalmazott statisztikai módszerek

Az egyes csoportok eredményeinek összehasonlítására kétmintás „t” próbát alkalmaztunk. A statisztikai elemzéshez GraphPad prism 5 statisztikai programcsomagot használtuk.

4. Eredmények

4.1. Tavi vizsgálatok során elért eredmények

Mind az iszap, mind a vízvizsgálatok negatív értéket adtak, azaz sem a vizsgált iszap, sem a vizsgált víz mintákban nem mértünk aflatoxin B1 koncentrációt az etetési kísérlet megkezdése előtt.

Az etetési kísérlet befejezésekor mind a 6 tavat mintáztuk (iszap és víz mintavétel). A minták feltárását a már fent leírt módon végeztük el. A mintákból az ELISA kittel történt mérés során nem mutattunk ki aflatoxin B1-et.

4.2. A tóvíz fizikai, kémiai tulajdonságainak eredményei

A víz oldott oxigénkoncentrációja, hőmérséklete és pH alakulása a kísérleti idő alatt minden nap fel lett jegyezve.

A telelő tavak paraméterei átlagosan a következőképp alakultak:

- Hőmérséklet: 22,8°C
- pH: 8,2
- Oldott oxigén: 4,9 mg/l
- Oxigén telítettség: 57,41%

4.3. Termelési eredmények bemutatása

A kihelyezett állomány a lehalászáskor a következőképp alakult:

- A 12-es, (P2) kontroll telelőbe a 130db kihelyezett halból mind a 130 megmaradt. Ami azt jelenti, hogy 100%-os megmaradást értünk el. A halak átlagsúlya 0,246kg-ról 1,55kg-ra növekedett. A 32kg kihelyezett összsúlyból 171,5kg hozam sikeredett, amiből a takarmányhozam 54kg.
- A 13-as, (P1) kontroll telelőbe a 300 kihelyezett egyedből 203db-ot sikerült lehalásznunk. Ez 67,67%-os megmaradást jelent. A kezdő 0,043kg átlagsúlyból 0,9kg lett a kísérlet végére. A kihelyezett mennyiség 13kg-volt, a hozam 170kg-lett, amiből a takarmányhozam 54kg.

- A 14-es, (P2) toxinos telelőbe a kihelyezett 85db halból 83-at befogtunk, ami 98%-os megmaradást jelent. Az induló 0,247kg-os átlagsúlyból 1,84kg-os halak lettek a végére. Az összes 21kg pontyból 171,5kg lett, amelyből a takarmánynak köszönhető hozam 38kg.
- A 15-ös, (P2) toxinos telelőbe a kihelyezett 83db-ból 82 megkerült a lehalászáskor, ami 99%-os megmaradást jelent. Az átlagsúly 0,241kg-ról 1,91kg-ra növekedett. A hozam 130,5kg-volt, amiből a takarmánynak 42kg köszönhető.
- A 16-os, (P1) toxinnal szennyezett telelőbe 235 egyedből 168 egyed maradt életben a kísérlet végéig. Ez 71%-os megmaradást jelent. A kihelyezett 0,074kg átlagsúlyról 0,88kg-ra emelkedett a halak tömege. A kísérlet végére 130,5kg hozam lett a kezdő kihelyezett 17,5kg összsúlyból. Ebben az esetben takarmánynak 60kg-ot köszönhetünk.
- A 17-es, (P1) toxinos telelőbe a 130db-ból 91 egyed maradt életben. Ez 70%-os megmaradást jelent. Az átlagsúly a kísérlet kezdetekor 0,073kg-volt, a végére ez 1,07kg-ra emelkedett. A hozam 87,5kg lett, kihelyezéskor ez mindösszesen 9,5kg volt.

Az termelési eredményeknél (6. táblázat) azt láthatjuk, hogyan alakult a kísérlet végéig a pontyok megmaradása, növekedése, toxin mennyiség a 4 toxinnal kezelt telelőben. Mindezt, ha megvizsgáljuk, azt láthatjuk, hogy az előírt takarmányozás mellett a toxinnal kezelt és kontroll állományok között az aflatoxin által kiváltott hozamkiesés és elhullás nem volt tapasztalható.

Telelők	12	13	14	15	16	17
Korcsoport	P2 kontroll	P1 kontroll	P2 toxin	P2 toxin	P1 toxin	P1 toxin
Kísérleti idő (nap)	55	55	55	55	55	55
Megmaradás (db/%)	130/100	203/67,67	83/98	82/99	168/71	91/70
Átl.súly (kg/db)	1,55	0,9	1,84	1,91	0,88	1,07
Takarmány (kg)	244	310	171,5	189	270	172
Hozam (kg)	171,5	170	132	137	130,5	87,5
Takarmány hozam (kg)	54	69	38	42	60	38

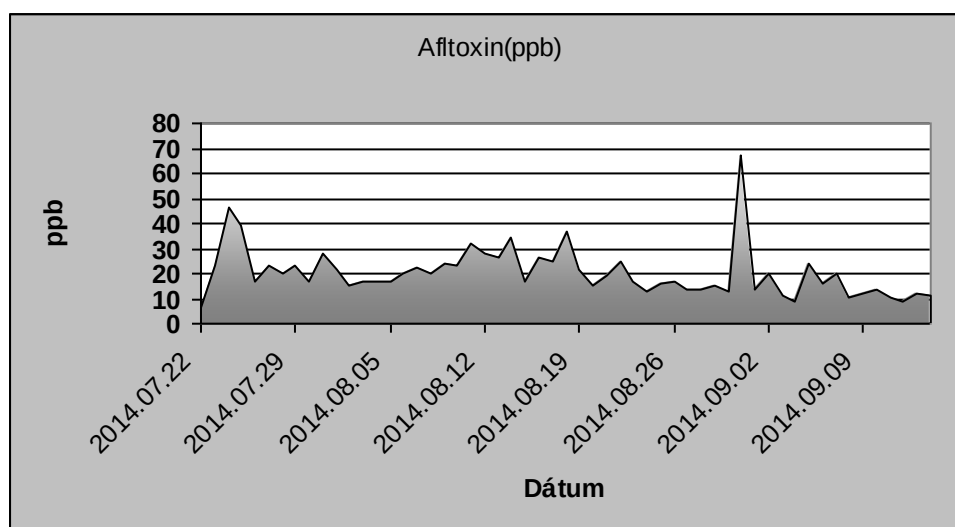
Természetes hozam (kg)	117	101	94	95	70,5	49
Nettó hozam (kg/ha)	1581,23	1744,2	1551	1634,41	1661,265	1983,62
Feletetett toxin (µg)	-	-	2707,68	3282,04	4410,24	2707,68
Toxinos takarmány (kg)	-	-	132	160	215	132
1kg hozamra jutó toxin (µg/kg)	-	-	20,51	23,95	33,8	30,94

6. táblázat A takarmány alakulása, termelési eredmények

4.4. A takarmány toxinkoncentrációjának alakulása a kísérleti idő alatt

A toxinkoncentrációt minden nap a takarmány kietetése előtt megmértük (11. ábra). Ez azért volt különösen fontos, mivel az volt a célunk, hogy a megengedett felső határértéknél átlagosan ne kerüljön több toxin a halak szervezetébe és, hogy nyomon tudjuk követni az aflatoxin dózisokat a kísérlet ideje alatt. Eleinte nem volt könnyű beállítani a megfelelő toxin mennyiséget.

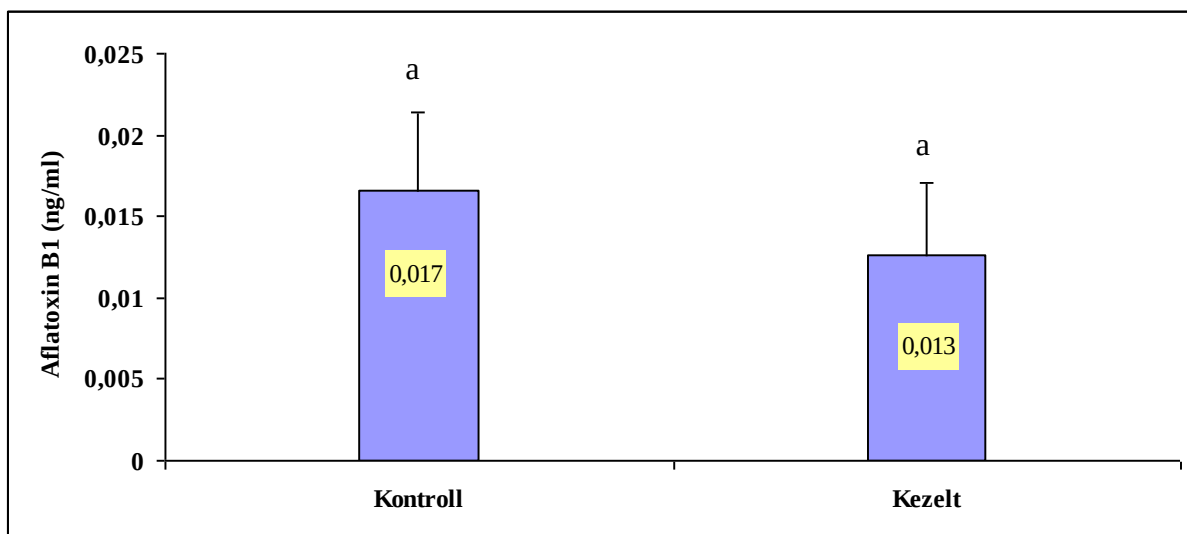
Az összes feletetett toxinos takarmány mennyiség a 4 toxinnal kezelt telelőben (14, 15, 16, 17) 639 kg volt. Átlagos toxinszintet 20,51 µg-ra sikerült beállítani.



11. ábra Aflatoxin koncentráció alakulása az etetések során

4.5. Hematológiai eredmények bemutatása

A vérplazmában kapott eredményeket a következő ábra szemlélteti (12. ábra).



12. ábra A kontroll (13. telelő) és a kezelt (17. telelő) csoportban kapott vérplazma aflatoxin koncentráció

A két kiválasztott telelőben (kontroll és kezelt) szinte azonos aflatoxin B1 koncentrációkat kaptunk. A kis különbség lényegében elhanyagolható, mindösszesen 0,004 ng/ml, azaz 4 pg/ml. Kétmintás „t” statisztikai próbával elemezve a kapott eredményeket elmondhatjuk, hogy a két csoport egyedeinek vérplazmájának aflatoxin koncentrációjában nem volt statisztikailag igazolható különbség ($P=0,2102$).

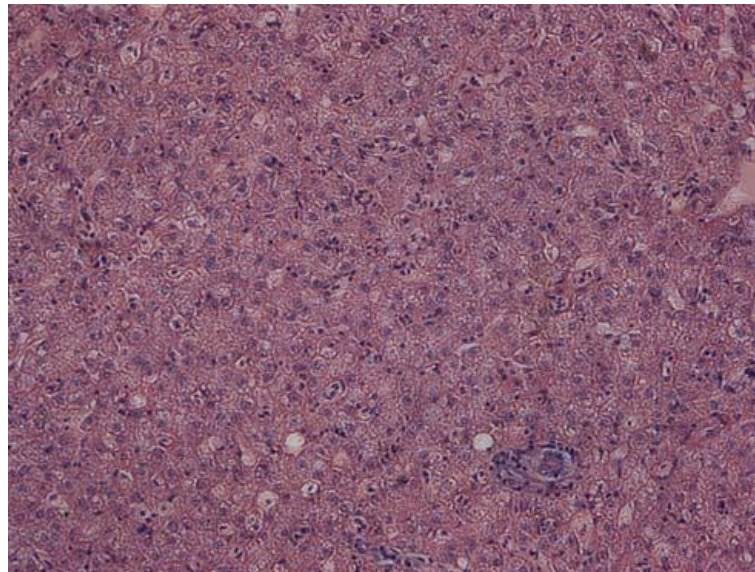
4.6. Májszöveti eredmények bemutatása

4.6.1. A kontroll csoportokban kapott májszöveti eredmények

Hematoxin-eozin festés

A kontroll csoportokban (12. és 13. telelőtő) a májban apró zsírcseppek mindenütt megtalálhatóak, de a centrális véna körül a lebenyek külső részen egyenletes eloszlásban nagy zsírcseppek is előfordulnak (13. ábra). A máj homogén eloszlású. A sejtmagok épek, egyforma nagyságúak és centrális elhelyezkedésűek. Néhány esetben kismértékű élettani

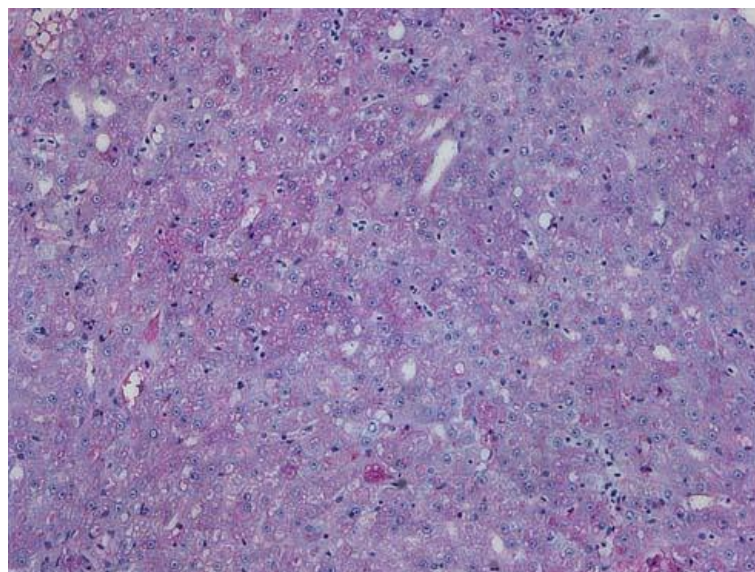
zsíros infiltráció látható. Mindez azt jelenti, hogy kilépett sejteket találunk, helyükön pedig vörösvérsejtek foglalnak helyet. Levált hámsejtek előfordulnak a hepatopancreas lumenében.



13. ábra Hematoxin-eozin (HE) festés a kontroll csoportban (Lefler, 2014)

PAS (Perjód-sav-Schiff) festés

A kontroll mintákból készített hisztológiai metszeteken a glikogén mennyisége normális és egyenletesen oszlik el a citoplazmában (14. ábra).



14. ábra Perjód-sav-Schiff festés a kontroll csoportban (Lefler, 2014)

4.6.2. A kezelt csoportokban kapott májszöveti eredmények

4.6.2.1. 14. telelőtő

Hematoxilin-eozin festés

A májsejtek alakja, nagysága normális. A sinusoidok (kapilláris) tágak. Kismértékű zsíros infiltráció figyelhető meg (apró zsírcseppek). A sejtmagok közepén helyezkednek el.

PAS (Perjódsv-Schiff) festés

A glikogén mennyisége lényegesen alacsony, a meglévő glikogén nagyobb területeken gócosan helyezkedett el.

4.6.2.2. 15. telelőtő

Hematoxilin-eozin festés

Sok apró víz és zsírcsepp alakult ki a máj szövetében. A sinusoidok beszűkültek. A kupfersejtek aktiválódtak, amelyek a vérképzésben, az antitesttermelésben, ill. a sejttörmelékek és az idegen testek kiszűrésében játszanak szerepet. A sejtek vastag szivarszerűvé vastagodtak. Mindezek víz-, és szénhidrátforgalmi zavarokra utalnak. Sejtes infiltráció volt figyelhető.

PAS (Perjódsv-Schiff) festés

A glikogén normális és egyenletes eloszlású. Randomfokális nekrobiózis (véletlenszerű, foltokban történő gócos elhalás) figyelhető meg.

4.6.2.3. 16. telelőtő

Hematoxilin-eozin festés

Sejtes infiltráció figyelhető meg, foltokban zsíros infiltráció. A sejtek károsodása kifejezettek voltak, az elhelyezkedés a normálistól eltérő.

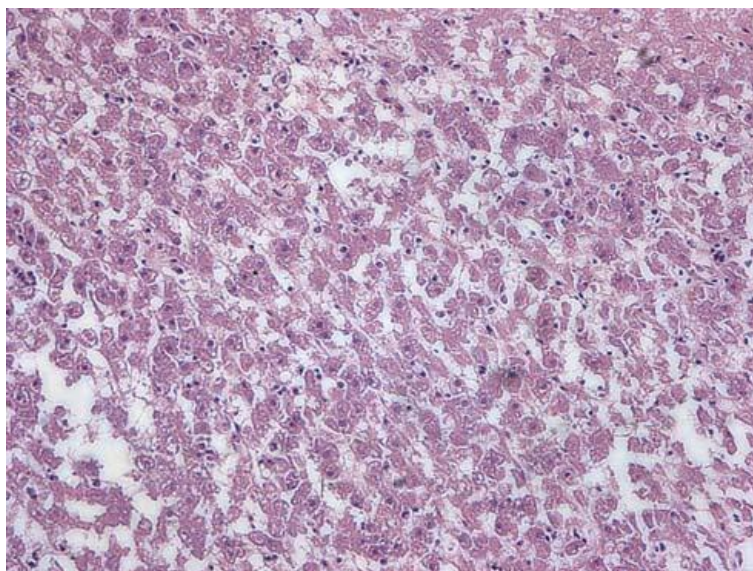
PAS (Perjódsv-Schiff) festés

A normálistól eltérő, csökkent glikogén mennyiség a májban.

4.6.2.4. 17. telelőtő

Hematoxin-eozin festés

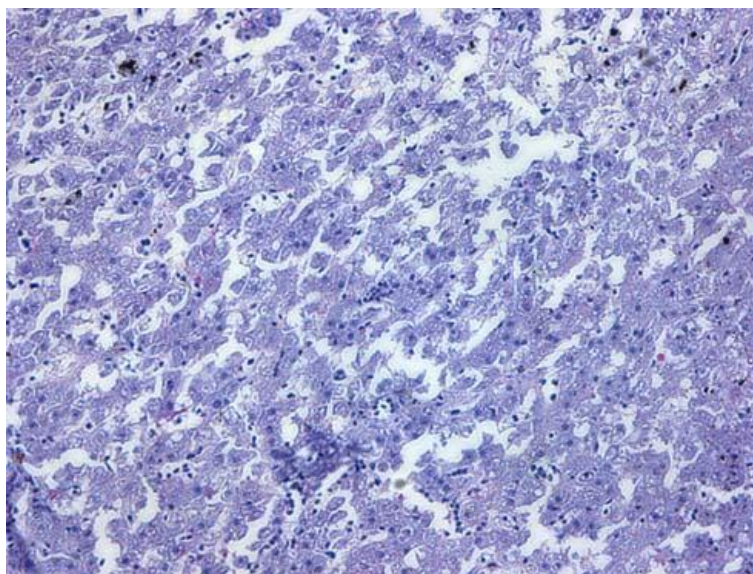
Egyértelmű lézió (májszöveti szerkezet szétesés) volt megfigyelhető a metszeteken. A hepatociták (májsejtek) lekerekedettek voltak. Randomfokális, szövetszéteséssel járó nekrobiózist figyelhattunk meg. A sejtek gyulladásos tüneteket produkáltak, lényegesen magas számú lymphocita volt látható (15. ábra).



15. ábra Hematoxin-eozin (HE) festés a kezelt csoportban (Lefler, 2014)

PAS (Perjód-sav-Schiff) festés

A PAS festés elkészítése után csak néhány sejtben találtunk elvétve glikogént. Ebben a csoportban számos sejtet találtunk egyedül kiszakadva eredeti helyéről (16. ábra).

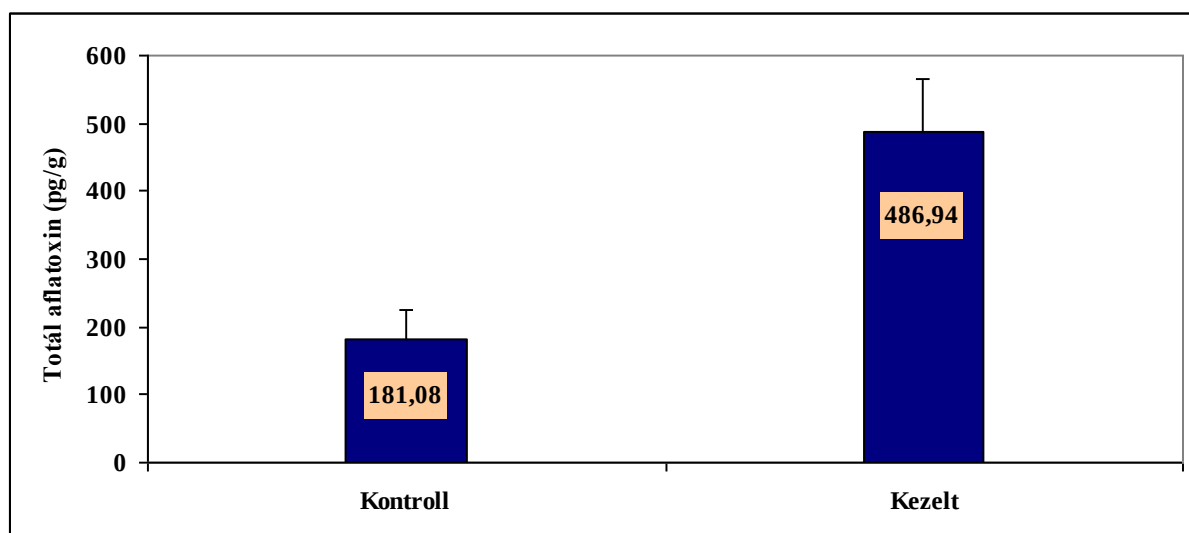


16. ábra Perjódsv-Schiff festés a kontroll csoportban (Lefler, 2014)

A kezelt csoportokban májkarcióma (daganatos elváltozás) még nem alakult ki, de a szövetszétesés következtében a sejtpótlások révén daganatos sejtek beépülésének valószínűsége igen nagy.

4.7. A májszövet aflatoxin koncentrációinak eredménye

A vérplazma total aflatoxin koncentrációja mellett meghatároztuk a májszövetben található aflatoxin mennyiségét is. Az aflatoxin koncentrációját –hasonlóan a vérplazma vizsgálatok esetén– is két telelő egyedeiből (kontroll 13. és kezelt 17. telelő) határoztuk meg. A kapott eredményeket a 17. ábra szemlélteti.



17. ábra A kontroll (13. telelő) és a kezelt (17. telelő) csoportban kapott májszövet aflatoxin koncentráció

Az eredményekből jól láthatjuk, hogy a kezelt csoport egyedeinek májszövetében nagyságrendileg magasabb volt az aflatoxin koncentráció. A különbség majdnem háromszoros volt a kísérlet végére. A két csoport eredményeit kétmintás „t” statisztikai próbával vizsgáljuk, akkor a két telelő között statisztikailag igazolható különbség állt fent ($P=0,000203$). Mindezek az eredmények azt is előrevetítik, hogy a vérből a toxin igen hamar „ürül”, hiszen a vérplazmában mért aflatoxin koncentrációja igen alacsony volt minden egyed esetében.

5. Eredmények értékelése, következtetések

A toxinkoncentrációt a célkitűzésben 20µg/kg-os átlagos szintre terveztük. Ez 20,5µg/kg átlagra sikerült beállítanunk a kísérlet ideje alatt. Ami azt jelenti, hogy a célunk teljesült.

Az eredmények azt mutatják, hogy a toxinos kukoricával etetett telelőkben (14, 15, 16, 17) a víz és iszap vizsgálatok negatív értéket adtak. Tehát az aflatoxin B1 a kijuttatott mennyiségben nem volt kimutathatóan maradandó hatással a termelési környezetre. Vélhetően a halak megették a kijuttatott takarmány jelentős részét.

Az 55 napig tartó kísérlet alatt a víz átlaghőmérséklete, pH, oldott oxigén, illetve oxigén telítettség azt mutatják, hogy a ponty megmaradásához, fejlődéséhez megfelelő életteret sikerült biztosítanunk.

A hematológiai eredmények azt mutatják, hogy a kontroll és kezelt telelőkben szinte azonos aflatoxin B1 koncentrációt kaptunk. Ennek oka lehet, hogy a kontroll csoportok kukoricájában minimális aflatoxin mennyiség lehetett. Valószínű, hogy a terepi mérőműszer alsó mérési határa magasabb, mint a laboratóriumi körülmények között alkalmazott rendszeré. Mivel a két csoport (kontroll, kezelt) egyedeinek vérplazmájának aflatoxin koncentrációjában nem volt statisztikailag igazolható különbség, így a kapott eredményekből arra következtethetünk, hogy a vérből gyorsan ürül az aflatoxin.

A tömeggyarapodási eredmények ellenére a máj szöveti vizsgálatok (*Hematoxin-eozin*, *Perjódsav-Shiff* festés) súlyos toxikózist mutattak a toxinos takarmányon növekedett állatok esetében. Így annak ellenére, hogy az adatok alapján nincs visszaesés a tömeggyarapodásban, de a szövettani vizsgálatok alapján jelentős máj károsodás történt.

Az etetett toxin koncentráció nem okozott elhullást a kezelt halak esetében. Csak az egynyaras (P1) csoportban volt 30% körüli elhullás, amely mind a kontroll, mind a toxinnal kezelt csoportok esetében megfigyelhető volt. A kétnyaras (P2) csoportok esetében nem lehetett számottevő elhullást tapasztalni a kezelések hatására (98-99-100% megmaradás).

A későbbiekben (további években) pedig azt kívánjuk vizsgálni, hogy a határértéknél magasabb toxinkoncentráció esetében milyen elváltozásokat tapasztalunk. Valamint egy a pályázat keretében kifejlesztett biodetoxifikációs eljárás során javítható-e a toxinos takarmányon nevelt halak állapota.

6. Összefoglalás

Egy 2010-ben történt felmérés is bizonyítja, hogy az országban megjelent az aflatoxin B1 termelő *Aspergillus* penészgomba. A gombák gyors terjedésében szerepet játszik a szélsőséges időjárás, technológiai hibák sora, illetve komoly probléma lehet a toxintermelő gombával fertőzött importtermékekkel történő behurcolás is. Az Európai Unió rendelete alapján a takarmány alapanyagokban az aflatoxin B1 (AFB1) koncentráció felső határértéke 20 µg/kg. Gyakorlatban minden, toxinnal kapcsolatba került gazdasági állatfajban kimutatható a májkárosodás, takarmány fogyasztás csökkenése, csökkenő termelékenység, elhullás, azonban az édesvízi halfajok esetében minimális adat áll rendelkezésünkre.

Célunk volt ismert koncentrációjú aflatoxinnal szennyezett takarmány etetése ponty halfajban és a toxin hatásainak megfigyelése (alaki elváltozás, elhullás, súlygyarapodás csökkenés, környezetre gyakorolt hatás, esetleg étvágytalanság, szövetekben történt elváltozások). A kísérletekhez a Czikkhalas Kft. biztosította a helyszínt.

A kísérletek kisméretű, átlagosan 828 m² területű, összesen 6 db telelőben zajlottak. A kontroll csoportok 2 telelőben kaptak helyet és az egyedeket kizárólag toxinmentes abraktakarmánnyal takarmányoztuk. A további 4 telelőtő egyedeivel pedig ismert koncentrációjú toxinnal fertőzött takarmányt etettünk. Minden nap ellenőrzésre kerültek a tavak alapvető víz fizikai és kémiai tulajdonságai (vízhőmérséklet, pH érték, oxigén háztartás), illetve minden alkalommal megbizonyosodtunk arról, hogy az előző napi takarmányt elfogyasztották a halak. Az aflatoxin szennyezettséget a megengedett felső határérték magasságára igyekeztünk „beállítani”. A kísérletsorozat 55 napos időtartama alatt átlagosan 20,5 µg/kg volt az aflatoxin B1 koncentrációja.

A vizsgálatok befejeztével mind a 6 telelő egyedeit lehalásztuk. A lehalászással együtt megtörtént a csoportok egyedeinek gyarapodási mutatóinak felvételezése, darabszám ellenőrzése. A különböző csoportok egyedeiből random módon vér- (teljes vér, vérplazma), hús-, és májmintákat vettünk. Néhány egyedben megfigyelhető volt a hasúri zsír is, amelyekből ugyancsak mintát gyűjtöttünk. A halak vizsgálata mellett a jól akkumulálódó üledéket is mintáztuk, annak érdekében, hogy a kijuttatott aflatoxin kimutatható-e a termelési környezetből.

Az eredmények azt mutatják, hogy a magyar takarmánykódexben elfogadott szintben történt takarmányozás mellett a kontroll és a fertőzött állományokban hozamkiesést és megmaradásbeli különbséget nem tapasztaltunk. Az aflatoxin B1 koncentráció mérését a

különböző mátrixokban (iszap, vér, máj, zsír) a Soft Flow Kft. által forgalmazott ELISA teszttel végeztük. Az aflatoxinos kukoricával etetett egyedek májsejtjeiben a különböző festési eljárások során a sejtek degenerációja volt megfigyelhető. A hematológiai vizsgálatok során az aflatoxinos kukoricával etetett és kontroll csoportok vérplazmájának aflatoxin koncentrációjában nem volt számottevő különbség, a mért aflatoxin B1 mennyiség a mérési módszer hibahatárán mozgott.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat arra, hogy köszönetemet és tiszteletemet fejezzem ki mindenkinek, aki a tudományos munkám elkészítéséhez nagyban hozzájárult.

Hálával és köszönettel tartozom konzulenseimnek Dr. Hegyi Árpádnak, Dr. Cserhádi Mátyásnak és Dr. Bokor Zoltánnak a türelmükért, útmutatásukért és segítségnyújtásukért.

Köszönettel tartozom az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet munkatársainak. Ezen belül külön köszönettel tartozom Dr. Lefler Kinga Katalinnak, a szövegtanban nyújtott türelmes és odaadó útmutatásért és Dr. Krifaton Csillának a segítségért és tanácsokért.

Köszönettel tartozom Ferencziné Szőke Zsuzsanna tudományos munkatársnak, Soft Flow Hungary Kutató Fejlesztő Kft.

Az akvakultúra ágazat kitörési pontjainak komplex, versenyképességet szolgáló fejlesztése, röviden „AquaFuture” konzorcium keretében (VKSZ-12-1-2013-0078) köszönettel tartozom a Czikkhalas Kft.-nek, hogy a kísérlet helyszínét biztosította, hálával tartozom Katics Máténak és Egyed Imrének, hogy egyengették mindennapjaimat.

Továbbá nagy köszönettel tartozom Fodor Ferenc Barátomnak a segítségért és biztatásért.

8. Irodalomjegyzék

1. Bedard, L.L., Massey, T.E. (2006): Aflatoxin-B1-indicated DNA damage and its repair. *Cancer Letters*, 241 (2) 174-183. p.
2. Biró G. (1999): Élelmiszer-higiénia. Budapest., (szerk.) Agroinform
3. Cast (2003): Mycotoxins: risk in plant, animal and human systems. No.139, Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa.
4. Dobolyi Cs., Sebők F., Varga J., Kocsubé S., Szigeti Gy., Baranyi N., Szécsi Á., Lustyik Gy., Micsinai A., Tóth B., Varga M., Kriszt B., Kukolya J., (2011): Aflatoxin-termelő *Aspergillus flavus* törzsek előfordulása hazai kukorica szemtermésben, *Növényvédelem* 47 (4) p.
5. Gromadzka, K., Waskiewicz, A., Chelkowski, J. & Goldinski P. (2008): Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal*, 1 (2) 209-220. p.
6. Hegyi Á., Baska F., Bokor Z., Csenki-Bakos Zs., Horváth Á., Kiss L., Kotrik L., Lefler Kinga K., Mészáros E., Müller T., Szabó T., Tóth B., Urbányi B., Varga K. (2014): Horgászvízkezelő-Tógazda szaktanfolyam elméleti képzésének tananyaga, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 59. p.
7. Herman O. (1887): A magyar halászat könyve, Természettudományi társulat, Budapest, 684-688. p.
8. Horváth L., Béres B., Urbányi B. (2011): Ökológiai szemléletű tógazdálkodás, Printself Nyomda Kft., Gödöllő, 10-45., 128-150., 149-153. p.
9. Jouany, J. P. (2007): Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 137. 342-362. p.
10. Kovács M. (2011): Penészgombák-mikotoxinok a táplálékláncban. MTA Agrártudományok osztálya, Budapest, 14-16. p.
11. Krifaton Cs., Cserhádi M., Privler Z. (2011): Environmental health effects by aflatoxins, *Biokontroll*, 4. p.
12. Lajkó I. (1999): Halászati alapismeretek, Agroinform kiadó és nyomda, Budapest, 78. p.
13. MacDonald, S., Castle L. (1996): A UK retail survey of aflatoxin in herbs and spices and their fate during cooking. *Food Additives and Contaminants* 13 (1) 121-128. p.

14. Maucha R., Erős P. (1954): Tógazdasági haltenyésztés a gyakorlatban, Mezőgazda kiadó Bp., 3-5. p.
15. Mézes M. (1997): Takarmánytartalmak, takarmánytoxikológia, (Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Takarmányozási tanszék) Gödöllő, 60. p.
16. Mézes M. (2009): Mikotoxikózis. In: Mézes M. (szerk.) Takarmánytoxikológia. Egyetemi jegyzet, Gödöllő, 99. p.
17. Paster, N., Bartov, I., Perelman, A.(1985): Studies of the fungistatic activity of antifungal compounds in mash and pelleted feeds. Poult. Sci., 64. 1673-1677. p.
18. Rafai P. (2003): Állathigiéna, Agroinform Kiadó, Budapest, 343. p.
19. Robens, J.F., Richard, J.L. (1992): Aflatoxins in animal and human health 69-94.p. In: Ware, G.W. (Eds.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Springer-Verlag, New York, 127. p.
20. Shi-Xi Deng, Li-Xia Tian, Fu-Jia Liu, Sheng-Jie Jin, Gui-Ying Liang, Hui-Jun Yang, Zhen-Yu Du, Yong-Hian Liu (2010): Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure, Aquaculture 207, 233-240 p.
21. Smith, J.E. & M.O. (1985): Mycotoxins. Formation, analysis and significance. John Wiley & Sons, Chichester, UK. 148. p.
22. Smith, T.K. (1980): Influence of dietary fiber, protein and zeolit on zearalenon toxicosis in rats and swine. J. Anim. Sci. 50. 278-285. p.
23. Sohár P. (2007): Mikotoxinok az élelmiszerláncban, Országos Élelmiszerbiztonsági és Táplálkozástudományi intézet., Élelmiszervizsgálóati Közlemények, 53,2007/KSZ, 60. p.
24. Szabó E., Szeitzné Sz. M., (2007): Mikotoxinok az Európai Unió Gyors Vészjelző Rendszerében. Élelmiszer-biztonsági Hivatal, Élelmiszer vizsgálati közlemény., 53, 2007/KSZ., 68-79 p.
25. Tasnádi R. (1983): Haltakarmányozás, Mezőgazda kiadó, 122-129. p.
26. Wang, J.S., Groopman, J.D. (1999): DNA damage by mycotoxins. Mutation Research 424 (1-2) 167-181. p.
27. WHO (1998): Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the forty-ninth meeting of the joint FAO/WHO Expert committee on Food Additives (JECFA) WHO Food Additives Series no. 40. Geneva
28. Ying Huang, Dong Han, Xiaoming Zhu, Yunxia Yang, Junyan Jin, Yifeng Chen, Shougi Xie (2011): Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B1, Aquaculture 319 89-97 p.

29. Ying Huang, Dong Han, Xucheng Xiao, Xiaoming Zhu, Yunxia Yang, Junyan Jin, Yifeng Chen, Shougi Xie (2014): Effect of dietary aflatoxin B1 on growth, fecundity and tissue accumulation in gibel carp during the stage of gonad development, *Aquaculture* 428-429, 236-242 p.
30. Zinedine, A., Juan, C., Idrissi, L., Manes, J. (2007): Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. *Mikrochemical Journal*, 87, 154-158. p.

Egyéb hivatkozások:

1. Internet1:<http://mkk.szie.hu/dep/halt/UserFiles/File/tananyagok/togazdalkodas.pdf>- letöltés ideje 2014. szeptember. 5.
2. Internet2:<http://mezohir.hu/mezohir/2004/02/a-peneszgombak-toxinjainak-allategeszsegugyi-vonatkozasai>- letöltés ideje 2014. szeptember 10.
3. Internet3:<http://www.pointernet.pds.hu/ujsagok/agraragazat/2013/03/20130409144223160000000695.html>- letöltés ideje 2014. szeptember 19.
4. Internet4: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691509001628>- letöltés ideje 2014. szeptember 19.
5. Internet5: <http://www.agraroldal.hu/fusarium.html>- letöltés ideje 2014 szeptember 20.
6. Internet6: http://szie.hu/file/tti/archivum/Krifaton_pHD-ertekezes.pdf - letöltés ideje 2014. szeptember 28.
7. Internet7: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571899001813>- letöltés ideje 2014 szeptember 20.
8. Internet 8: [http:// softflow.hu/Letoltesek/PDF_Toxi_ELISA.pdf](http://softflow.hu/Letoltesek/PDF_Toxi_ELISA.pdf)- letöltés ideje 2014. október 9.
9. Internet9: www.gopixpic.com- letöltés ideje 2014. október 15.

9. Nyilatkozat

Alulírott **Balog Attila**, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar **Vadgazda mérnök** szak nappali tagozatos hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem.

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

Gödöllő, 2014. október 24.

.....

hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a dolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

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

Gödöllő, 2014. október 24.

.....

konzulens aláírása