

SZENT ISTVÁN EGYETEM



DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**„Mikotoxinok biodegradációjára képes mikroorganizmusok
szelekciója és alkalmazása”**

Cserhádi Mátyás

GÖDÖLLŐ

2013

A doktori iskola

megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

tudományága: Környezettudomány

vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika, Ph.D.

tanszékvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem,

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Környezettudományi Intézet

Talajtan és Agrokémia Tanszék

Témavezető: Dr. Kriszt Balázs, Ph.D.

tanszékvezető, egyetemi docens

Szent István Egyetem,

Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar,

Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet

Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK	4
Célkitűzések	5
2. ANYAG ÉS MÓDSZER	6
2.1 A biodegradációs kísérletekben felhasznált mikroorganizmusok és tenyésztési körülmények	6
2.2 Az AFB1, ZEA, OTA, T-2, FB1 és DON biológiai lebontásának vizsgálata	6
2.3 Az állatetelési és állatkezelési kísérletek	6
2.3.1 Brojlercsirke etetés	6
2.3.2 Hal etetési kísérlet leírása	7
2.3.3 Patkánykezelési modell kísérlet	8
2.3.4 Egérkezelési modell kísérlet	8
2.3.5 Genom projekt	10
3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	11
3.1 Mikotoxinok biodegradációjára képes törzsek szelektálása	11
3.1.1 <i>Rhodococcus</i> törzsek	11
3.1.2 Egyéb nemzetségbe tartozó izolátumok mikotoxinbontó képessége	14
3.2 Állatetelési és állatkezelési kísérletek	16
3.2.1 Hal etetési teszt aflatoxin-B1 mentesítés ellenőrzésére	18
3.2.2 Baromfi etetési teszt	19
3.2.3 Patkánykezelési modell kísérlet (uterotrofikus bioassay)	21
3.2.4 Egérkezelési modell kísérlet (nephrotoxikus bioassay)	22
3.3 Genom projektek eredménye	24
3.3.1 Az <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AK37-es törzs genomja	24
3.3.2 A <i>Cupriavidus basilensis</i> ÖR 16 törzs genomja	25
4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	26
5. A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA	30

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

Napjainkban 1 milliárd ember éhezik, vagy szenved alultápláltság miatt a világon (2011-ben meghaladta a 7 milliárdot a teljes népesség) (TIRADO ET AL., 2010). Ezen állapot az előrejelzések szerint a jövőben súlyosbodni fog, mivel a változó időjárási rendszerek következtében nem csak a kieső és csökkenő termésmennyiséggel kell számolni (pl: 2011-2012-es aszály hazánkban), hanem számos adat azt is bizonyítja, hogy a növényeket fertőző járványok az időjárási jelenségekkel nagyon szoros kapcsolatban állnak – a változó klíma és időjárás veszélyezteti az élelmiszerbiztonságot és leginkább a fejlődő országokban okoz hatalmas problémákat (PATERSON-LIMA, 2010, 2011). E változás egyik veszélyforrása a mikotoxinok és elterjedtségük változása és az élelmiszer alapanyagoknak a jelenleginél nagyobb gyakorisággal történő szennyeződése (IPCC, 2007). A Föld átlaghőmérséklete közel 4°C-kal növekszik az előrejelzések szerint az elkövetkező 100 évben, amely az éghajlati övek eltolódását és azokon belül pedig az időjárási jelenségek átalakulását eredményezi; évszakok tűnnek el, a csapadékeloszlás kiszámíthatatlanná válik. Összességében az extrém időjárási jelenségek számának növekedése következtében a mezőgazdasági termelés szinte tervezhetetlenné és a folyamatos stresszben fejlődő növényzet a járványokra fogékonyá válhat (IPCC, 2007).

A mikotoxinok penészgombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, melyek általában extracellulárisan találhatóak meg a penészgombákkal fertőzött anyagokon (takarmány és élelmiszer alapanyagok). A mikotoxinok valamilyen stressz faktor hatására termelődnek, ami lehet hő, vízhiány, pH eltolódás, konkurens gombák megjelenése, stb.

A mikotoxinokra jellemző, hogy az élőlényekre káros hatással vannak, azaz toxikusak. Ez a tulajdonságuk több módon is jelentkezhet: citotoxicitás, karcinogenitás, genotoxicitás, mutagenitás, endokrin rendszert zavaró hatás. A klímaváltozás következtében az extrém időjárási viszonyok az eddigi stabil termelési rendszereket is felülírják, aminek következtében a mezőgazdaság által termelt alapanyagok jelentős mértékben fertőződhetnek penészgombákkal, valamint szennyeződhetnek az általuk kiválasztott mikotoxinokkal. Hazánkban az eddig leggyakoribb mikotoxin szennyeződéseket a zearalenon, fumonizin, deoxivinalenol, ochratoxin-A és T-2 toxinok okozták; azonban az időjárási körülmények megváltozásával olyan mikotoxinok is megjelentek, mint az aflatoxinok, amik eddig hazánkban nem voltak jellemzőek (DOBOLYI ET AL., 2011, VARGA ET AL., 2007).

A mikotoxinok ártalmatlanítására számos fizikai, kémiai vagy biológiai módszer is ismert, közülük egyre nagyobb érdeklődés övezi a biodegradációs eljárásokat, amelyek során mikroorganizmusok vagy enzimek segítségével történik a lebontás. A mikotoxinok bontása

azonban nem jár minden esetben a káros biológiai hatás megszűnésével, biodetoxifikációval. Az élelmiszer- és takarmánybiztonsági előírások ennek következtében egyre nagyobb figyelmet fordítanak arra, hogy a mikotoxinok eltávolítására alkalmazott különböző ágensek hatékonyságát megfelelő toxikológiai tesztekkel is értékeljék, különös tekintettel a képződő metabolitokra. Több mikotoxin esetében sikerült hatásos módszert kifejleszteni, sőt ma már kereskedelmi forgalomban kapható takarmány-adalékanyagokat is be lehet szerezni a zearalenon és ochratoxin esetében.

Célkitűzések

Kutatásom során a mikotoxin szennyeződések ártalmatlanítására, esetleges mérséklésére próbáltam megoldást találni aromás szénhidrogéneket bontani képes mikrobák alkalmazásával. A mikotoxinok jelentős része szintén aromás szénvázal rendelkezik, így a rendelkezésemre álló különböző szénhidrogéneket jól bontó mikrobák mikotoxin-degradációra történő tesztelése kézenfekvőnek tűnt.

A kutatásom során céloom volt:

- 1) mikotoxinok degradációjára képes mikroorganizmusok izolálása, azonosítása
- 2) a mikotoxinok detoxifikációjának igazolása,
- 3) az egyes mikotoxinok degradációjáért felelős enzimek/enzimrendszerek feltárása
- 4) és a már izolált mikroorganizmusok gyakorlati használhatóságának vizsgálata.

A doktori értekezésben bemutatott eredmények és tézisek saját laboratórium, valamint kollaborációs munka és szolgáltatásként megrendelt vizsgálatokon és méréseken alapulnak, az eredmények összevetéséhez pedig az összegyűjtött és értékelt, hivatkozott szakirodalom szolgált alapul.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 A biodegradációs kísérletekben felhasznált mikroorganizmusok és tenyésztési körülmények

A vizsgálatokba vont törzsek egy része saját izolátum, másik része több különböző törzsgyűjteménybe tartozik: Agruniver Holding Kft. törzsgyűjtemény, SZIE KKB Tanszék törzsgyűjtemény, nemzetközi törzsgyűjtemények valamint magánszemélyek törzsei. A törzsek egy részét a szénhidrogénnel szennyezett területekről és mátrixokból (pl: talaj, talajvíz, szennyvíz, komposzt, biofilm) izoláltuk. A bontási kísérletre választott, -80°C-on tárolt törzseket LB agarra szélesztve inkubáltam (28°C) 72 órán keresztül. A telepek tisztaságának ellenőrzése után 50 ml LB tápoldatot oltottam be egyetlen tiszta telepből származó inokulummal és rázattam (28°C, 170 rpm) 72 órán keresztül. Az inokulumok sejtsűrűségét $OD_{600}=0,6$ -ra állítottam be.

2.2 Az AFB1, ZEA, OTA, T-2, FB1 és DON biológiai lebontásának vizsgálata

A biodegradációs kísérletek Erlenmeyer lombikban (300 ml), 50 ml LB tápoldatban folytak, 3 párhuzamos rendszer beállításával. A vizsgált mikotoxin koncentrációja 2 mg/l volt az adott bontási rendszerekben, amelyeket 28°C, 170 rpm rázatás mellett inkubáltam. A mintákat lecentrifugáltam (15000 rpm, 4°C, 20 min.), a felülúszót dekantáltam és a pelletől külön tároltam -20°C-on a további vizsgálatokig. A felülúszó és a pellet mikotoxin-tartalmát akkreditált kémiai analitikai laboratórium vizsgálta (Wessling Hungary Kft.) nagy teljesítményű folyadék kromatográfia módszerrel (HPLC), illetve a Soft Flow Hungary Kft. ELISA módszerrel. A degradációs kísérlet felülúszó mintáit az adaptált biomonitoring rendszerekkel vizsgáltam a maradék geno/citotoxikus és ösztrogén hatás meghatározása céljából.

- SOS-Chromo genotoxicitás teszt
- *Aliivibrio fischeri* citotoxicitás teszt
- BLYES/BLYR hormonhatás elemző tesztrendszer

2.3 Az állattetési és állatkezelési kísérletek

2.3.1 Brojlercsirke etetés

Az etetési kísérlethez 120 db Cobb 500 brojlercsirke kakast állítottunk be. A kísérleti csoportok kialakításánál az egyes kezelések két ismétlésben (latin négyzet technikával) 15-15 egyed/ismétlés létszámmal lettek beállítva.

- **Mikrobamentes kontroll** (n=2x15): AFB1 mikotoxint nem tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport.
- **Kontroll + AK37** (n=2x15): AFB1 mikotoxint nem tartalmazó, baktériummal kezelt takarmányt fogyasztó csoport.
- **AFB1** (n=2x15): AFB1 mikotoxinnal szennyezett kukoricát tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport. A takarmány számított AFB1 tartalma 1mg/kg.
- **AFB1 + AK37** (n=2x15): AFB1 mikotoxinnal szennyezett biodetoxifikációs technikával előkezelt kukoricát tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport.

A kísérlet időtartama 42 nap volt. Kísérlet értékelésénél az alábbi mérési paramétereket határoztuk meg: testtömeg, takarmányfogyasztás, elhullás.

2.3.2 Hal etetési kísérlet leírása

A pontymodell etetési kísérletet a Szabolcsi Halászati Kft. telephelyén kiviteleztek, a gazdaság saját szaporításából származó egynyaras pontyokon. A halak négyféle kukoricát fogyasztottak testtömegük 3%-ában, napi négy részletben, automata etető segítségével. A kísérlet során az alábbi beállítások és csoportmegnevezések lettek kialakítva:

- **Mikrobamentes kontroll** AFB1 mikotoxint nem tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport
- **Kontroll + AK37** AFB1 mikotoxint nem tartalmazó, baktériummal kezelt takarmányt fogyasztó csoport
- **AFB1** AFB1 mikotoxinnal szennyezett (számított AFB1 tartalma 2 mg/kg volt) kukoricát tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport.
- **AFB1 + AK37** AFB1 mikotoxinnal szennyezett (számított AFB1 tartalma 2 mg/kg volt) biodetoxifikációs technikával előkezelt kukoricát tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport.

A halakat 2 m³-es medencékben tartottuk, recirkulációs rendszerben. A kísérleteket 3 ismétlésben végeztük 25-25 egyeddel. Az etetést 5 nap szoktatás után kezdtük meg, 14 napon keresztül. A kísérlet ideje alatt naponta mértük a vízminőségi paramétereket, illetve figyeltük az esetleges elhullást és meghatároztuk az elfogyasztott takarmány mennyiségét. A kísérlet elején, illetve végén mértük a halak testtömegét és testhosszúságát. A kísérlet végén a különböző kezeléseken átesett egyedek májából szövettani metszeteket készítettünk és elemeztük azokat.

2.3.3 Patkánykezelési modell kísérlet

A patkánykezelési kísérletekben a ZEA bontásának hatékonyságát és a bontási termékek élettani hatásait vizsgáltuk. A kezelések során a vizsgálandó anyagokat gyomorszondán juttattuk a kísérleti állatok szervezetébe.

Az kísérlethez 500 µg/ml ZEA koncentrációjú LB tápoldatot a toxin elbontására képes mikroszervezettel oltottam be, amely 28°C-on, 170 rpm rázatással, 5 napon keresztül inkubáltam. Az ötödik napon a kísérleti rendszereket centrifugáltam (15000 rpm, 20 perc, 4°C), majd a felülúszót Edwards Micromodulyo liofilizáló berendezésen beszártítottam és a ZEA koncentrációt HPLC méréssel ellenőriztettem. A fagyasztva szárított felülúszót oliva olajban vettem fel és az így előkészített mátrix adta az etetési kísérlet egyik takarmányának alapanyagát.

A kísérleti csoportoknak megfelelően a következő beállításokat alkalmaztam:

- **Kontroll:** ZEA-t nem tartalmazó LB
- **ZEA:** 500 µg/ml ZEA-t tartalmazó LB
- **ZEA + K408:** ZEA-val szennyezett (500 µg/ml) biodetoxifikációs technikával előkezelt minta

A kísérlethez Heneweer és munkatársai (2007) által elvégzett uterotrofikus bioassay-t vettük alapul. A modellállatok pubertás előtti nőstény Wistar patkányok voltak, amelyek a KOKI saját tenyésztésű állatai. Az állatokat hármásával tartottuk 21±1°C hőmérsékleten és 65%-os páratartalom mellett, 12 órás megvilágításban (07:00–19:00 óra). Fitoösztrogénmentes táppal és kezeletlen csapvízzel tápláltuk *ad libitum*, 3 napon keresztül. Mindegyik állatra napi rendszerességgel számoltuk ki az etetési dózist, 5 mg/kg ZEA bevittel testsúlyra vetítve.

A kísérlet során az uterusz tömegének változását és az uteruszban található markergének expresszáldását vizsgáltuk a kontrollhoz viszonyítva: apelin (APLN), aquaporin 5 (AQP5), komplement komponens 2 (C2), kalbindin-3 (CALB3). Az eredményeket relatív génexpresszióban (RQ – relative quantity) fejeztük ki, ami meghatározza, hogy hányszoros az adott gén expressziója a mintákban.

2.3.4 Egérkezelési modell kísérlet

Az elvégzett etetési kísérletekben mikroszervezet által detoxifikált OTA degradáció bomlási maradékának élettani hatásait vizsgáltuk. A kezelések során a vizsgálandó anyagokat gyomorszondán juttattuk a kísérleti állatok szervezetébe. A kísérlet során 20 µg/ml OTA-val kontaminált 10%-os LB tápoldatot a toxin bontására képes mikroszervezettel oltottam be,

amelyet 28°C-on, 170 rpm-en, 5 napon keresztül inkubáltam. Az ötödik napon a kísérleti rendszereket centrifugáltam (15000 rpm, 20 perc, 4°C), majd a felülúszót Edwards Micromodulyo liofilizáló berendezésen beszárítottam.

A kísérleti csoportoknak megfelelően a következő beállításokat alkalmaztam:

- **Kontroll:** ochratoxint nem tartalmazó LB
- **OTA:** 20 µg/ml ochratoxint tartalmazó LB
- **OTA + Őr16:** ochratoxinnal szennyezett (500 µg/ml) biodetoxifikációs technikával előkezelt minta

A kísérletekhez ivarérett 7-9 hetes hím egereket használtunk (CD1 törzs). A kísérleti állatokat ellenőrzött körülmények között tartottuk (hőmérséklet: 21±1°C, páratartalom: 65%, megvilágítás hossza 12 óra/ nap). A táplálék és az ivóvíz hozzáférés *ad libitum* volt.

Az akut kísérletek időtartama 72 óra (n=7-10) (LUHE ET AL., 2003), míg a krónikus kísérletek időtartama 21 nap (n=7-10) (ZELJEZIC ET AL., 2006). Az akut vizsgálatban az OTA dózisok 1 mg/testtömeg kg, illetve 10 mg/testtömeg kg voltak napi egyszeri beadással. A krónikus toxicitási vizsgálatokat 0,5 mg/testtömeg kg dózisban 21 napon keresztül, napi egyszeri kezeléssel végezzük (n=7-10). A pozitív kontrollként használt metilmetánszulfonátot (MMS) steril csapvízben hígítottuk. A mikrobiálisan bontott ochratoxin-A biodegradációs termékeit tartalmazó liofilizált készítményt 10 mM Tris (pH 8) tartalmú steril csapvízben oldottuk fel. Kontrollként az azonos fenofázisú, OTA mentes bakteriális kultúra liofilizált felülúszóját használtuk, amely tartalmazta a táptalaj maradványait is.

A kísérleti csoportok megnevezése a **72 órás toxicitási kísérletnél:**

- Kontroll (DMSO a nagy dózisú intakt OTA hígításának megfelelően)
- MMS (pozitív kontroll, 100 mg/kg)
- OTA (1 mg/testtömeg kg)
- OTA (10 mg/testtömeg kg)
- Bontott OTA (1 mg/testtömeg kg)
- Bontott OTA (10 mg/testtömeg kg)
- LB-Baktérium (DMSO a nagy dózisú intakt OTA hígításának megfelelően)

A kísérleti csoportok megnevezése a **21 napos krónikus toxicitási kísérletnél:**

- Kontroll (DMSO az intakt OTA hígításának megfelelően)
- MMS (pozitív kontroll, 40 mg/ testtömeg kg)
- OTA (0,5 mg/ testtömeg kg)
- OTA bontott (0,5 mg/ testtömeg kg)

- Tápfolyadék (LB)-baktérium (DMSO az intakt OTA hígításának megfelelően)

A kísérlet során célunk az OTA-nak a vesére, az intakt mikotoxin által leginkább károsított szervre gyakorolt toxicitásának vizsgálata volt. A bomlástermék toxicitását az irodalomban már leírt OTA expozíció által leginkább befolyásolt markergének expressziójának mérésével vizsgáltuk a vese kérgi régiójában (LUHE ET AL, 2003) és relatív génextpresszióban (RQ) adtuk meg. A méréseket az alábbi citotoxicitási marker génekre terveztük: alfa Gadd45, Gadd153, annexin 2 (Anxa2), ceruloplazmin (Cp), szulfotranszferáz K2 (StK2), clusterin (Clu). A vizsgált markerek úgy lettek kiválasztva, hogy azok az OTA vesekárosító (DNS károsító, apoptotikus, gyulladássos) hatásait tükrözzék:

2.3.5 Genom projekt

Genomi DNS izolálás tiszta tenyészetből

A tiszta tenyészet kialakításához a *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 és *Cupriavidus basilensis* ŐR16 törzsek három napos inkubációt követően (170 rpm, 28°C) mindkét törzs folyadékkultúrájából háromszor 3 ml mennyiséget centrifugálva (4000 rpm) összegyűjtöttem a megfelelő mennyiségű biomasszát. A DNS izolálást a MoBio által forgalmazott UltraClean Microbial DNA Isolation Kit segítségével végeztem, a gyártó utasításai szerint. A DNS minták tisztaságát és koncentrációját nanofotométer (Implen) segítségével mértem. Ennek alapján a DNS minták tisztasága (A260/A280) mindkét esetben 1,9 feletti értéket mutatott, míg koncentrációja a *R. pyridinivorans* AK37 esetében 210 ng/μl, *C. basilensis* ŐR16 esetében 350 ng/μl volt. A DNS minták minőségét agaróz gélelektroforézis segítségével is ellenőriztem (1%-os agaróz gélben, 5 μl mintát 1 órán keresztül 110 V feszültség mellett futtatva), ez alapján megállapítható volt, hogy a genomi DNS egyik minta esetében sem töredezett szét, így azokból 30-30 μg-ot juttattam el genomi szekvenálásra (Baygen Intézet, Szeged).

A genomszekvencia vizsgálat kombinált ciklikus ligandum szekvenáló berendezéssel történt (SOLiD 4 System-Life Technologies, 454 FLX pyrosequencing-Roche). A szekvencia illesztést CLC Bio Genomics Workbench 4.8 és Omixon Gapped Solid Alignment 1.3.2 program segítségével végezték el, amelyek 416 nagyméretű (200 bp-nál nagyobb) kontigot hoztak létre. A kapott több ezer rövid szekvencia szakaszt bázissorrend-egyezőség szerint számítógép szűkített kisebb számú szekvencia szakaszra, majd pedig a NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) eszköz segítségével történt a genom összeillesztése (HTTP2).

3.ÉREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

3.1 Mikotoxinok biodegradációjára képes törzsek szelektálása

3.1.1 *Rhodococcus* törzsek

Összesen nyolc *Rhodococcus* fajba tartozó harminchárom törzs bontási képességét vizsgáltam hat különböző mikotoxinra (AFB1, ZEA, T2, OTA, DON, FB1). Első lépésben ELISA mérésekre került sor, amelyik törzs esetében 50% feletti bontási potenciált jelzett a mérés, ezen esetekben a HPLC méréssel szintén ellenőriztem a bontási százalékokat. Az AFB1 és ZEA esetében a biológiai hatásmérést is ellenőriztük SOS-Chromo teszt, *Alivibrio fischeri* teszt és BLYES/BLYR teszt alkalmazásával.

3.1.1.1 A *Rhodococcus* izolátumok aflatoxin-B1 bontási eredményei

A legnagyobb számban az *R. erythropolis* fajba tartozó izolátumok álltak a rendelkezésemre, amelyek mindegyike 50% feletti bontási képességgel rendelkezett. A *R. aetherivorans* és *R. gordoniae* faj 1-1 képviselője 50% feletti, de a 95%-ot el nem érő AFB1 bontást mutatott. A harminchárom *Rhodococcus* törzsből mindössze négy esetében tapasztaltam 50% alatti AFB1 bontást, ezek közül három a *R. ruber* (N361, AK41, 4S-8), egy pedig a *R. globerulus* fajhoz (N58) tartozott, amelyek alacsony biodegradációs kapacitással rendelkeztek. Az analitikai eredmények alapján a *R. pyridinivorans* és a *R. rhodochrous* fajokba tartozó törzsek mutattak kimagasló, közel 100%-os biodegradációs képességet.

Az AFB1 detoxifikációt az SOS-Chromo teszttel vizsgáltam. Ennek eredményeként a harminchárom *Rhodococcus* izolátumból tizenkettő esetében mértem genotoxikus bomlástermékeket, olyan törzsek esetében is, amelyek a HPLC és ELISA eredményeik alapján jó degradációs képességeket mutattak (*R. erythropolis*: DSM1069, IFO12538, L88 és a *R. aetherivorans* AK44). A vizsgált tizenkilenc *R. erythropolis* törzs esetében az 50% feletti degradációs képesség ellenére hét izolátumnál (DSM 743, DSM 1069, IFO 12538, L88, AK40, OM7-2, ZFM 23-1) is genotoxikus hatást tapasztaltam a bontási maradék vizsgálatánál. A *R. aetherivorans* törzs esetében magas bontási képesség mellett szintén genotoxikus bomlásterméket kaptam. Az SOS-Chromo teszt vizsgálat során genotoxikus eredményt mutató törzseket a további kísérletekbe nem vontam be.

Az eredmények és a nemzetközi szakirodalom összevetését követően, sikerült 3 *Rhodococcus* faj izolátumainak esetében *R. globerulus* (AK36), *R. pyridinivorans* (K402, K404, K408, AK37) és a *R. rhodochrous* (NI2, ATTC 12674), valamint az *R. erythropolis* faj további 12 izolátumnál (NI1, DSM 4306, NCAIMB 9784, AK 35, AK 42, GD1, GD 2A, GD 2B, BRB 1AB, BRB 1BB, ÖR 9, ÖR 13) káros metabolitok nélküli AFB1 biodegradációs képességét feltárnom.

3.1.1.2 A *Rhodococcus* izolátumok zearalenon bontási eredményei

Az általam vizsgált harminchárom izolátumból az AFB1 bontási eredményeihez képest jóval kisebb számban figyelhettem meg ZEA degradációs képességet. A *Rhodococcus* fajok esetében hét törzsnél tapasztaltam 50% feletti ZEA degradációt (*R. erythropolis* N11; *R. pyridinivorans* AK 37, K402, K404, K408; *R. ruber* N361; *R. globerulus* N58). Érdekesség, hogy a rendelkezésre álló törzsek esetében az *R. erythropolis* faj esetében tizenkilenc izolátumból hét esetében, a *R. ruber* faj esetében három izolátumból egy esetében, és *R. rhodochrous* fajnál két izolátumból egy esetében tapasztaltam bontást, azaz egyes fajokon belül igen eltérő degradációs képességet detektáltam.

A jó bontási képességgel rendelkező törzseket biotransformációs képességét a BLYES tesztrendszerrel ellenőriztem. Az eredmények alapján a hét ZEA bontó törzsből csak az AK37, K402, K404 és K408 jelölésű *R. pyridinivorans* és az N11 *R. erythropolis* fajba tartozó törzsek biodegradációja nem, vagy kis mértékben eredményezett ösztrogénhatású mellék-, ill. közti bomlásterméket.

Szakirodalmi adatok alapján ezidáig a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó fajok esetében nem állapítottak meg ZEA bontó képességet. Munkám során sikerült két *Rhodococcus* faj (*R. pyridinivorans* és *R. erythropolis*) 5 izolátumáról az ösztrogénhatást megszüntető biotransformációt kimutatnom.

3.1.1.3 A *Rhodococcus* izolátumok T-2 toxin bontási eredményei

A T-2 toxin esetében harminchárom törzsből a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok jelentős része, huszonöt izolátum képes volt 50% feletti degradációra. A *R. gordoniae*, *R. coprophilus*, *R. rhodochrous*, *R. globerulus* fajokba tartozó törzsek 90% feletti bontást mutattak, hasonlóan a *R. erythropolis* fajhoz, ahol szintén mindegyik izolátum képes volt legalább 90%-os bontásra. A *R. ruber* fajhoz tartozó törzsek esetében az N361 jelölésű 60%-os bontásra volt képes, míg a két másik nem csökkentette a toxinszintet. A *R. pyridinivorans* izolátumok közül egy törzs sem tudta degradálni a T-2 toxint, míg a *R. aetherivorans* törzs 35%-os biodegradációra volt képes.

Szakirodalmi adatok alapján ezidáig a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó fajok esetében nem állapítottak meg T-2 toxin bontó képességet. Munkám során sikerült megállapítanom, hogy az alábbi fajokba tartozó izolátumok képesek a T-2 biodegradációjára: *R. erythropolis* (16 izolátum), *R. globerulus* (2 izolátum), *R. rhodochrous* (2 izolátum), *R. coprophilus* (1 izolátum), *R. gordoniae* (1 izolátum).

3.1.1.4 A *Rhodococcus* izolátumok OTA bontási eredményei

Az OTA esetében a meglévő izolátumok nem mutattak számottevő degradációs potenciált, a rendelkezésre álló törzsekből összesen négy mutatott alacsony (10–35%) bontást, a *R. erythropolis* GD 2A és BRB 1AB, valamint *R. pyridinivorans* K402 és K408.

3.1.1.5 A *Rhodococcus* izolátumok DON bontási eredményei

A DON toxin esetében a rendelkezésemre álló harminchárom *Rhodococcus* törzs egyike sem mutatott degradációs képességet.

3.1.1.6 A *Rhodococcus* izolátumok FB1 bontási eredményei

A FB1 toxin esetében a rendelkezésemre álló harminchárom *Rhodococcus* törzs egyike sem mutatott degradációs képességet.

3.1.1.7 *Rhodococcus* izolátumok multimikotoxin bontási képessége

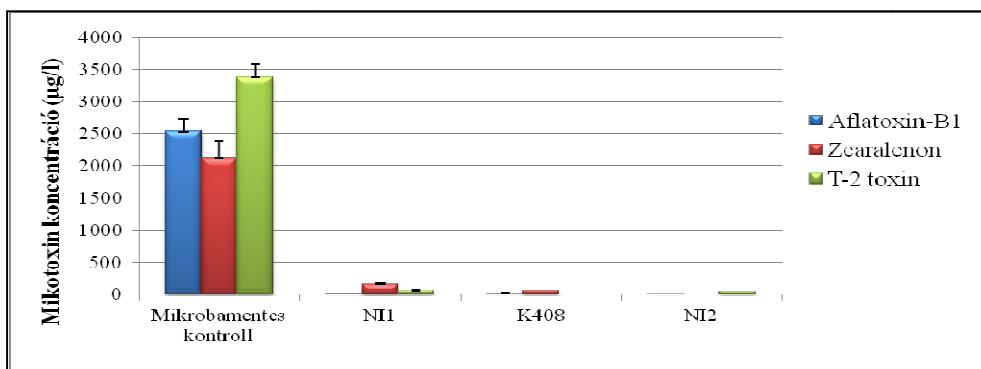
A több toxin biodegradációjára képes törzsek esetében a biológiai hatásmérésre alkalmazott tesztek (SOS-Chromo és BLYES test) alapján rangsoroltam és válogattam ki a multimikotoxinos kísérletbe vont izolátumokat. Összesen 19 törzsnél sikerült 2 vagy 3 mikotoxin esetében is biodetoxifikációt megfigyelni. Ezen törzsek közül három különböző fajba tartozó törzs multimikotoxin vizsgálatára nyílt lehetőség: *R. erythropoils* NI1, *R. pyridinivorans* K408, *R. rhodochrous* NI2.

A vizsgálathoz ugyan azokat a kísérleti előkészítéseket végeztem el, mint a korábbiakban, azzal a különbséggel, hogy egyszerre három mikotoxin volt a tápoldatban külön-külön 2 mg/l koncentrációban:

- Az *R. erythropoils* NI1 törzs esetében AFB1-ZEA-T-2 mikotoxin elegy
- A *R. pyridinivorans* K408 törzs esetében AFB1-ZEA mikotoxin elegy
- A *R. rhodochrous* NI2 törzs esetében AFB1-T-2 mikotoxin elegyet.

Az eredményeket a 3.1. sz. ábra foglalja össze, amelyről leolvasható, hogy a *R. erythropolis* NI1 degradációs potenciálja 90% feletti volt az AFB1, a ZEA és T-2 esetében is (AFB1: 99,88±0,09%, ZEA: 92,11%±11,25%, T-2: 98,48±13,45%), míg a *R. pyridinivorans* K408 több mint 95%-át lebontotta az AFB1 és a ZEA toxinoknak (AFB1: 99,31±2,24%, ZEA: 96,83±1,90%); A *R. rhodochrous* NI2 szintén 95% fölötti degradációt mutatott az AFB1 és a T-2 toxin esetében (AFB1: 99,88±0,09%, T-2: 97,94±2,25%).

A tesztelésbe vont törzsek a kiváló multimikotoxin bontási képesség mellett a genotoxikus és az ösztrogén hatást is megszüntették. További érdekesség, hogy a monotoxinos rendszerben mutatott ZEA bontási százalék (NI1 60% és K408 77%) a multitoxinos rendszerben jelentősen megnövekedett.



3.1. sz. ábra: A multimikotoxin bontási kísérlet felülúszó mintáiban 3 nap biodegradáció után ELISA teszttel mért toxinkoncentrációk

A szakirodalmi adatok alapján ez idáig prokarioták esetében nem mutattak ki multimikotoxin bontási képességet. Sőt, több mikotoxin bontását (ZEA és OTA) eddig csak az eukarióta *Trichosporon mycotoxinivorans* élesztőnél sikerült kimutatni.

3.1.2 Egyéb nemzetségbe tartozó izolátumok mikotoxinbontó képessége

Disszertációm ezen fejezetében azon mikroorganizmusok mikotoxinbontó képességét ismertetem, amelyek nem a *Rhodococcus* nemzetség tagjai. Mindegyik ebben a fejezetben vizsgált törzs olajszármazékokkal szennyezett kárhelyekről, vagy olajos komposztokból lett izolálva. Tizenkettő különböző nemzetségbe tartozó huszonegy izolátum mikotoxinbontó képességét vizsgáltam öt mikotoxin esetében. Az ELISA mérések eredményeit, a HPLC és ELISA vizsgálatok között szoros korrelációs kapcsolat miatt, csak a kiemelt bontási képességgel, vagy a kiemelt vizsgálatban szereplő törzsek esetében erősítettem meg HPLC-s analitikával.

3.1.2.1 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok aflatoxin-B1 bontási eredményei

A vizsgált huszonegy törzs mindegyike 50% feletti biodegradációs képességet mutatott az ELISA eredmények alapján. Azonban az SOS-Chromo teszt a törzsek többségénél genotoxikus bomlástermékeket mutatott. Mindössze a DN1 jelzésű *Pseudomonas putida* törzs szüntette meg az AFB1 genotoxikus hatását. A feldolgozott szakirodalmakat alapul véve, a *Pseudomonas* nemzetség esetében a tudomány számára új eredmény az AFB1-bontó képesség.

3.1.2.2 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok zearalenon bontási eredmények

A vizsgált huszonegy törzsből az AFB1 bontási eredményeihez képest, a *Rhodococcus*zokhoz hasonlóan jóval kisebb számban, mindössze 4 törzsnél figyelhettem meg 50% feletti ZEA degradációs képességet, amelyek a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* FEH28,

a *Pseudoxanthomonas kalamensis* H4 jelölésű, a *Pseudoxanthomonas suwonensis* NZS6 jelzésű és a *Gordonia paraffinivorans* NZS14 jelölésű törzsek. Ezen ZEA bontó törzsek esetében BLYES teszttel ellenőriztem a bontási képesség biztonságosságát, azaz, hogy marad-e ösztrogénhatású melléktermék a biodegradáció után. A BLYES eredmények alapján a FEH28 baktérium ZEA degradációja esetében nem tapasztaltam ösztrogénhatású bomlásterméket.

Szakirodalmi adatok alapján ismert a *Pseudomonas* nemzetség esetében a ZEA bontó képesség, de faj szinten a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* esetében a tudomány számára új eredmény a ZEA-bontó képesség.

3.1.2.3 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok T-2 toxin bontási eredmények

A T-2 toxin esetében a huszonkét törzsből három törzs mutatott 50% feletti, 90% körüli bontást, a *Microbacterium* nemzetség két tagja EL1 és NSZ9 és a *Pseudoxanthomonas* nemzetségbe tartozó NZS6 törzs. A feldolgozott szakirodalmakat alapul véve, mind a két nemzetség (*Microbacterium*, *Pseudoxanthomonas*) esetében a tudomány számára új eredmény a T-2-bontó képesség.

3.1.2.4 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok ochratoxin-A bontási eredményei

Az OTA esetében három törzs esetében magas bontási képességet sikerült kimutatni, mind a HPLC, mind az ELISA mérések adatai alapján, amelyek közül két törzs a *Cupriavidus* nemzetség tagja: BRB 6A (*C. basilensis*) és ÖR16 (*C. basilensis*); egy törzs a *Sphingopyxis chiliensis* fajba tartozó Kö10 jelölésű izolátum. A feldolgozott szakirodalmakat alapul véve, mind a *Cupriavidus*, mind *Sphingopyxis* nemzetség esetében a tudomány számára új eredmény az OTA-bontó képesség.

3.1.2.5 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok deoxinivalenol toxinbontó képessége

A kísérleteim során mind a huszonkét törzs DON bontó képességét vizsgáltam, egyik esetében sem tapasztaltam bontást a kontroll mintákhoz viszonyítva.

3.1.2.6 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok fumonizin-B1 toxinbontó képessége

A kísérleteim során mind a huszonkét törzs FB1 bontó képességét vizsgáltam, egyik esetében sem tapasztaltam bontást a kontroll mintákhoz viszonyítva.

3.1.2.7 A nem *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok multimikotoxinbontó képessége

A nem *Rhodococcus* törzsek esetében tizenegy izolátum kapcsán merült fel a multimikotoxin bontó képesség; de a biológiai hatásmérést is alapul véve nem volt olyan törzs, amely egyszerre lenne képes a több mikotoxin lebontására azok káros biológiai hatásának megszüntetésével.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY: (1. tézis) Feltártam a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó 8 faj, 33 törzsének mikotoxinbontó képességét. A nemzetségen belül eddig toxinbontási tulajdonságáról ismeretlen 3 fajnál (*R. globerulus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*) aflatoxin-B1, 2 fajnál (*R. pyridinivorans*, *R. erythropolis*) pedig zearalenon biodetoxifikációs képességet mutattam ki. 5 fajnál (*R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. rhodochrous*, *R. coprophilus*, *R. gordoniae*) elsőként írtam le T-2 toxin biodegradációját.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY: (2. tézis) A *Cupriavidus* és *Sphingopyxis* nemzetség esetében ochratoxin-A; a *Microbacterium*, *Pseudoxanthomonas* nemzetség esetében T-2 toxin; a *Pseudomonas* nemzetség esetében aflatoxin-B1 biodegradációt mutattam ki.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY: (3. tézis) A prokarioták esetében elsőként mutattam ki multimikotoxin biodegradációt és biodetoxifikációt. Az aflatoxin-B1 és a zearalenon detoxifikálására, továbbá a T-2 toxin bontására képes a *R. erythropolis* NI1 jelzésű törzs. Kettő mikotoxin, az aflatoxin-B1 és zearalenon együttes biodetoxifikációjára képes a *R. pyridinivorans* K408 jelzésű törzs, valamint az aflatoxin-B1 detoxifikálására és T-2 toxin együttes bontására képes a *R. rhodochrous* NI2 jelzésű törzs.

3.2 Állattetési és állatkezelési kísérletek

Annak ellenőrzésére, hogy az előző fejezetekben leírt biodegradációs ill. a mikrobiális és molekuláris biotesztekkel bizonyított biodetoxifikációs képességek magasabb rendű élő szervezetekben is eredményre vezetnek, állattetési és állatkezelési kísérleteket végeztünk.

Az AFB1 detoxifikáció hatékonyságának ellenőrzésére hal- és brojlércsirke etetési kísérletet választottunk, amelyhez a takarmányt a tanszékünk állította elő, míg a toxinmentesítéshez a *R. pyridinivorans* AK 37 baktérium törzset használtuk, egyrészt kiváló hatásfokú *in vitro* AFB1 biodetoxifikációs tulajdonsága miatt, másrészt annak okán, hogy ezt a törzset választottuk a faj *de novo* genom projektjének elkészítéséhez.

A ZEA biotetoxifikáció hatékonyságának ellenőrzéséhez patkány modell kísérletet választottunk, amelyhez az kezelési anyag (tápoldat) a tanszéken készült, míg a toxinmentesítéshez a *R. pyridinivorans* K 408 baktérium törzset használtuk, amely a *Rhodococcus* törzsek közül a legnagyobb hatásfokkal bontotta a ZEA-t, ráadásul úgy, hogy a káros biológiai hatását (EDC) megszüntette.

Az OTA biotetoxifikációs hatékonyságának ellenőrzéséhez egér modell kísérletet választottunk, melyhez az kezelési anyag (tápoldat) a tanszéken készült, míg a toxinmentesítéshez a *Cupriavidus basilensis* ÖR16 baktérium törzset használtuk, amely az általam vizsgált mikrobák közül a 98%-os hatásfokkal bontotta az OTA-t.

Az állatetelési és kezelési kísérletek mikotoxin tartalom alapján 3 ágra váltak szét:

1. Aflatoxin-B1 szennyezett kukorica etetési kísérlete brojlercsirke és hal rendszerben
2. Zearalenon bontási rendszer biodegradációs termékeit tartalmazó liofilizált készítmény vizsgálata patkánykezelési kísérletekben
3. Ochratoxin-A bontási rendszer biodegradációs termékeit tartalmazó liofilizált készítmény vizsgálata egérkezelési kísérletekben.

AFB1 tartalmú takarmány előállítás

Az állatetelési kísérletek során AFB1-mentesítési/ártalmatlanítási eljárást dolgoztam ki, amely során a szennyezett takarmányt kezeltem a kutatásaim eredményei alapján kiválasztott mikroorganizmussal. A kísérletek során a tanszékünk által izolált Zt80 *Aspergillus* törzssel aflatoxin tartalmú kukoricát állítottunk elő, majd ezt szilárd fázisú fermentációs folyamatban *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 mikroba törzssel detoxifikáltam. Az így kezelt takarmányt (kukorica) hal- és brojlercsirke-etetési tesztekben vizsgáltuk.

A kísérlet során a takarmányok AFB1-tartalmát mind a már ismertetett ELISA és HPLC módszerrel ellenőriztük. A kontroll takarmánykeverékek AFB1 koncentrációja nem érte el a kimutathatóság határát. Az AFB1 tartalmú kísérleti tápban a tervezett 1 mg/kg koncentrációval szemben 860 µg/kg volt az AFB1 tartalom. A bakteriális detoxifikáció hatására ez az érték 105 µg/kg értékre csökkent, amely érték, bár meghaladja az Európai Unióban megengedett 50 µg/kg maximális koncentrációt (2003/100/EC), azt jelenti, hogy az a kísérleti baktérium kultúra 87,8%-os hatékonysággal bontja AFB1-et a kidolgozott eljárásban. A további vizsgálatokban ennek a detoxifikált takarmánynak a biológiai hatását ellenőriztük hal és brojlercsirke tesztállatokon.

3.2.1 Hal etetési teszt aflatoxin-B1 mentesítés ellenőrzésére

3.2.1.1 Termelési paraméter, mortalitás és takarmányfogyasztás vizsgálatok

A kísérlet ideje alatt a halak testtömegében és testhosszában bekövetkezett változásokat az 3.1. sz. táblázat foglalja össze. A kísérlet végére a vizsgált paraméterek egyikében sem történt statisztikailag igazolható változás sem a csoportok ismétlésein belül (kezdeti és végső értékek), sem az egyes csoportok között ($P < 0,05$).

3.1. sz. táblázat: A kezelt halak testhossz és testtömeg értékei a kísérlet kezdetén és végén

Etetési beállítás	Testhossz (cm)		Testtömeg (kg)	
	kezdeti	végső	kezdeti	végső
AFB1	12,2±6	12,2± 4	0,71 ± 0,08	0,69 ± 0,09
AFB1+ AK37	12,1±4	12,5± 5	0,74± 0,06	0,74 ± 0,08
Kontroll + AK37	12,3±5	12,4± 4	0,72 ± 0,06	0,74 ± 0,06
Mikrobamentes kontroll	12,2±4	12,4± 6	0,71 ± 0,06	0,73 ± 0,08

Az állatok pusztulását vizsgálva (3.2. sz. táblázat) statisztikailag is igazolható különbsége volt tapasztalható az egyes kezelések között ($P < 0,05$). Két csoportban történt mortalitás a vizsgálati idő alatt. A 10. naptól kezdve nagymértékű elhullást volt tapasztalható az *AFB1* kukoricával takarmányozott csoportban. Szövettani vizsgálatok alapján bizonyítást nyert, hogy ebben az esetben az elhullás döntő oka a takarmány toxintartalma volt.

3.2. sz. táblázat: Az elhullások mértéke az egyes csoportoknál a hal etetési kísérlet ideje alatt

Etetési beállítás	Elhullás (%)
AFB1	20 ± 8*
AFB1 + AK37	2 ± 2
Kontroll + AK37	0
Mikrobamentes kontroll	0

* $P < 0,05$ = AFB1+AK37 beállításhoz viszonyítva

A kísérlet ideje alatt a napi takarmányfogyás is rögzítésre került az egyes csoportoknál (3.3. sz. táblázat). A táblázatból jól látszik, hogy az *AFB1* tartalmú kukoricával etetett csoport az idő előrehaladtával egyre kevesebb takarmányt vett magához. Ennek oka az *AFB1* toxikózis volt. A többi csoportnál hasonló mértékű csökkenés nem volt tapasztalható, minden egyed az életkorának megfelelő mértékben fogyasztotta a bejuttatott takarmányt.

3.3. sz. táblázat: Átlagos takarmányfogyasztás az egyes csoportokban a hal etetési teszt során

Etetési beállítás	Átlagos takarmányfogyás g/hal/14 nap
AFB1	18,0 ± 3, 9*
AFB1 + AK37	25,0 ± 7,1
Kontroll +AK37	29,7 ± 5,6
Mikrobamentes kontroll	31,2 ± 4,4

* $P < 0,05$ = AFB1+AK37 beállításhoz viszonyítva

3.2.1.2 Szövetteni vizsgálatok

A kísérlet végén beállításonként a 10-10 egyednél májmintát vettünk a szövettani vizsgálatokhoz.

A *Mikrobamentes kontroll* kukorica mintával etetett halaknál a máj szöveti szerkezete ép, a májsejtsorok jól kivehetők. A hepatociták száma megfelelő, a sejtmagok centrálisan helyezkednek el.

A *Kontroll* + *AK37* mintával etetett halaknál a máj szöveti szerkezete szintén ép, a májsejtsorok is jól kivehetőek. A sejtmagok centrális helyzetűek maradtak.

Az *AFB1* + *AK37* mintával takarmányozott halak májában igen kismértékű diffúz patológiás zsíros infiltráció (kóros beszűrődés, a sejtekben vagy szövetekben történő anyag felhalmozódás) található, de a magok még központi helyzetűek maradtak. A májban különböző méretű zsírcseppek alakultak ki, amelyet a kontroll csoporthoz képest a több fehér terület jelez.

Az *AFB1* jelű mintával etetett halaknál a májban megváltozással járó zsíros infiltráció figyelhető meg, a májsejtek zsírtartalma jelentősen megnőtt, a máj szerkezete helyenként teljesen megbomlott, rendezettsége megszűnt, a máj szivacsos szerkezetűvé vált. Az elzsírosodás mellett gyulladásozó sejtek, limfociták és granulociták is láthatóak a metszetekben. A magok körül, illetve a sejtek között vörös elszíneződés figyelhető meg.

3.2.2 Baromfi etetési teszt

A vizsgálatok célja annak megállapítása volt, hogy a doktori munkám keretében kifejlesztett, az AFB1 mikotoxin detoxifikációjára alkalmas enzimet termelő baktérium elölt, hőkezelt kultúrája milyen hatást gyakorol brojlercsirkék egyes termelési paramétereire.

3.2.2.1 Termelési paraméterek (testsúly, súlygyarapodás, takarmányfogyasztás, takarmányértékesítés)

A testsúly adatok elemzése során, az egyes kezeléseken belül, az ismétlések között számottevő eltérés nem volt tapasztalható, ezért a továbbiakban az egyes kezeléseket egységesen vizsgáltuk. A testsúly adatok a 3.4. sz. táblázatban láthatóak.

3.4. sz. táblázat: A brojlercsirke élősúly (g) alakulása a nevelés/kezelés teljes ideje alatt

		1. hét	2. hét	3. hét	4. hét	5. hét	6. hét	7. hét
Mikrobamentes kontroll	átlag	46,4	132,7 ^a	303,7 ^a	597,1 ^{ac}	1011,4 ^{ab}	1547,1 ^{ab}	1982,9 ^a
	szórás	1,4	16,5	44,7	93,7	157,0	253,8	241,6
Kontroll + AK37	átlag	47,0	142,5 ^b	336,1 ^b	647,9 ^a	1050,0 ^a	1583,2 ^a	1864,4 ^{ac}
	szórás	0,0	20,7	50,0	101,4	92,0	129,3	196,8
AFB1	átlag	47,4	132,0 ^a	268,8 ^d	454,4 ^d	766,7 ^d	1154,4 ^d	1400,6 ^d
	szórás	1,4	16,0	38,3	79,3	126,6	200,5	230,4
AFB1 + AK37	átlag	47,2	136,4 ^{ab}	312,8 ^a	582,9 ^c	979,4 ^b	1504,1 ^b	1793,8 ^c
	szórás	0,2	14,5	34,1	62,1	110,7	158,0	224,9

Jelmagyarázat: Az azonos oszlopban eltérő betűvel jelölt értékek szignifikáns mértékben különböznek egymástól - a-b (p<0,05), a-d, b-d, c-d (p<0,001); a-c (p<0,01).

Az aflatoxin-kezelés hatására az állatok átlagos testsúlya két hetes kortól szignifikánsan alacsonyabb volt mindhárom csoporttal szemben a kezelés végéig. Ugyanakkor abban a csoportban (AFB1 + AK37), amelynek takarmánya az AFB1 mellett a mikotoxin detoxifikációjára képes enzimet termelő elölt baktérium kultúrát is tartalmazta a kontroll csoportokhoz hasonlóan alakult az átlagos testsúly.

Az átlagos heti **súlygyarapodás** értékeit a 3.5. sz. táblázat tartalmazza. Az eredmények azt mutatják, hogy a csak AFB1-et tartalmazó takarmánykeverék hatására csaknem a hizlalás teljes ideje alatt számottevően alacsonyabb napi gyarapodást értek el e csoport egyedei a többi csoporténál. Ugyanakkor azon csoport egyedeinek gyarapodása, amelyek az AFB1 mellett a mikotoxin detoxifikációjára képes baktérium kultúrát tartalmazó takarmányt fogyasztottak a hizlalás során ugyan kis mértékben elmaradt a kontrolltól, azonban ennek mértéke nem szignifikáns.

3.5. sz. táblázat: Az átlagos súlygyarapodás (g) alakulása a brojlercsirke nevelés/kezelés teljes ideje alatt

Idő	hét	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét	5. hét	6. hét
Mikrobamentes kontroll	átlag	86,3 ^{ab}	171,0 ^a	301,7 ^a	414,3 ^a	566,7 ^a	380,4 ^a
	szórás	16,8	47,6	34,4	79,9	73,7	78,3
Kontroll + AK37	átlag	95,5 ^b	193,8 ^a	311,8 ^a	421,7 ^a	533,2 ^{ab}	318,7 ^{ad}
	szórás	20,7	55,3	58,9	54,5	81,8	60,6
AFB1	átlag	84,7 ^a	136,9 ^c	182,0 ^c	312,3 ^c	387,7 ^c	247,5 ^c
	szórás	15,4	38,5	35,3	54,2	99,6	116,6
AFB1 + AK37	átlag	89,2 ^{ab}	176,4 ^a	270,2 ^b	398,0 ^a	525,2 ^b	309,4 ^d
	szórás	14,5	34,8	35,3	62,6	69,9	97,6

Jelmagyarázat: Az azonos oszlopban eltérő betűvel jelölt értékek szignifikáns mértékben különböznek egymástól: a-b, a-d, c-d p<0,05, a-c, b-c p<0,001,

A **takarmányfogyasztás** esetében elmondható, hogy az AFB1 hatására jelentősen csökkent az állatok étvágya. Ugyanakkor a detoxifikációs eljárással csökkentett AFB1 tartalmú takarmány fogyasztásakor ez a hatás már nem nyilvánult meg.

A **takarmányértékesítést**, azaz az 1 kg súlygyarapodáshoz felhasznált takarmány mennyiségét sem lehetett statisztikailag értékelni. A takarmányértékesítést a hizlalás teljes időtartamára vonatkoztatva az AFB1 hatására kis mértékben romlott az állatok takarmányértékesítése, azonban ennek mértéke nem szignifikáns. Továbbá érdekes módon a csak a detoxifikációhoz alkalmazott élőlt baktérium kultúra hatására is csökkent mértékű takarmányértékesítés nyilvánult meg.

3.2.3 Patkánykezelési modell kísérlet (uterotrofikus bioassay)

3.2.3.1 Uterus tömeg változásának vizsgálata

A ZEA mikrobiális biodegradációját vizsgáló kísérletek során a kontroll csoporthoz képest a méhtömeg szignifikáns növekedése (2,6-szoros) csak a ZEA csoportba tartozó állatoknál volt tapasztalható. Ezzel szemben a Kontroll csoport és a ZEA+K408 csoport között nem volt szignifikáns különbség. A ZEA és a ZEA+K408 csoport eredményeit összehasonlítva azt állapíthatjuk meg, hogy a mikrobával inkubált, zearalenonnal szennyezett tápoldat által kiváltott biológiai hatás 2,5-szer kisebb, mint az ugyanilyen összetételű, baktériummal nem inkubált tápoldat hatása.³ A kapott eredmények alapján kijelenthető, hogy a ZEA uterotrofikus hatása *Rhodococcus pyridinivorans* K408 törzsszel történő inkubáció hatására megszűnt. Ebből arra következtethetünk, hogy a mikroba elbontotta a mikotoxint, uterotrofikus hatású aktív metabolit pedig nem keletkezett.

3.2.3.2 Real-time PCR-es génexpressziós vizsgálatok

A patkánykezelési vizsgálat során ösztrogén dependens géneket választottunk ki a Real-time PCR-es vizsgálatra. A ZEA hatására a komplement-komponens-2 (C2) és kalbindin-3 (CALB3) szint növekedése, míg az apelin (APLN) és aquaporin-5 (AQP5) mRNS szint csökkenése volt jellemző. Ezeknek a gének expresszióját mértem a ZEA-nal szennyezett, illetve az ugyanilyen összetételű, de *Rhodococcus pyridinivorans* K408 baktériummal kezelt csoportoknál (3.6. sz. táblázat).

3.6. sz. táblázat: Relatív génexpresszió a patkány kezelési kísérlet során

Kísérleti beállítások és vizsgált gének	Kontroll	ZEA	ZEA + K408
apelin (APLN)	1,0	0,28	0,90
aquaporin 5 (AQP5)	1,0	0,40	0,85
komplement komponens 2 (C2)	1,0	1,85	0,95
kalbindin-3 (CALB3)	1,0	4,10	0,80

A ZEA-t tartalmazó tápoldat adagolásának hatására - a kontroll állatokhoz viszonyítva - az APLN és az AQP5 expressziója csökkent, a C2 és a CALB3 expressziója pedig megnőtt. Ha viszont a ZEA tartalmú tápoldatot *Rhodococcus pyridinivorans* K408 törzsszel inkubáltuk az *in vivo* kezelést megelőzően, akkor ezek a hatások megszűntek, a vizsgált gének

expressziója szignifikánsan nem különbözött a kontroll állatoknál tapasztaltaktól. Az eredmények hasonlóságot mutatnak Heneweer és munkatársai (2007) által megfigyelt ZEA dózis hatásához. Mindezeket figyelembe véve megállapítható, hogy a baktériummal történő inkubálásnak köszönhetően a ZEA, e négy gén expressziójára gyakorolt hatása megszűnt. Ebből arra következtethetünk, hogy az oldatban lévő mikotoxint a mikroba eredményesen lebontotta, aktív metabolit pedig nem keletkezett.

Az uterusz vizsgálatok során nem mutattak ki szignifikáns különbséget a markergének expresszáldásában a kontroll és a ZEA+ *R. pyridinivorans* (K408) kísérlet esetében. Mind az uterotrofikus bioassay, mind a BLYES ösztrogénhatást kimutató bioteszt alapján a K408 törzssel kezelt ZEA tartalmú LB tápoldatban megszűnt az (endokrin zavaró) ösztrogénhatás.

3.2.4 Egérkezelési modell kísérlet (nephrotoxikus bioassay)

3.2.4.1 A 72 órás OTA kezelés hatása a markergének génexpressziójára

Az akut (72 órás) toxicitási vizsgálatok során a pozitív kontrollként használt MMS és a nagy dózisu OTA kezelés szignifikánsan megemelte a **Gadd 45** és a **Gadd 153** expresszióját. A mikrobiális degradáción átesett OTA tartalmú készítménnyel kezelt kísérleti állatok veséjében nem emelkedett meg sem a Gadd 45, sem a Gadd 153 expresszió. A csak LB-t és a biodegradációban használt baktérium felülűszót tartalmazó készítménnyel kezelt csoport mRNS szintjei nem változtak a két markerre vizsgálva a cortexben. Sem az MMS, sem a kis dózisu OTA nem változtatta meg a vese kérgi régiójában a **clusterin** expressziót, míg az OTA 10 jelzésű kezelés szignifikánsan növelte. A bakteriálisan lebontott OTA egyik dózisban sem növelte a clusterin mennyiségét. A mikrobiális OTA bomlástermékek tehát nem indítottak be apoptotikus folyamatokat a kezelés során, még nagy dózist alkalmazva sem. A csak médiumot (LB) és a biodegradációban használt baktérium felülűszót tartalmazó készítménnyel kezelt állatok veséje nem mutatott változást a vese cortexben a markerre vizsgálva. A saját eredményeink hasonlítanak Luhe és munkatársai (2003) által kapott 72 órás 10mg/ testsúly kg OTA dózis vizsgálataihoz, ahol az OTA hatására a Gadd45 és Annexin2 expressziója a kétszeresére, Gadd153 és clusterin expressziója másfélszeresére, a ceruloplazmin expressziója a 2,5-szeresére változott (3.7. sz. táblázat).

3.7. sz. táblázat: Génexpresszió alakulás az egér kezelése során, 72 órás kísérlet

Kísérleti beállítások és vizsgált gének	Kontroll	MMS	OTA 1	OTA 10	OTA 1 bont	OTA 10 bont	LB-baktérium
Gadd 45,	1	1,50	0,80	4,35	1,2	1,0	0,80
Gadd 153	1	1,40	1,30	1,75	0,90	1,05	0,90
Clusterin	1	0,80	1,00	3,0	1,20	1,40	0,90

3.2.4.2 A 21 napos OTA kezelés hatása a markergének génextpressziójára

A 21 napos krónikus OTA kezelés szignifikánsan megemelte a **Gadd 45** és a **Gadd 153** expresszióját a kísérleti állatok veséjében. A Gadd 153 és Gadd 45 mRNS expresszió nem változott a vesében a biodegradáció során keletkezett OTA bomlástermékek hatására. A csak médiumot (LB) és a biodegradációban használt baktérium felülűszót tartalmazó készítmény nem mutatott aktiváló hatást a vese cortexben a két markerre vizsgálva. Az OTA kezelés szignifikánsan megemelte a ceruloplazmin expresszióját a kísérleti állatok veséjében. A **ceruloplazmin** mRNS expresszió nem változott a vesében a biodegradáció során keletkezett OTA bomlástermékek hatására. A markergén esetében a degradáció egyben detoxifikációnak is bizonyult és megszüntette a mikotoxin gyulladáskeltő és oxidatív stresszt okozó hatását. A csak médiumot (LB) és a biodegradációban használt baktérium felülűszót tartalmazó készítmény sem mutatott hatást a vese cortexben a ceruloplazmint vizsgálva. Az OTA kezelés szignifikánsan csökkentette a **szulfotranszferáz** expresszióját a kísérleti állatok veséjében, míg az MMS kezelés a krónikus kezelés során nem befolyásolta a markergén expresszióját. A szulfotranszferáz mRNS expresszió nem változott a vesében a biodegradáció során keletkezett OTA bomlástermékek hatására. Az OTA kezelés szignifikánsan emelte az **annexin 2** expresszióját a kísérleti állatok veséjében, míg az MMS kezelés a krónikus kezelés során nem befolyásolta a markergén expresszióját. A markergén expressziójának mérése bizonyítja, hogy a degradáció egyben detoxifikációnak is bizonyult és megszüntette a mikotoxin által indukált potenciális karcinogén hatást a krónikus kezelés során. A csak médiumot (LB) és a biodegradációban használt baktérium felülűszóját tartalmazó készítmény nem mutatott hatást a vese cortexben az anxa2 mRNS szinteket mérve (3.8. sz. táblázat).

3.8. sz. táblázat: Génextpresszió alakulás az egér kezelése során, 21 napos kísérlet

Kísérleti beállítások és vizsgált gének	Kontroll	MMS	OTA	OTA Bont	LB-baktérium
Gadd 45,	1	0,95	2,30	0,85	0,90
Gadd 153	1	0,80	1,60	1,05	1,20
Ceruloplazmin	1	0,50	3,20	0,80	0,90
Szulfotranszferáz	1	0,95	0,60	1,20	0,90
Annexin 2	1	0,90	2,35	0,90	1,00

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY: (4. tézis) Az aflatoxin-B1 mikotoxin biodetoxifikációjára alkalmazott *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 baktériumtörzs hatékonysága *in vitro* laboratóriumi kísérletek mellett, ponty és brojlércsirke etetési tesztekben is igazolásra került. Az aflatoxin-B1 toxinnal szennyezett takarmány káros biológiai hatását a *R. pyridinivorans* AK37 baktériumtörzs sikeresen megszüntette, a szennyezett takarmány biodetoxifikációs kezeléssel már nem váltotta ki a toxikózis tüneteit a kísérleti állatokon.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY: (5. tézis) A zearalenon mikotoxin biotetoxifikációjára alkalmazott *Rhodococcus pyridinivorans* K408 baktériumtörzs hatékonysága az *in vitro* laboratóriumi biodegradáció mellett patkány modell kísérletekben is igazolásra került. A zearalenon toxinnal szennyezett takarmány káros biológiai hatását a *R. pyridinivorans* K408 baktériumtörzs sikeresen megszüntette, a szennyezett takarmány biotetoxifikációs kezeléssel már nem váltotta ki a toxikózis tüneteit a kísérleti állatokon.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY: (6. tézis) Az ochratoxin-A mikotoxin biotetoxifikációjára alkalmazott *Cupriavidus basilensis* ÓR16 baktériumtörzs hatékonysága az *in vitro* laboratóriumi biodegradáció mellett egér modell kísérletekben is igazolásra került. Az ochratoxin-A toxinnal szennyezett takarmány káros biológiai hatását a *C. basilensis* ÓR16 baktériumtörzs sikeresen megszüntette, a szennyezett takarmány biotetoxifikációs kezeléssel már nem váltotta ki a toxikózis tüneteit a kísérleti állatokon.

3.3 Genom projektek eredménye

A toxinbontási képességek és egyéb tulajdonságok alapján kiválasztottuk az AK37 jelölésű *Rhodococcus pyridinivorans* (AFBI és ZEA bontás), valamint az ÓR16 jelölésű *Cupriavidus basilensis* (OTA bontás) törzset, hogy meghatározzuk a teljes genom szekvenciájukat.

3.3.1 Az *Rhodococcus pyridinivorans* AK37-es törzs genomja

R. pyridinivorans AK37 törzs genomja 5,244,611 bázispárból áll (5,2 Mb), aminek GC tartalma 67,8% és 4,822 putatív kódoló szekvenciát, 52 tRHS és 3 rRNS lókuszt tartalmaz. A törzs genommérete kisméretűnek tekinthető az eddig ismert genomok alapján a *Rhodococcus* nemzetségen belül, a *R. jostii* (RHA1) törzsnek 9,7 Mb, a *R. opacus* (B4) törzsnek 8,8 Mb. A szekvenálási eredmények 117 aromás vegyületek bontásáért felelős génkópiát azonosítottak. Ezen belül a szekvenálás igazolta, hogy az AK37-s törzs legalább hat különböző gyűrűhasító útvonallal rendelkezik a monociklikus aromás szénhidrogének lebontásához. Az alábbi aromás szénhidrogén hasításért felelős géneket sikerült azonosítani: katekol 1,2- és 2,3-dioxigenáz, protokatekvát 3,4-dioxigenáz, benzoát 1,2-dioxigenáz, homogentizát, 1,2-dioxigenáz, orto-halobenzoát, 1,2-dioxigenáz. A gyűrűhasító gének meglétéből adódóan az aromás szerkezetű mikotoxinok bontása is indokolt. Az általam

vizsgált *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok nagy AFB1 bontási képességgel rendelkeztek. Alkán és bifenil bontáshoz szükséges kulcsenzimeket is azonosítottunk a projekt során. Továbbá, a 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz (ksh) gén jelenléte utal a szteroidbontó képességre. Ez a gén azon ösztrogénhatású anyagok bontására való képességet feltételez, melyek az ösztrogénhez hasonló kémiai szerkezettel rendelkeznek, mint a ZEA. A genomszekvenálás során 67 db virulencia faktort azonosítottunk, melyek feldolgozása és pontos meghatározása folyamatban van.

3.3.2 A *Cupriavidus basilensis* ŐR 16 törzs genomja

Az ŐR 16 jelű *C. basilensis* törzs teljes genomja 8,546,215 bázispárból áll, aminek GC tartalma 41,2% és 7,542 putatív kódoló szekvenciát tartalmaz. A genom méret – 8,55 Mb – a legnagyobb a nemzetségen belül (Genbank adatbázis alapján), genom méret és szekvencia sorrendek alapján plazmid(ok) jelenléte szinte biztosra vehető. Ezt alátámasztja a plazmid fenntartásáért, illetve replikációért felelős fehérjék megléte a vizsgált anyagban. Összesen 334 darab aromás gyűrű bontásáért felelős génszakaszt sikerült beazonosítani, melyek alapján a törzs rendelkezik katekol 1,2- és 2,3-dioxigenáz, protokatekvát 3,4-dioxigenáz, benzoát 1,2-dioxigenáz, (homo)gentizát 1,2-dioxigenáz (1 kópia), hidroxiquinol 1,2-dioxigenáz génekkel. A szteránvázas vegyületek bontására képes enzimet kódoló géneket is sikerült azonosítani: 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz. A genom projekt során is a *C. basilensis* fajnál 206 db virulencia faktort tártunk fel, melyek elemzése jelenleg folyamatban van.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY: (7. tézis) Elkészült az aflatoxin-B1 és zearalenon biodetoxifikációjára képes *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 mikroba teljes *de novo* genom projektje.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY: (8. tézis) Elkészült az ochratoxin-A biodetoxifikációjára képes *Cupriavidus basilensis* ŐR16 mikroba teljes *de novo* genom projektje.

4.KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Kutatásom évei alatt nem csak mikroorganizmusokkal foglalkoztam, hanem gyakorló mezőgazdászként nap, mint nap tapasztaltam az időjárási anomáliák egyre gyakoribbá válásából, hogy a klímaváltozással kapcsolatos előrejelzések és scenáriók nem a század második felében következnek be, hanem már itt vannak. Ez már nem a megelőzés, hanem az alkalmazkodás időszaka. Kutatócsoportunk igazolta elsőként az aflatoxin termelő gombák megjelenését az országban (DOBOLYI ET AL., 2011), ami kezdetben heves vitákat váltott ki. Sajnálatos módon az élet igazolta a forgatókönyvet, amit laboratóriumi körülmények között már korábban láttunk – 2012-ben az ország tejiparát egy hajszál választotta el az összeomlástól az AFB1 tartalmú takarmányok jelenléte miatt. A 2012-es világaszály megmutatta, hogy nem az a kérdés, van-e mikotoxin mentes gabonánk, hanem van-e egyáltalán gabonánk a népesség számára. Azaz a megtermelt gabona mikotoxin mentességét szinte lehetetlen lesz betartani növénytermesztési technológiákkal. A már megtermelt és betárolt gabonában különböző módszerekkel kell csökkentenünk a mikotoxinok szintjét, ehhez nyújthat egy lehetséges megoldást a jelen munkám.

Kutatásom során sikerült több mikroorganizmust azonosítanom, amelyek káros metabolitok nélkül képesek a különféle mikotoxinok bontására, biodegradációjára. Korábbi vizsgálatokban egyes kutatócsoportok bizonyították egy-egy mikroorganizmus, vagy azok által termelt enzim mikotoxinbontó képességét, de hasonló volumenű tanulmány, amelyben több mint hatvan mikroszervezet átvizsgálása történt meg, és közel harminc mikroszervezet mikotoxinbontó képességét mutatták be, nem létezik. Ezáltal a tudomány és a gyakorlat számára is sikerült bővítenem jelentős mértékben a rendelkezésre álló és felhasználható mikrobák számát a mikotoxin-mentesítés és biodegradáció terén.

Az általam vizsgált mikotoxinok biodegradációjára képes törzsek detoxifikációs képességét több módszerrel is igazoltam: proteínáz-K vizsgálat, pellet vizsgálat, és biotesztekkel történő geno- és citotoxicitás, EDC hatáselemzés, valamint állatetelési és kezelési kísérletek. A munkám során azonosított és mikotoxinok biodegradációjára képes törzsek esetében sikerült feltérképezni és bemutatni, hogy melyek képesek káros mellékhatások és metabolitok nélkül lebontani az adott toxinokat, ami jelenleg EFSA előírás az EU-ban (EFSA, 2009).

Vizsgálataim fókuszában elsősorban a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó törzsekre irányult, mivel ez egy rendkívüli anyagcsere folyamatokkal megáldott nemzetség és a tanszékünk is jelentős számú szénhidrogének bontására képes izolátummal rendelkezik. Több faj esetében már évtizedek óta létező konkrét ipari hasznosítási eljárások vannak pl: sztiren gyártás stb. 2005-ben Teniola és munkatársai végeztek az AFB1 esetében bontási kísérletet,

amely jelen munkának is az egyik kiindulási pontja. A német és afrikai kutatókból álló csoport a *R. erythropolis* extracelluláris enzimeivel sejtmentes mátrixban sikeresen megszüntette az AFB1 mutagén hatását. A *Rhodococcus* nemzetségen belül más mikotoxin bontásáról nem volt fellelhető szakirodalmi adat. Munkám során harmincnál több *Rhodococcus* faj toxinbontási profilját vettem fel, ami alapján azt a következtetést vontam le, hogy *R. erythropolis* fajon kívül, AFB1 bontásra képes faj a *R. ruber*, *R. globerulus*, *R. coprophilus*, *R. gordoniae*, *R. pyridinivorans* és *R. erythropolis* képviselői. Az eredményeim alapján az is elmondható, hogy a bontási képesség szempontjából nemcsak a fajok között, hanem egy fajon belül is jelentős eltérések lehetnek. Mindezek mellett a toxinbontási profil arra is rámutatott, hogy az AFB1 toxinon kívül a *Rhodococcus* nemzetség egyes tagjai jelentős ZEA (*R. pyridinivorans*, *R. erythropolis* és *R. ruber*) és T-2 (*R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. rhodochrous*, *R. coprophilus* és *R. gordoniae*) bontó tulajdonsággal is rendelkeznek. Bár két toxin (ZEA-OTA) szimultán bontásáról a szakirodalom egy mikroorganizmus esetében már beszámolt (*Trichosporon mycotoxinivorans*), két további mikroszervezet (*R. pyridinivorans* és *R. rhodochrous*) két mikotoxin (AFB1-ZEA, AFB1-T-2) párhuzamos bontása és a *R. erythropolis* N11 multimikotoxin bontása (AFB1, ZEA és T-2) a területen eddig publikált eredmények szerint egyedülálló tulajdonság.

A *Rhodococcus* nemzetségeken kívül kiemelném a *Cupriavidus* nemzetséget, amelyből a *C. basilensis* jelentős OTA bontási képességgel rendelkezik, ezen faj mikotoxin bontási képessége ezidáig ismeretlen volt és egyre több, a tudomány számára új és izgalmas információ lát napvilágot, miszerint a faj aromás gyűrűk bontására alkalmas enzimrendszerekkel rendelkezik. Kutatásom eredményeivel és két *de novo* genom projekt elvégzésével új felhasználási lehetőségek nyílnak meg a *Rhodococcus* és *Cupriavidus* nemzetségbe tartozó törzsek gyakorlati felhasználásában.

Az egyik lehetőség a törzsek stabilizált enzim rendszereinek takarmány kiegészítőként történő felhasználása annak érdekében, hogy a mikotoxinok hatása csökkenjen. Ugyanakkor a genom projektek más, a vegyipar és környezetvédelem számára is izgalmas lehetőségeket tartogatnak. A teljes genomelemzéssel sikerült azonosítani és kialakítani az enzimrendszerek tanulmányozásának a bázisát a *Rhodococcus* és *Cupriavidus* törzsek esetében. A mikotoxinok esetében új takarmányokhoz adagolható mikroba vagy enzim alapú készítmények kifejlesztésére nyílik mód, továbbá az enzimrendszerek feltárásával az aromás szerkezetű szennyezőanyagok ártalmatlanításának lehetősége is előtérbe kerülhet. Előbbi létjogosultságát alátámasztja, hogy az eddig rendelkezésre álló lehetőségek száma kevés és az ismereteink bővülésével bizonyos alkalmazásokat el kell vetnünk pl: a kémiai kezelések már ma sem engedélyezettek az Európai Unióban a beavatkozások hatására keletkező toxikus metabolitok

miatt, egyes mikotoxinok esetében alkalmazott agyagásványok adszorpciós hatékonyságát egyre többször megkérdőjelezzik, vagy a biodetoxifikációs ágensként alkalmazott mikrobáról derül ki humán patogenitása.

A munkám során kiválasztott mikotoxin-biodegradációra képes három törzs (AK37, K408 és ŐR16) hatékonyságát több módszerrel is ellenőriztem, tekintettel a mikotoxinok és azok bomlástermékeinek hatásának megszűnésére. Az AFB1 esetében az SOS-Chromo teszt, valamint két állatetelési (hal, brojlercsirke) kísérlettel sikerült igazolni a mikotoxin-detoxifikációs képesség hatékonyságát. A ZEA esetében az EDC hatás vizsgálatára kifejlesztett BLYES tesztrendszerrel, valamint egy patkánykezelési kísérlet eredményeivel sikerült alátámasztani a törzs káros metabolitoktól mentes mikotoxinbontó képességét. Az OTA esetében pedig egy egérkezelési kísérlet eredményei igazolták a mikotoxinbontó és detoxifikáló képesség meglétét. Ezen bioteszteken és állatmodelleken lefolytatott vizsgálatokkal sikerült igazolnom azok biodegradációs képességük hatékonyságát. A T-2 tekintetben javasolható egy, a toxinra fejlesztett biológiai teszt alkalmazása és adaptálása, mivel a vizsgált mikotoxinok közül ez az egyetlen, amely bontási maradékát vagy a toxin hatását nem volt lehetőségem vizsgálni.

Az előző bekezdésben említett biológiai hatásvizsgálatok közül a magasabb rendű szervezeteken végzett kísérleteket számba véve:

(i) Az AK37 *Rhodococcus pyridinivorans* törzssel kezelt aflatoxinnal szennyezett kukoricát brojlercsirke és hal etetési tesztben sikeresen alkalmaztam. A brojlercsirke etetési kísérlet során a kiválasztott törzssel kezelt kontroll takarmánnyal etetett csirkék magasabb testtömeg értékeket mutattak, mint a mikrobamentes kontroll takarmánnyal etetett csirkék, bár a különbség nem volt szignifikáns. Erre a testtömeg különbségre magyarázatot adhat, hogy a kísérletben a biodetoxifikációra kiválasztott törzs (*R. pyridinivorans*) egy nemzetségébe tartozik azzal a *R. opacus* törzssel, amiről leírták, hogy a trigliceridek felvételét serkentő probiotikus hatással rendelkezik, amelyet malacokkal folytatott kísérlet során tapasztaltak (American Society of Animal Science, 2013, HTTP3). Ez a megfigyelés további irányt adhat a munkám során kiválasztott *Rhodococcus* törzsek takarmányok kezelésére történő alkalmazására.

(ii) A K408 *Rhodococcus pyridinivorans* törzs ZEA bontási maradékát patkánykezelési modell kísérletben ellenőriztük. Mind a két *Rhodococcus pyridinivorans* törzs az addigi mikrobiológiai és bioteszt vizsgálatokkal megegyező eredményeket adott, azaz biztonságosan felhasználhatóak az adott mikotoxin biodegradációjára.

(iii) Az ŐR16 *Cupriavidus basilensis* törzssel egérkezelési modell kísérletben ellenőriztük a törzs anyagcseretermékeinek és az ochratoxin-A biodegradációs mellék- és bomlástermékek biztonságosságát. Az eredmények alapján az általam kiválasztott törzsek hatékonyan és biztonságosan felhasználhatóak takarmányokban mikotoxin-mentesítés céljára.

Az előző bekezdésekben említett *R. pyridinivorans* (AK37, K408) és *C. basilensis* törzsek (ŐR16) toxinbontási képességéhez hasonló eredmények a szakirodalomban fellelhetők (2.6 sz. táblázat), de a biodetoxifikáció igazolására hasonlóan széleskörű toxikológiai felmérés nem készült, gyakorlati felhasználásban pedig ezidáig egyetlen a kereskedelmi forgalomban is kapható készítmény létezik. Ennek egyik alapanyaga a *Trichosporon mycotoxinivorans* élesztő újszerű és egyedi fajnak volt tekinthető OTA és ZEA bontásának köszönhetően (MOLNÁR ET AL., 2004). A törzs hatásosan csökkentette a ZEA és OTA toxicitását haszonállatokon tesztelve (POLITIS ET AL., 2005; HOFSTETTER ET AL., 2006). Az utóbbi években azonban Hickey és munkatársai (2009) a *T. mycotoxinivorans* mikroszervezet humán patogén tulajdonságait fedezték fel, ami a készítmény biztonságos alkalmazhatóságát kérdőjelezi meg. A *T. mycotoxinivorans* patogén tulajdonságát azonban Tintelnot és munkatársai 2011-ben cáfolták.

Az általam feltárt mikotoxinbontó törzsek biztonságosan alkalmazhatóak a különböző biodetoxifikációs eljárások során, amennyiben a további toxikológiai vizsgálatokban sem merül fel negatív hatás. Másik felhasználási lehetőségként a törzsek által termelt enzimekből előállított készítmény potenciális biodetoxifikáló ágens lehet, amelyhez az elvégzett két genom projekt megteremti a mikotoxinok bontásában részvevő enzimek feltárásának bázisát.

5. A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Folyóiratcikk:

- Cserhádi 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, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro. 166 (1) pp. 176-85. IF: 3,33
- Cserhádi M, Kriszt M, Szoboszlay S, Tóth Á, Szabó I, Tánicsics A, Nagy I, Horváth B, Nagy I, Kukolya J (2012): De novo genome project of *Cupriavidus basilensis* OR16, Journal of Bacteriology 194: (8) pp. 2109- 2110. IF: 3,726
- Kriszt B, Tánicsics A, Cserhádi M, Tóth Á, Nagy I, Horváth B, Nagy I, Tamura T, Kukolya J, Szoboszlay S (2012): De novo genome project of the aromatic degrader *Rhodococcus pyridinivorans* strain AK37. Journal of Bacteriology 194: (5) pp. 1247-1248. IF: 3,726
- Krifaton Cs., Kriszt B., Szoboszlay S., Cserhádi M., Szűcs Á., Kukolya J. (2011): Analysis of aflatoxin-B1 degrading microbes by a combined toxicity profiling method, Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 726 1-7 p. IF: 2,938
- Krifaton C, Kukolya J, Szoboszlay S, Cserhádi M, Szűcs Á, Kriszt B (2010): Adaptation of bacterial biotests for monitoring mycotoxins. WIT Transactions on Ecology and the Environment: Environmental Toxicology III., 132 143-154. p.
- Krifaton Cs., Cserhádi M., Prívler Z. (2011): Az aflatoxinok környezet-egészségügyi hatásai, Biokontroll 2 (4) 4-7 p.

Összes közlemény impakt faktora (IF): 13,72