



Szent István Egyetem

**AFLATOXIN B1 ÉS ZEARALENON BAKTERIÁLIS DETOXIFIKÁCIÓJA ÉLŐ
SEJTEKKEL ÉS SEJTMENTES KIVONATOKKAL**

Risa Anita
Gödöllő
2019

A doktori iskola

megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

tudományága: Környezettudomány

vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika, DSc
egyetemi tanár, intézetigazgató
Szent István Egyetem,
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Környezettudományi Intézet

Témavezető: Dr. Kriszt Balázs, PhD
egyetemi docens, intézetigazgató
Szent István Egyetem,
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Környeztbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

Dr. Krifaton Csilla, PhD
egyetemi adjunktus
Szent István Egyetem,
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Környeztbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1	A munka előzményei, kitűzött célok	2
2	Anyag és módszer	4
2.1	Élő sejtekkel végzett AFB1 és ZEA biodegradációjának és biodetoxifikációjának vizsgálata	4
2.2	Baktériumok sejtmentes kivonataival végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biodetoxifikáció vizsgálata	4
3	Az eredmények	6
3.1	Élő sejtekkel végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biodetoxifikáció vizsgálati eredményei	6
3.1.1	Az AFB1 biodegradációja	6
3.1.2	Új tudományos eredmények	10
3.1.3	A ZEA biodegradációja	10
3.1.4	Új tudományos eredmény	12
3.2	Baktériumok sejtmentes kivonataival végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biodetoxifikáció vizsgálata	12
3.2.1	AFB1 detoxifikációja <i>Rhodococcus</i> törzsek sejtmentes kivonataival	12
3.2.2	Új tudományos eredmény	14
3.2.3	ZEA detoxifikációja sejtmentes kivonatokkal	14
3.2.4	Új tudományos eredmény	18
4	Következtetések és javaslatok	19
5	Irodalomjegyzék	24
6	A témában megjelent publikációk listája	26

1 A munka előzményei, kitűzött célok

A takarmányokban és az élelmiszerekben megjelenő mikotoxinok hosszú idők óta veszélyeztetik az emberek és a haszonállatok egészségét, felfedezésükre mégis csak a XX. század közepén került sor. Az 1960-as években, Angliában ugyanis több ezer pulyka pusztult el akkor még ismeretlen okból, így a betegséget „*Turkey X disease*”-nek nevezték. Ezt követően jöttek rá a kutatók, hogy a hirtelen elhalálozást a penészes takarmányon lévő aflatoxin B1 mikotoxin okozta. Így kerültek a figyelem középpontjába a toxinogén penészgombák és az általuk termelt mikotoxinok, melyekből ma több mint 400 vegyületet tartanak számon. A mezőgazdasági termelők – bár nagy hangsúlyt fektettek a gombák elleni védekezésre – azok sikertelensége miatt a penészgombák megjelenése évről-évre súlyos gazdasági károkat okoz. A penészgombák a kiszámíthatatlan éghajlati viszonyokra toxintermeléssel reagálnak, sőt, a klímaváltozásnak köszönhetően olyan toxintermelő fajok is megjelentek egyes helyeken, ahol azelőtt az általuk okozott kockázattal nem kellett számolnunk. A mikotoxinok nemcsak a gazdasági károk előidézése miatt jelentenek problémát, hanem biológiai hatásaik révén gyors lefolyású akut megbetegedéseket, hosszú távon súlyos egészségügyi zavarokat, esetleg halált is okozhatnak. Az előbbieket tekintetében a mikotoxinok vizsgálata és az egészségkárosító hatásuk megszüntetése rendkívül fontos. Erre a célra elterjedtek fizikai, kémiai megoldások, ám a többféle módszer közül talán a legeredményesebb lehetőség olyan egészségre nem veszélyes mikroorganizmusok vagy azok enzimjeinek a használata, melyek nagy hatékonysággal képesek a mikotoxinok szerkezetét megbontani. A biológiai úton történő átalakítási folyamatok során viszont nem elég a lebontás mértékét figyelembe vennünk, hanem rendkívül fontos a keletkező bomlástermékek vizsgálata is. A metabolitok vizsgálatára terjedtek el a biológiai hatáselemzésen alapuló tesztek, melyek alkalmasak a mintában jelenlevő anyagok összegzett biológiai hatásának

vizsgálatára. Így a mikotoxin-eliminációs technikák során cél az anyavegyület és a metabolitjai káros hatásának a megszüntetése, azaz a biodetoxifikáció elérése.

Doktori munkám során a legveszélyesebbnek tartott – természetes rákkeltő – aflatoxin B1 (AFB1) és a súlyos ivarrendszeri problémát okozó zearalenon (ZEA) mikotoxinokkal foglalkoztam. Ezek a toxinok mára már világ- és Európa-szerte, trópusi és mérsékelt éghajlaton is elterjedtek, így a mikotoxin-detoxifikáció nagy kihívást jelent.

Mindezek tekintetében doktori munkámban célul tűztem ki, hogy:

- I. A változatos katabolikus tulajdonságokkal rendelkező, *Rhodococcus* baktérium nemzetségbe tartozó típus törzsek aflatoxin B1- és zearalenon-bontó képességét vizsgáljam, ellenőrizzem az átalakítási folyamat során megjelenő bomlástermékek káros biológiai (genotoxikus, hormonrendszert zavaró) hatását, és így megismerjem a nemzetség tagjainak detoxifikációs tulajdonságát;
- II. Bizonyítottan aflatoxin B1 detoxifikációjára képes két *Rhodococcus* törzs sejtmentes kivonatait biodegradációs kísérletbe vonjam, azok biodetoxifikációs hatékonyságát vizsgáljam és a folyamatban résztvevő enzimeket megismerjem az alábbi tulajdonságaik szerint:
 - A. extra- vagy intracellulárisak,
 - B. termelődésük folyamatos, azaz konstitutív vagy a toxin jelenléte indukálja az enzimtermelést kódoló gének expresszióját;
- III. Bizonyítottan zearalenon degradációra és detoxifikációjára képes nyolc *Rhodococcus*, egy *Streptomyces*, egy *Gordonia* és egy *Pseudomonas* törzs sejtmentes kivonatait biodegradációs kísérletbe vonjam, azok biodetoxifikációs hatékonyságát összehasonlítsam és a folyamatban résztvevő enzimek fenti (II. A-B) tulajdonságait megismerjem.

2 Anyag és módszer

2.1 Élő sejtekkel végzett AFB1 és ZEA biodegradációjának és biodetoxifikációjának vizsgálata

Az AFB1 és a ZEA élő sejtekkel történő vizsgálatára a *Rhodococcus* nemzetség 42 típus törzsét választottam, mellyel céлом volt megismerni azok mikotoxin-biodegradációs és -biodetoxifikációs képességét. A típus törzseket felszaporításuk után biodegradációs kísérletbe állítottam, ahol az AFB1 esetében 3 µg/mL, a ZEA esetében 1 µg/mL végkoncentrációt alkalmaztam. A három párhuzamosban elkészített rendszereket az AFB1 esetében 3, míg a ZEA esetében 7 napon keresztül rázattam 28°C-on. A pellet és felülúszó mintákban a maradék toxinkoncentrációt a fluoreszcens detektorral felszerelt magasnyomású folyadékkromatográffal (HPLC-FLD) határoztuk meg. Az AFB1 és bomlástermékeinek genotoxicitását a kolorimetrikus SOS-Chromo teszttel detektáltam. A minták genotoxikus hatását indukciós faktorban fejeztem ki, mely 1,5-nél kisebb érték esetén a veszélyes hatás megszűnését jelzi. A ZEA és metabolitjainak az ösztrogénhatását a biolumineszcencián alapuló BLYES teszttel mértem, mely esetében a negatív kontrollhoz viszonyított biolumineszcencia intenzifikációt (BI%) határoztam meg, mely egyenesen arányos az ösztrogénhatás mértékével. A citotoxikus hatást a BLYR teszt szervezettel ellenőriztem, mely sejttoxikus hatásra fénykibocsátás gátlással (BG%) reagál.

2.2 Baktériumok sejtmentes kivonataival végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biodetoxifikáció vizsgálata

A Szent István Egyetem Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszéken végzett korábbi vizsgálatok eredményei alapján ismert AFB1, ill. ZEA-detoxifikációs tulajdonsággal rendelkező törzsek sejtmentes kivonatainak mikotoxin-detoxifikációs hatékonyságát vizsgáltam, hogy a lebontásért felelős enzimek természetét megismerjem a későbbi biotechnológiai felhasználás céljából.

Az AFB1 bontására két *Rhodococcus* törzs, a ZEA bontására pedig nyolc *Rhodococcus*, egy *Gordonia*, egy *Pseudomonas* és egy *Streptomyces* törzs sejtmentes kivonatait alkalmaztam. A kísérletekben két vizsgálati irányt különítettem el. Eszerint vizsgáltam, hogy a toxinbontást végző enzimeket kódoló gének a sejt szaporodása során állandóan, vagyis konstitutívan íródnak át, vagy pedig a mikotoxin indukálja a génexpressziót, melynek következtében megjelennek a bontóenzimek. Az indukált enzimek termeltetésére toxinnal történő előinkubációt alkalmaztam. A másik vizsgálati irány pedig arra szolgált, hogy megkülönböztessem a médiumba kiválasztott, azaz extracelluláris enzimek degradációs képességét a citoplazmában lévő, azaz intracelluláris enzimek képességétől. Az intracelluláris enzimek feltárására pulzáló módban végzett ultrahangos sejtroncsolást alkalmaztam. A sejtmentes bontási kísérleteket 1,5 mL térfogatban három párhuzamos beállításával végeztem, melyeket 1 µg/mL végkoncentrációban AFB1 ill. ZEA toxinnal kontamináltam. A csöveket 37°C-on, 6 órán keresztül inkubáltam sötétben. A degradáció enzimátikus mivoltának az igazolására a feltárt enzimeket 1 mg/mL proteináz K + 1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS) keverékével emésztettem. A sejtmentes kivonatok relatív fehérjekoncentrációját az AFB1 bontási kísérlet esetében Bradford méréssel, a ZEA bontási kísérletben Pierce 660 nm fehérje teszttel végeztem. A sejtmentes kivonatokkal végzett lebontás utáni maradék toxinkoncentrációt HPLC-FLD ill. HPLC-MS/MS módszerrel ellenőriztük, a minták genotoxicitásának detektálásra az SOS-Chromo, az ösztrogénhatás kimutatására a BLYES tesztet alkalmaztam.

3 Az eredmények

3.1 Élő sejtekkel végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biotetoxifikáció vizsgálati eredményei

3.1.1 Az AFB1 biodegradációja

A baktériumsejteken való toxin megkötődés egyik törzs esetében sem volt jelentős mértékű ($<0,095 \mu\text{g/mL}$), tehát a biodegradációs hatékonyságot nem befolyásolta adszorpció. A *Rhodococcus* típus törzsek közül (1. táblázat) kettő törzs nem ($<20\%$), nyolc törzs pedig kismértékben bontotta a toxint (20-30%). 14 típus törzsnél közepesenél (50-80%) nagyobb mértékű degradációt figyeltem meg. A vizsgált törzsek közel 2/3-a jelentős, 80%-nál nagyobb, közülük 18 törzs pedig 90%-nál nagyobb bontási képességet mutatott. Az említett 18 törzs közül, a kísérlet végére 15 szüntette meg a toxin és bomlástermékei genotoxikus hatását (1. ábra), melyek a következő fajokhoz tartoznak: *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. pyridinivorans*, valamint a *R. aerolatus*, *R. artemisiae*, *R. baikonurensis*, *R. corynebacterioides*, *R. enclensis*, *R. imtechensis*, *R. kroppenstedtii*, *R. lactis*, *R. qingshengii*, *R. rhodnii*, *R. trifolii* és *R. tukisamuensis*, amelyek detetoxifikációs tulajdonságát elsőként bizonyítottam. Ezeknek a fajoknak az elhelyezkedése változatos a 16S rRNS szekvenciájuk alapján felrajzolt törzsfán (2. ábra).

1. táblázat: Aflatoxin B1 biodegradációs kísérletébe vont *Rhodococcus* típusörzsek bontási képessége és a mintákban mért genotoxikus hatás

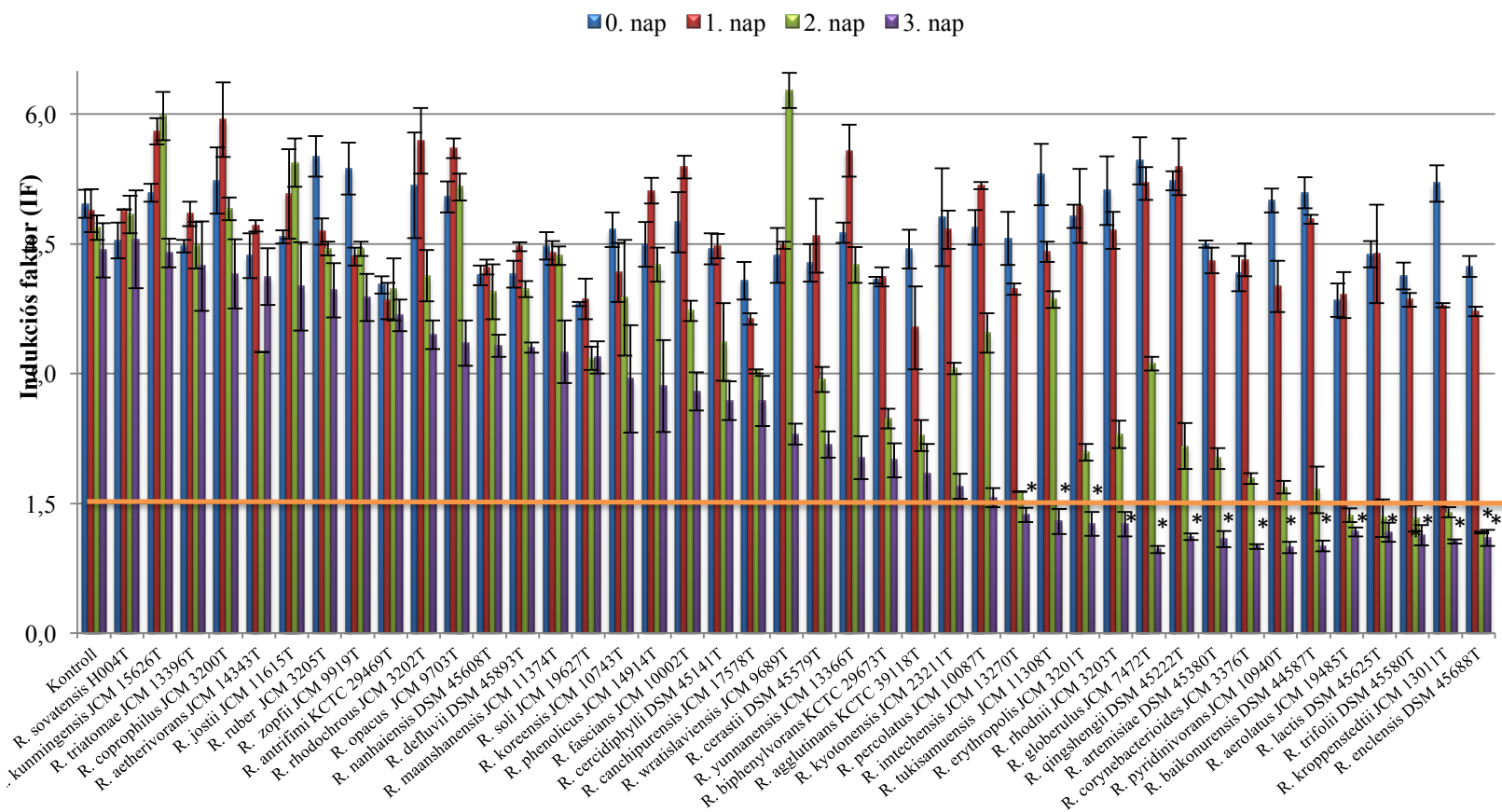
Faj neve	Törzs jele	Genotox. hatás (IF)	AFB1 koncentráció (µg/mL)		Biodegradáció (%)
			Felüliszó	Pellet [♦]	
AFB1 kontroll		4,43 ± 0,31	2,95 ± 0,15	-	-
<i>R. kunmingensis</i>	JCM 15626 ^T	4,39 ± 0,17	3,19 ± 0,08	0,022	-8
<i>R. jostii</i>	JCM 11615 ^T	4,01 ± 0,51	2,44 ± 0,19	< 0,001	17
<i>R. antrifimi</i>	KCTC 29469 ^T	3,67 ± 0,18	2,05 ± 0,18	0,064	31
<i>R. ruber</i>	JCM 3205 ^T	3,97 ± 0,31	1,93 ± 0,36	0,095	34
<i>R. aetherivorans</i>	JCM 14343 ^T	4,12 ± 0,33	1,91 ± 0,01	0,078	35
<i>R. coprophilus</i>	JCM 3200 ^T	4,15 ± 0,40	1,87 ± 0,08	0,011	37
<i>R. zopfii</i>	JCM 9919 ^T	3,88 ± 0,27	1,64 ± 0,79	0,062	44
<i>R. triatomae</i>	JCM 13396 ^T	4,24 ± 0,52	1,63 ± 0,69	0,007	45
<i>R. sovatensis</i>	H004 ^T	4,55 ± 0,57	1,60 ± 0,09	0,003	46
<i>R. opacus</i>	JCM 9703 ^T	3,35 ± 0,26	1,55 ± 0,11	0,024	48
<i>R. soli</i>	JCM 19627 ^T	3,19 ± 0,18	1,48 ± 0,04	0,048	50
<i>R. nanhaiensis</i>	DSM 45608 ^T	3,32 ± 0,13	1,37 ± 0,09	0,053	53
<i>R. defluvii</i>	DSM 45893 ^T	3,30 ± 0,06	1,36 ± 0,03	0,046	54
<i>R. maanshanensis</i>	JCM 11374 ^T	3,25 ± 0,36	1,30 ± 0,14	0,026	56
<i>R. koreensis</i>	JCM 10743 ^T	2,94 ± 0,62	1,01 ± 0,61	0,024	66
<i>R. rhodochrous</i>	JCM 3202 ^T	3,45 ± 0,17	1,01 ± 0,05	0,020	66
<i>R. fascians</i>	JCM 10002 ^T	2,80 ± 0,22	0,63 ± 0,01	< 0,001	79
<i>R. phenolicus</i>	JCM 14914 ^T	2,86 ± 0,53	0,59 ± 0,60	0,004	80
<i>R. canchipurensis</i>	JCM 17578 ^T	2,68 ± 0,29	0,55 ± 0,07	0,009	81
<i>R. cercidiphylli</i>	DSM 45141 ^T	2,68 ± 0,22	0,57 ± 0,17	0,012	81
<i>R. wratislaviensis</i>	JCM 9689 ^T	2,30 ± 0,12	0,52 ± 0,08	< 0,001	82
<i>R. cerastii</i>	DSM 45579 ^T	2,18 ± 0,15	0,34 ± 0,10	0,011	88
<i>R. agglutinans</i>	KCTC 39118 ^T	1,84 ± 0,34	0,32 ± 0,03	0,009	89
<i>R. biphenylivorans</i>	KCTC 29673 ^T	2,00 ± 0,20	0,31 ± 0,00	0,008	89
<i>R. kyotonensis</i>	JCM 23211 ^T	1,70 ± 0,14	0,23 ± 0,01	0,004	92
<i>R. percolatus</i>	JCM 10087 ^T	1,57 ± 0,11	0,21 ± 0,03	< 0,001	93
<i>R. yunnanensis</i>	JCM 13366 ^T	2,03 ± 0,25	0,15 ± 0,07	< 0,001	95
<i>R. imtechensis</i>¹	JCM 13270^T	1,36 ± 0,08	0,18 ± 0,04	< 0,001	94
<i>R. erythropolis</i>	JCM 3201^T	1,26 ± 0,13	0,15 ± 0,01	< 0,001	95
<i>R. tukisamuensis</i>¹	JCM 11308^T	1,29 ± 0,14	0,13 ± 0,08	0,001	95
<i>R. rhodii</i>¹	JCM 3203^T	1,26 ± 0,14	0,10 ± 0,07	0,030	97
<i>R. aerolatus</i>¹	JCM 19485^T	1,17 ± 0,05	0,04 ± 0,00	0,001	98
<i>R. enclensis</i>¹	DSM 45688^T	1,10 ± 0,09	0,05 ± 0,00	0,001	98
<i>R. lactis</i>¹	DSM 45625^T	1,16 ± 0,11	0,07 ± 0,01	0,003	98
<i>R. trifolii</i>¹	DSM 45580^T	1,13 ± 0,12	0,06 ± 0,01	0,003	98
<i>R. qingshengii</i>¹	DSM 45222^T	1,11 ± 0,04	0,06 ± 0,01	< 0,001	98
<i>R. artemisiae</i>¹	DSM 45380^T	1,09 ± 0,09	0,03 ± 0,00	0,001	99
<i>R. baikonurensis</i>¹	DSM 44587^T	1,01 ± 0,06	0,03 ± 0,00	< 0,001	99
<i>R. globerulus</i>	JCM 7472^T	0,96 ± 0,04	0,02 ± 0,00	< 0,001	99
<i>R. kroppenstedtii</i>¹	JCM 13011^T	1,06 ± 0,02	0,02 ± 0,00	< 0,001	99
<i>R. pyridinivorans</i>	JCM 10940^T	0,99 ± 0,07	0,02 ± 0,00	< 0,001	99
<i>R. corynebacterioides</i>¹	JCM 3376^T	1,00 ± 0,03	0,01 ± 0,00	< 0,001	100

Félkövér^T AFB1 biotetoxifikációjára képes törzsek (IF <1,5; p <0,05)

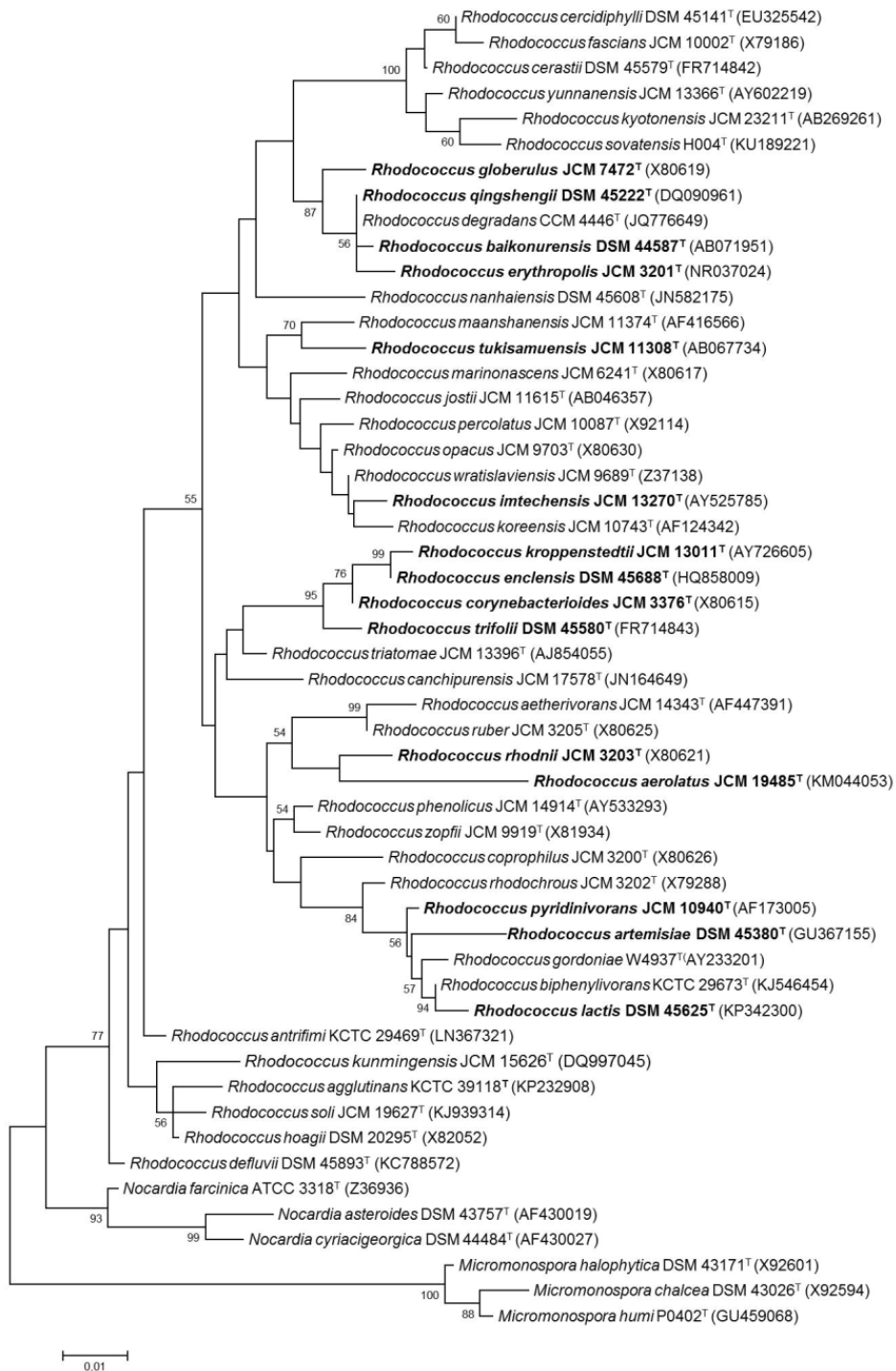
^T Típusörzsek

¹ Korábban nem bizonyított AFB1 biotetoxifikációs képességgel rendelkező törzsek

[♦] 1 mL metanollal extrahálva



1. ábra: Aflatoxin B1 biodegradációs kísérletbe vont *Rhodococcus* típusörzsek felüliszó mintáinak genotoxikus hatása SOS-Chromo teszttel meghatározva. Az értékeket indukciós faktorban fejeztem ki. A genotoxicitás megszűnését * jelzi (IF<1,5 [p<0,05])



2. ábra: A *Rhodococcus* törzsek filogenetikai kapcsolatát mutató, 16S rRNS génszekvencián alapuló *maximum-likelihood* fa. Az AFB1-biotetoxifikációs tulajdonsággal rendelkező törzseket félkövér betűtípus különbözteti meg. A topológia pontossága 1000 ismétlésen alapuló *bootstrap* analízisen alapult, és az 50% feletti értékek vannak jelölve (Mega 6).

3.1.2 Új tudományos eredmények

I. tézis (Az 5.1.1 alfejezetben ismertetett eredmények alapján): A 42 *Rhodococcus* nemzetséghez tartozó típus törzs vizsgálata során először írtam le a nemzetségen belül változatos filogenetikai elhelyezkedésű *R. imtechensis*, *R. tukisamuensis*, *R. rhodni*, *R. aerolatus*, *R. enclensis*, *R. lactis*, *R. trifolii*, *R. qingshengii*, *R. artemisiae*, *R. baikonurensis*, *R. kroppenstedtii* és *R. corynebacterioides* fajok aflatoxin B1 mikotoxint bontó és detoxifikáló képességet.

3.1.3 A ZEA biodegradációja

Néhány típus törzs (*R. fascians*, *R. aetherivorans*, *R. cerastii*, *R. kroppenstedtii*, *R. phenolicus*, *R. erythropolis*, *R. canchipurensis*, *R. triatomae*, *R. corynebacterioides*, *R. coprophilus*, *R. cercidiphylli*, *R. sovatensis*, *R. aerolatus*, *R. artemisiae*) esetében a toxin bontását követően szignifikáns ($p < 0,05$) BI% növekedés volt tapasztalható a kiindulási értékhez képest, melynek oka vélhetően a ZEA erősebb ösztrogénhatással rendelkező metabolitjainak (α -ZOL és α -ZAL) megjelenése lehet. A 42 típus törzsből 41 törzs nem, csak a *R. percolatus* JCM 10087^T törzs volt képes a biolumineszcenciát, így az ösztrogénhatást nagyobb mértékben, azaz 70%-kal csökkenteni (2. ábra). A fenti törzsek detoxifikációs hatékonyságának hiánya miatt analitikai toxin meghatározást csak a JCM 10087^T törzs mintái esetében végeztünk. A HPLC-FLD mérés során a mintából 0,053 $\mu\text{g/mL}$ ZEA-t mutattunk ki, ami az 1,171 $\mu\text{g/mL}$ kontrollhoz képest 95%-os degradációt jelent. A törzs esetében a lebontást igazolja, hogy a pelleten kötött ZEA koncentrációja 0,014 $\mu\text{g/mL}$ volt, így az ténylegesen a sejt metabolikus aktivitásának köszönhető, nem pedig a sejtfalon történő adszorpciónak. A *R. percolatus* faj ZEA-bontó és ösztrogénhatást csökkentő tulajdonságáról elsőként számoltam be.

2. táblázat: Zearalenon biodegradációs kísérletbe vont *Rhodococcus* típus törzsek felülülő mintáiban mért biolumineszcencia intenzifikáció, mely az ösztrogénhatással egyenesen arányos

Faj	Törzs	Biolumineszcencia intenzifikáció (%)	
		0. nap	7. nap
ZEA kontroll		880 ± 4.60	784 ± 4.72
<i>R. fascians</i>	JCM 10002 ^T	928 ± 2.63	1100* ± 0.76
<i>R. aetherivorans</i>	JCM 14343 ^T	988 ± 2.13	1090* ± 1.63
<i>R. kunmingensis</i>	JCM 15626 ^T	949 ± 4.00	1083 ± 12.69
<i>R. qingshengii</i>	DSM 45222 ^T	949 ± 4.27	1048 ± 5.67
<i>R. cerastii</i>	DSM 45579 ^T	840 ± 2.74	1039* ± 2.00
<i>R. kroppenstedtii</i>	JCM 13011 ^T	969 ± 1.72	1035* ± 2.96
<i>R. globerulus</i>	JCM 7472 ^T	948 ± 1.62	1030 ± 5.96
<i>R. phenolicus</i>	JCM 14914 ^T	922 ± 2.24	1029* ± 5.17
<i>R. maanshanensis</i>	JCM 11374 ^T	948 ± 3.81	1026 ± 3.12
<i>R. erythropolis</i>	JCM 3201 ^T	943 ± 2.45	1020* ± 2.91
<i>R. canchipurensis</i>	JCM 17578 ^T	816 ± 0.84	1009* ± 6.93
<i>R. triatoma</i>	JCM 13396 ^T	946 ± 0.67	1004* ± 1.45
<i>R. tukisamuensis</i>	JCM 11308 ^T	967 ± 4.56	1000 ± 1.49
<i>R. wratislaviensis</i>	JCM 9689 ^T	949 ± 0.71	993 ± 3.55
<i>R. corynebacterioides</i>	JCM 3376 ^T	942 ± 2.46	993* ± 1.30
<i>R. ruber</i>	JCM 3205 ^T	957 ± 3.49	991 ± 3.86
<i>R. biphenylivorans</i>	KCTC 29673 ^T	954 ± 0.66	976 ± 1.20
<i>R. baikonurensis</i>	DSM 44587 ^T	903 ± 1.37	969 ± 3.69
<i>R. coprophilus</i>	JCM 3200 ^T	897 ± 3.33	968* ± 0.71
<i>R. cercidiphylli</i>	DSM 45141 ^T	825 ± 3.21	965* ± 0.37
<i>R. zopfii</i>	JCM 9919 ^T	914 ± 3.49	942 ± 4.78
<i>R. imtechensis</i>	JCM 13270 ^T	967 ± 3.84	941 ± 0.90
<i>R. sovatensis</i>	H004 ^T	871 ± 2.37	935* ± 0.79
<i>R. rhodochrous</i>	JCM 3202 ^T	878 ± 2.76	931 ± 3.59
<i>R. aerolatus</i>	JCM 19485 ^T	900 ± 0.85	921* ± 0.50
<i>R. pyridinivorans</i>	JCM 10940 ^T	948 ± 2.85	915 ± 8.44
<i>R. artemisiae</i>	DSM 45380 ^T	819 ± 1.28	869* ± 2.71
<i>R. enclensis</i>	DSM 45688 ^T	827 ± 2.49	859 ± 1.48
<i>R. kyotonensis</i>	JCM 23211 ^T	924 ± 2.35	853* ± 1.53
<i>R. soli</i>	JCM 19627 ^T	899 ± 0.11	822* ± 0.89
<i>R. agglutinans</i>	KCTC 39118 ^T	913 ± 0.61	806* ± 0.93
<i>R. antrifimi</i>	KCTC 29469 ^T	866 ± 2.04	783* ± 1.11
<i>R. rhodnii</i>	JCM 3203 ^T	891 ± 4.15	771* ± 1.87
<i>R. koreensis</i>	JCM 10743 ^T	948 ± 3.28	766* ± 9.46
<i>R. jostii</i>	JCM 11615 ^T	896 ± 3.07	759* ± 2.07
<i>R. yunnanensis</i>	JCM 13366 ^T	914 ± 4.07	740* ± 5.54
<i>R. opacus</i>	JCM 9703 ^T	917 ± 1.19	722* ± 2.58
<i>R. nanhaiensis</i>	DSM 45608 ^T	828 ± 4.37	716* ± 1.99
<i>R. defluvii</i>	DSM 45893 ^T	802 ± 3.32	704* ± 2.14
<i>R. trifolii</i>	DSM 45580 ^T	803 ± 3.03	623* ± 1.80
<i>R. lactis</i>	DSM 45625 ^T	835 ± 2.63	611* ± 6.10
<i>R. percolatus</i>¹	JCM 10087^T	902 ± 4.41	256* ± 4.02

Félkövé >70% ösztrogénhatás csökkenés

* A nulladik napról származó mintában mért biolumineszcencia intenzifikációhoz viszonyított szignifikáns (p<0,05) csökkenés

¹ Korábban nem bizonyított ZON biodetoxifikációs képességgel rendelkező törzsek

3.1.4 Új tudományos eredmény

II. tézis (Az 5.1.2 alfejezetben ismertetett eredmények alapján): A 42 *Rhodococcus* nemzetséghez tartozó típus törzs vizsgálata során először bizonyítottam a *R. percolatus* faj zearalenon mikotoxint bontó képességét: a *R. percolatus* JCM 10087^T törzs a toxin 95%-nak eliminálása mellett az ösztrogénhatás 70%-os csökkentésére is képes volt.

3.2 Baktériumok sejtmentes kivonataival végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biodetoxifikáció vizsgálata

3.2.1 AFB1 detoxifikációja *Rhodococcus* törzsek sejtmentes kivonataival

A *R. pyridinivorans* NI1 és *R. rhodochrous* NI2 extracelluláris kivonataiban a fehérjekoncentráció <0,025 mg/mL volt, az intracelluláris kivonatokban pedig 6 mg/mL körüli értéket mértem. Az NI1 és NI2 törzsek extracelluláris kivonatainak esetében sem a konstitutív, sem az indukált extraktumok nem tudták a genotoxicitást csökkenteni a mintákban, viszont a törzsek indukált és konstitutív intracelluláris kivonataiban megszűnt a genotoxikus hatás, vagyis képesek voltak az AFB1 detoxifikációjára hat órán belül. Az intracelluláris kivonatok pH-toleranciájának felderítéséhez a semleges kémhatás mellett pH=7,5 és 8 kémhatáson is vizsgáltam a detoxifikációs hatékonyságot. A genotoxikus hatás megszűnése eltérő idő alatt ment végbe (3. táblázat), ám az intracelluláris kivonatok képesek voltak az AFB1 detoxifikációjára, tehát az enzimek stabilak a vizsgált kémhatásokon. A semleges kémhatáson végzett kísérletben résztvevő intracelluláris kivonatokban 80%-nál magasabb biodegradációs hatékonyságot mértünk az AFB1 kontrollhoz viszonyítva. A proteináz K és 1% SDS keverékével végzett kezelés után elhanyagolható mértékű toxincsökkenés történt az extraktumokban. A kezelés tehát inaktiválta a bontásért felelős enzimeket, mellyel sikerült bizonyítanom, hogy a kezeletlen kivonatokban enzimatis degradáció következett be (4. táblázat).

3. táblázat: *Rhodococcus erythropolis* NI1 és *R. rhodochrous* NI2 sejtmentes kivonatainak aflatoxin B1-bontásból származó mintáiban detektált genotoxikus hatás SOS-Chromo teszttel mérve.

IF	Extracelluláris kivonat				Intracelluláris kivonat											
	pH 7				pH 7				pH 7.5				pH 8			
	Konstitutív		Indukált		Konstitutív		Indukált		Konstitutív		Indukált		Konstitutív		Indukált	
	0h	6h	0h	6h	0h	6h	0h	6h	0h	6h	0h	6h	0h	6h	0h	6h
AFB1 kontroll	2,61± 0,09	2,59± 0,25	2,50± 0,10	2,73± 0,08	2,61± 0,14	2,38± 0,07	2,61± 0,14	2,55± 0,07	2,29± 0,24	2,22± 0,34	2,29± 0,24	2,22± 0,34	2,15± 0,08	2,12± 0,08	2,15± 0,08	2,12± 0,08
<i>R. erythropolis</i> NI1	2,49± 0,02	2,50± 0,03	2,91± 0,07	2,82± 0,03	1,49± 0,32	0,95± 0,15	1,19± 0,14	1,12± 0,09	1,83± 0,09	1,24± 0,06	1,39± 0,08	1,14± 0,11	1,87± 0,06	1,26± 0,15	1,40± 0,06	1,21± 0,08
<i>R. rhodochrous</i> NI2	2,45± 0,12	2,51± 0,02	2,76± 0,02	2,95± 0,04	1,35± 0,26	1,00± 0,26	1,33± 0,29	0,95± 0,03	1,54± 0,10	1,22± 0,19	1,39± 0,06	1,31± 0,12	1,63± 0,06	1,14± 0,07	1,52± 0,03	1,28± 0,10
	Erős genotoxicitás (IF > 2,0)															
	Csökkent genotoxicitás (1,5 < IF < 2,0 vagy IF szignifikánsan nem különbözik 1,5-től)															
	Nincs genotoxicitás (IF szignifikánsan kisebb 1,5 [p<0,05])															

4. táblázat: *Rhodococcus erythropolis* NI1 és *R. rhodochrous* NI2 aflatoxin B1 bontási kísérletbe vont kezeletlen és proteínáz K + SDS kezeléssel átesett intracelluláris kivonataiban mért AFB1 koncentrációja HPLC-FLD módszerrel meghatározva.

	AFB1 koncentrációja [µg/mL]	Degradációs potenciál [%]
AFB1 kontroll	1,043 ± 0,04	-
<i>R. erythropolis</i> NI1 konstitutív intracelluláris kivonata	0,096 ± 0,01	91 %
<i>R. erythropolis</i> NI1 indukált intracelluláris kivonata	0,169 ± 0,01	84 %
<i>R. rhodochrous</i> NI2 konstitutív intracelluláris kivonata	0,171 ± 0,01	84 %
<i>R. erythropolis</i> NI2 indukált intracelluláris kivonata	0,167 ± 0,00	84 %
AFB1 kontroll + proteínáz K + SDS	0,986 ± 0,11	-
<i>R. erythropolis</i> NI1 konstitutív intracelluláris kivonata + proteínáz K + SDS	0,887 ± 0,06	10 %
<i>R. rhodochrous</i> NI2 konstitutív intracelluláris kivonata + proteínáz K + SDS	1,002 ± 0,15	0 %

3.2.2 Új tudományos eredmény

III. tézis (Az 5.2.1 alfejezetben ismertetett eredmények alapján): A *Rhodococcus erythropolis* NI1 és a *R. rhodochrous* NI2 törzsek az aflatoxin B1 lebontását konstitutívan termelődő intracelluláris enzimekkel végzik, melyek a toxin több mint 80%-ának lebontását, és a genotoxikus hatás megszüntetését 6 órán belül elvégzik. Vizsgálataim igazolták, hogy az enzimek aktívak pH=7-8 között.

3.2.3 ZEA detoxifikációja sejtmentes kivonatokkal

A ZEA bontására használt extracelluláris kivonatok >0,025 mg/mL fehérjét tartalmaztak, az intracelluláris extraktumok fehérjekoncentrációja az *Gordonia paraffinivorans* NZS6 és a *Streptomyces cavourensis* K14 törzseknél ~0,2 mg/mL, a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* FEH28 és az összes *Rhodococcus* törzs kivonatában pedig 2 mg/mL-hez közeli vagy azt meghaladó volt. Az extracelluláris

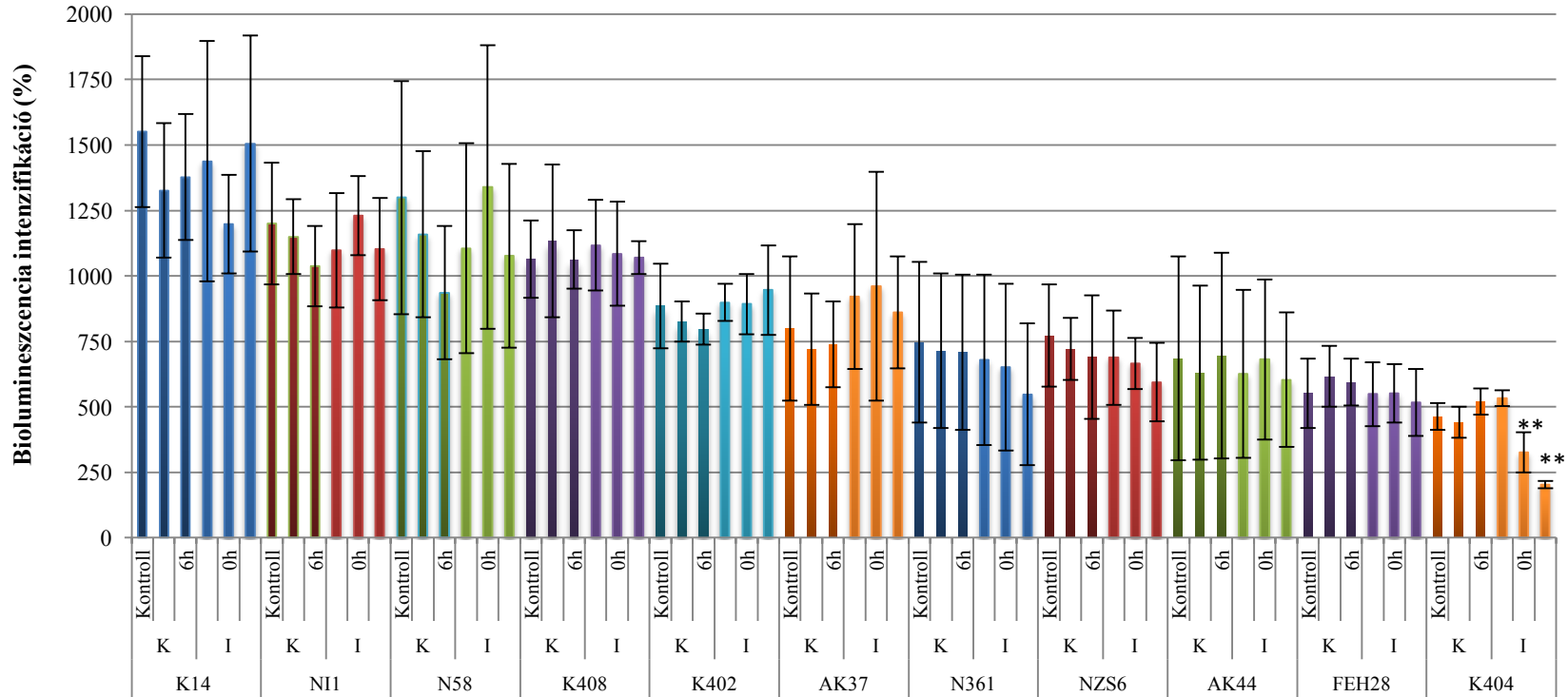
kivonatokban az ösztrogénhatást egyik törzs sem tudta csökkenteni, tehát nem extracelluláris enzimek felelősek a toxin bontásáért. Citotoxikus hatást (>70%) csak egy törzs, az NZS6 indukált és konstitutív extracelluláris kivonatában mértem. Ennek oka lehet a törzs anyagcsereterméke, melyet kiválasztott az extracelluláris térbe (5. táblázat).

Az intracelluláris kivonatok esetében három törzs (K14, AK44, FEH28) esetében mértem 20-70% citotoxikus hatást, így ezeknél a törzseknél az ösztrogénhatást nem értékeltem. A többi törzs (a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó NI1, N58, K408, K402, AK37, N361 és a *Gordonia* nemzetségbe tartozó NZS6) intracelluláris kivonatai nem tudták csökkenteni a ZEA ösztrogénhatását (3. ábra). A *R. pyridinivorans* K404 konstitutív kivonata sem bizonyult hatékonynak, viszont az indukált sejtmentes kivonat >60%-os hatáscsökkenést eredményezett. A K404 kivonatainak analitikai elemzése alapján a konstitutív kivonatban nem mértünk koncentrációcsökkenést a kontrollhoz viszonyítva. Az indukált kivonatban viszont a degradáció mértéke 98% volt, vagyis az indukált intracelluláris enzimek szinte teljes mértékben lebontották a ZEA-t. Az indukált kivonatban az enzimátikus bontás megerősítésére végzett proteináz K + 1% SDS kezelés analitikai mérése során nem tapasztaltunk koncentrációcsökkenést a kontrollhoz képest, a bontást végző enzimek inaktiválódtak, melynek következménye a degradáció hiánya (6. táblázat).

5. táblázat: Zearalenon bontási kísérletbe vont baktérium-törzsek extracelluláris kivonataiban mért ösztrogénhatás és citotoxikus hatás mértéke. Az ösztrogénhatást biolumineszcencia intenzifikációban (%), a citotoxikus hatást pedig biolumineszcencia gátlásban (%) fejeztem ki.

Törzs	Biolumineszcencia intenzifikáció (%)						Biolumineszcencia gátlás (%)					
	Konstitutív kivonat			Indukált kivonat			Konstitutív kivonat			Indukált kivonat		
	K	0h	6h	K	0h	6h	K	0h	6h	K	0h	6h
<i>G. paraffinivorans</i> NZS6	1220 ± 65	1369 ± 154	1216 ± 66	1411 ± 120	1410 ± 132	1463 ± 126	75 ± 6	74 ± 15	76 ± 3	76 ± 10	64 ± 12	77 ± 2
<i>P. pseudoalcaligenes</i> FEH28	975 ± 153	972 ± 163	978 ± 168	1038 ± 133	1044 ± 166	1055 ± 180	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>R. aetherivorans</i> AK44	771 ± 64	733 ± 53	764 ± 56	908 ± 83	883 ± 94	894 ± 99	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>R. erythropolis</i> N11	846 ± 66	833 ± 60	855 ± 50	929 ± 76	915 ± 63	910 ± 72	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>R. globerulus</i> N58	900 ± 44	863 ± 48	888 ± 34	971 ± 59	954 ± 68	951 ± 70	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>R. pyridinivorans</i> K404	783 ± 97	722 ± 78	727 ± 68	867 ± 48	809 ± 40	806 ± 75	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>R. pyridinivorans</i> K402	777 ± 74	763 ± 69	743 ± 66	858 ± 51	814 ± 67	788 ± 48	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>R. pyridinivorans</i> K408	799 ± 46	806 ± 86	765 ± 58	887 ± 84	869 ± 37	860 ± 51	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>R. pyridinivorans</i> AK37	782 ± 37	791 ± 60	782 ± 66	854 ± 56	832 ± 63	820 ± 75	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>R. ruber</i> N361	828 ± 65	810 ± 60	846 ± 65	995 ± 80	983 ± 57	975 ± 90	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>S. cavourensis</i> K14	918 ± 105	848 ± 111	885 ± 107	909 ± 87	858 ± 93	857 ± 102	ng	ng	ng	ng	ng	ng

K Kontroll: A törzs extracelluláris kivonata 1 µg/mL ZEA-val kontaminálva
n.g. nincs gátlás



3. ábra: Zearalenon bontási kísérletbe vont baktérium-törzsek intracelluláris kivonataiban mért biolumineszcencia intenzifikáció, mely az ösztrogénhatással egyenesen arányos. A „K” jelzés a konstitutív, az „I” pedig az indukált kivonatra utal. A kontrollhoz viszonyított szignifikáns különbséget ($p < 0,002$) ** -gal jelöltem.

6. táblázat: *Rhodococcus pyridinivorans* K404 zearalenon bontási kísérletbe vont kezeletlen és proteináz K + SDS kezeléssel átesett intracelluláris kivonataiban mért zearalenon-koncentráció

	ZEA koncentrációja [μg/mL]	Degradációs potenciál [%]
ZEA kontroll	2,071 ± 0,786	-
<i>R. pyridinivorans</i> K404 konstitutív intracelluláris kivonata	2,759 ± 2,148	0 %
<i>R. pyridinivorans</i> K404 indukált intracelluláris kivonata	0,025 ± 0,011	98 %
ZEA kontroll + proteináz K + SDS	1,677 ± 0,088	-
<i>R. pyridinivorans</i> K404 indukált intracelluláris kivonata + proteináz K + SDS	2,079 ± 0,381	0 %

3.2.4 Új tudományos eredmény

IV. tézis (Az 5.2.3 alfejezetben ismertetett eredmények alapján): Sejtmentes kivonatokkal végzett zearalenon bontás során bizonyítottam, hogy a *Rhodococcus pyridinivorans* K404 törzs esetében a biodetoxifikációért indukált intracelluláris enzimek felelősek, melyek képesek hat óra alatt a toxin több mint 90%-os bontásra, valamint a toxin és metabolitjai ösztrogénhatásának 60% feletti csökkentésére.

4 Következtetések és javaslatok

A *Rhodococcus* típus törzsekből álló gyűjtemény 42 tagjának vizsgálata során a törzsek degradációs hatékonysága rendkívül változatosnak bizonyult. Analitikai méréssel igazoltan néhány törzs nem, vagy csak közepes mértékben tudta szerkezetileg megbontani az AFB1-et, viszont 18 törzs esetében a degradációs hatékonyság meghaladta a 90%-ot. Vizsgálataim megerősítették, hogy a lebomlás mértékének megállapítása önmagában nem elegendő, hiszen az átalakítási folyamat végén SOS-Chromo teszttel ellenőrzött genotoxicitás nem minden esetben igazolta a biodetoxifikáció bekövetkeztét. Ugyanakkor a 16S rRNS szekvenciák alapján elkészített filogenetikai törzsfán látható, hogy az AFB1 biodetoxifikációban hatékony törzsek taxonómiaiilag egészen távol is elhelyezkedhetnek egymástól, azaz bontási képességük független a rokonsági kapcsolatoktól.

A *Rhodococcus* típus törzsek AFB1 degradációs és detoxifikációs képességét egyéb szakirodalomban leírt törzsekkel összehasonlítva egyezések és különbségek is megfigyelhetők. A SZIE Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszéken található *Rhodococcus* törzsek egy részének AFB1-bontó képességéről korábban már KRIFATON és mtsai (2011), valamint CSERHÁTI és mtsai (2013) beszámoltak. A publikációkban említett környezeti törzsek és a típus törzsek detoxifikációs képessége igazolja, hogy a *R. erythropolis* és *R. pyridinivorans* fajokhoz tartozó törzsek képesek az AFB1 detoxifikációjára. A *R. erythropolis* fajhoz tartozó poliaromás szénhidrogénekkal szennyezett talajból izolált DSM 14303 AFB1 biodegradációs hatékonysága is kiemelkedő (90%) volt (TENIOLA ET AL., 2005). Az említett fajokkal szemben, a *R. ruber*, *R. coprophilus* és *R. aetherivorans* fajok vizsgált törzsei nem szüntetik meg a toxin genotoxicitását, sőt hiányzik belőlük a degradációs képesség is. A *R. rhodochrous* és *R. globerulus* fajokhoz tartozó törzsek között hasonlóságot nem találtam, hiszen degradációs és detoxifikációs hatékonyságuk is nagymértékben különbözik egymástól (KRIFATON

ET AL., 2011; CSERHÁTI ET AL., 2013). Összességében elmondható, hogy a mikotoxin detoxifikációs képesség fajon belül és fajok között is nagy változatosságot mutat. Ennek okai lehetnek az eltérő környezeti körülmények és mobilis genetikai elemek, melyek függvényében a mikrobák más és más katabolikus képességre tesznek szert.

A ***Rhodococcus* típusörzsek ZEA** degradációs és detoxifikációs tulajdonságának vizsgálata során csak a triklorofenol tartalmú iszapból izolált (BRIGLIA ET AL., 1996) *R. percolatus* JCM 10087^T törzs bizonyult hatékonynak. Erről a törzsről elsőként mutattam ki, hogy a ZEA-t bontani és a toxin, valamint a bomlástermékeinek az ösztrogénhatását 70%-kal csökkenteni képes. Szakirodalmi adatok szerint a vizsgált *Rhodococcus* törzsek közül eddig a *R. pyridinivorans* fajhoz tartozó K402, K404 és K408 törzsek ZEA degradációs és detoxifikációs képessége került bizonyításra (CSERHÁTI ET AL., 2013; KRIFATON ET AL., 2013). Ezzel szemben a *R. pyridinivornas* típusörzs (JCM 10940^T) nem képes a ZEA ösztrogénhatásának csökkentésére. Annak ellenére, hogy a K402, K404 és K408 törzsek szénhidrogénekkal szennyezett kárhelyekről, a típusörzs pedig szennyvízből lett izolálva, és feltételezhetően mind kapcsolatba került aromás vegyületekkel, a ZEA-bontó tulajdonság – a toxin aromás gyűrűs szerkezete ellenére – nem függ a környezetben jelenlévő anyagokhoz való adaptációtól.

Az **AFB1 sejtmentes kivonatokkal** végzett lebontása során az enzimeket nem azonosítottam, viszont a *Rhodococcus erythropolis* NI1 és *R. rhodochrous* NI2 törzsek intracelluláris kivonataival teljes biodetoxifikációt értem el rendkívül gyorsan; egyes kivonatokban azonnal, ám minden esetben 6 órán belül. Más szerzők által publikált adatokhoz viszonyítva eredményeimnek gyakorlati jelentősége nagy, hiszen közel azonos mennyiségű toxin degradációja más sejtmentes kivonatok esetében jelentősen lassabban következett be. Emellett a szakirodalomban nem minden esetben vizsgálták a keletkező metabolitok biológiai hatását, azaz a detoxifikáció bekövetkeztét sem. A kivonatokkal végzett detoxifikáció és annak gyorsasága rendkívül fontos, azok gyakorlati felhasználása

során. Egy esetleges enzimalapú takarmány-adalékanyag lehetővé teszi az állat bélrendszerében történő toxin detoxifikációt, melynek során rövid idő alatt bekövetkező transzformáció megakadályozza a toxin és metabolitjainak a felszívódását az állat szervezetében. A szakirodalmi adatok szerint ezidáig csak gombákból (*Armillariella tabescens*, *Trametes versicolor*, *Pheniophora sp.*, *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *Phanerochaete sordida*) és egy baktériumfajból (*Myxococcus fulvus*) sikerült AFB1 bontásra képes enzimet izolálni (LIU ET AL., 2001; ZHAO ET AL., 2010). A *Rhodococcus* nemzetségből AFB1-bontásra képes enzimet még nem azonosítottak, ám az aktinomicétáknál feltételezhetően az FDR-A, FDR-B reduktázok lehetnek felelősek az AFB1 bontásáért (TAYLOR ET AL., 2010; LAPALIKAR ET AL., 2012).

A **ZEA sejtmentes kivonatokkal** végzett lebontása során az ösztrogénhatás változásának tekintetében szignifikáns csökkenést csak a *R. pyridinivorans* K404 törzs indukált kivonatában mértem. Mivel a konstitutív kivonat nem eredményezett csökkenést, így valószínűleg a toxin által indukált gének átíródása következtében keletkezett enzimek voltak képesek a biológiai hatás csökkentésére, mely a közel azonos fehérjekoncentráció értékek alapján nem mennyiségi, hanem minőségi különbséget jelez. A HPLC mérés a ZEA koncentrációjának 95%-os csökkenését, a BLYES teszt pedig az ösztrogénhatás >60%-os mérséklődését mutatta. Ez a látszólagos ellentmondás megint kiemeli a biotesztek alkalmazásának nélkülözhetetlenségét, ugyanis az anyavegyület biodegradációjának ellenére, a folyamat eredményeként olyan bomlástermékek képződhetnek, melyek ösztrogénhatással rendelkeznek. A ZEA enzimatis lebonatásáról más kutatók is beszámoltak, ugyanakkor *Rhodococcus* törzsekből készített sejtmentes kivonatokat korábban nem vizsgáltak, viszont az általuk megfigyelt nemzetségek sejtmentes kivonataival végzett toxinbontás és detoxifikáció az eredményeimhez képest sokkal lassabban következett be.

A biodegradáció enzimatiskus hátterének megismerése lehetővé teszi a hatékony és biztonságos törzsek gyakorlati felhasználását a jövőben. A takarmány- és élelmiszeriparban adalékanyagként, ill. enzimként alkalmazható mikroorganizmusokat az EFSA egy minősítési rendszerben értékeli, mely szerint a biztonságosnak ítélt szervezetek ún. QPS-státuszt (Qualified Presumption of Safety) kapnak és rákerülnek az EFSA által közzétett QPS-listára. A legfrissebb QPS-listán (EFSA, 2017) az általam vizsgált nemzetségek közül a *Rhodococcus*, és a *Gordonia* nem, csak a *Pseudomonas* és *Streptomyces* néhány faja szerepel. Eszerint a listán nem szereplő nemzetségekhez tartozó törzsek az élelmiszeriparban nem, csak a takarmányiparban, enzimeik formájában alkalmazhatóak.

Ma kereskedelmi forgalomban néhány biológiai takarmány-adalékanyag van jelen, ám ezek közül csak egy, a Biomin Holding GmbH (Ausztria) által forgalomba hozott FUMzyme[®] tartalmaz tisztított enzimet, mely a fumonizinek lebontására alkalmas. Ezen kívül tisztított formában a *Trametes versicolor* egy törzséből izolált AFB1 bontására képes lakkáz enzimet a Merck (Németország) forgalmazza.

Egy enzimalapú takarmányadalék létrehozásához nélkülözhetetlen a felhasználni kívánt enzim azonosítása, valamint a termelést szabályzó gének/génszakaszok felderítése. A fehérjék identifikálása, és szerkezeti azonosítása nagy kihívást jelent. Számos limitáló tényező közül hátrányt jelent a mintában lévő alacsony fehérjekoncentráció, a fehérjék érzékenysége, valamint a drága, nagy szaktudást és időt igénylő analitikai módszerek. Fehérjék azonosítására kínál megoldást két újkeletű analitikai módszer, melyek fehérjekeverékek identifikálására is képesek, ezek a MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight) és az ESI-TOF (Electrospray Ionization – Time Of Flight). A MALDI egy fotoionizációs ionforrással rendelkező tömegspektrométer, és a fehérjéket a „peptid-tömeg ujjlenyomat” alapján képes azonosítani. Ez a módszer rendkívül hatékony és előremutató, ám a hátránya, hogy a keresett fehérje tömege adatbázisban megtalálható kell legyen (DEUTZMANN, 2004). YU és mtsai

ezt a módszert használták arra, hogy az *Acinetobacter sp.* SM04 jelű törzs extracelluláris kivonatában megtalálható ZEA-bontásért felelős enzimeket azonosítsák (YU ET AL., 2011a). Az ESI módszerrel az *Armillariella tabescens* gomba AFB1 lebontását végző ADTZ enzimjét sikerült újra identifikálni. Az ESI-MS/MS vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy oxidázról van szó, mely az AFB1 szerkezetében lévő difurán gyűrűt hasítja, ami elsősorban az epoxidáció során játszik szerepet és a genotoxicitásért felelős (CAO ET AL., 2011). A toxin hatására indukálódott gének, így az enzimek azonosítására létezik még egy módszer, a transzkriptomika, mely a DNS-ből átíródott RNS vizsgálatával foglalkozik. A törzs eredeti és toxin által kiváltott genetikai változásokat összevethetjük a különböző transzkriptomok alapján, majd a különbségek azonosításával a gének is identifikálhatók. KOSAWANG és mtsai a *Clonostachys rosea* IK726 törzsét vetették transzkriptom vizsgálat alá, hogy feltárják azokat az enzimeket, melyek a gombát ZEA és deoxynivalenol toxinokkal szemben ellenállóvá teszik. A toxinokkal történő inkubációt követően a törzsből RNS-t izoláltak, abból kétszálú cDNS-t szintetizálva, majd hibridizálva, a transzkriptek amplifikálását követően elvégezték annak szekvenálását. A folyamat végeztével sikerült azonosítaniuk metabolikus enzimeket úgy, mint pl. a citokróm P450 és a ZEA-bontó ZHD101 (KOSAWANG ET AL., 2014).

A fenti módszerek valamelyikét alkalmazva a jövőben azonosításra várnak az AFB1 ill. a ZEA detoxifikációjára képes *Rhodococcus* törzsek génjei és enzimjei. Ezeknek ismeretében egy olyan enzimalapú takarmány-adalékanyag fejleszhető, mely biztonságosan, gyorsan és hatékonyan képes szembeszállni a takarmányok mikotoxin-szennyezettségével.

5 Irodalomjegyzék

- BRIGLIA, M., RAINEY, F.A., STACKEBRANDT, E., SCHRAA, G., SALKINOJA-SALONEN, M.S. (1996): *Rhodococcus percolatus* sp. nov., a bacterium degrading 2,4,6-Trichlorophenol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46:23-30 p.
- CAO, H., LIU, D., MO, X., XIE, C., YAO, D. (2011): A fungal enzyme with the ability of aflatoxin B1 conversion: Purification and ESI-MS/MS identification. *Microbiological Research*, 166:475-483 p.
- CSERHÁTI, M., KRISZT, B., KRIFATON, CS., SZOBOSZLAY, S., HÁHN, J., TÓTH, SZ., NAGY, I., KUKOLYA, J. (2013): Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 166:176-185 p.
- DEUTZMANN, R. (2004): Structural characterization of proteins and peptides. *Methods in Molecular Medicine*, 94:269-297 p.
- KOSAWANG, C., KARLSSON, M., JENSEN, D.F., DILOKPIMOL, A., COLLINGE, D.B. (2014): Transcriptomic profiling to identify genes involved in *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol and zearalenone tolerance in the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea*. *BMC Genomics*, 15:55 p.
- KRIFATON CS., KRISZT B., SZOBOSZLAY S., CSERHÁTI M., SZÜCS Á., KUKOLYA J. (2011): Analysis of aflatoxin-B1-degrading microbes by use of a combined toxicity-profiling method. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(1):1-7 p.
- KRIFATON, CS., KRISZT, B., RISA, A., SZOBOSZLAY, S., CSERHÁTI, M., HARKAI, P., ELDRIDGE, M., WANG, J., KUKOLYA, J. (2013): Application of a yeast estrogen reporter system for screening zearalenone degrading microbes. *Journal of Hazardous Materials*, 244-245:429-435 p.
- LAPALIKAR, G.V., TAYLOR, M.C., WARDEN, A.C., SCOTT, C., RUSSELL, R.J., OAKESHOTT, J.G. (2012): F₄₂₀H₂-dependent degradation of aflatoxin and other furanocoumarins is widespread through the *Actinomycetales*. *Plos ONE*, 7(2):1-9 p.
- LIU, D.L., YAO, D.S., LIANG, Y.Q., ZHOU, T.H., SONG, Y.P., ZHAO, L., MA, L. (2001): Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food and Chemical Toxicology*. 39:461-466 p.
- TAYLOR, M.C., JACKSON, C.J., TATTERSALL, D.B., FRENCH, N., PEAT, T.S., NEWMAN, J., BRIGGS, L.J., LAPALIKAR, G.V., CAMPBELL, P.M., SCOTT, C., RUSSELL, R.J., OAKESHOTT, J.G. (2010): Identification and characterization of two families of F₄₂₀H₂-dependent reductases from *Mycobacteria* that catalyse aflatoxin degradation. *Molecular Microbiology*, 78(3):561-575 p.
- TENIOLA, O.D., ADDO, P.A., BROST, I.M., FARBER, P., JANY, K.D., ALBERTS, J.F., VAN ZYL, W.H., STEYN, P.S., HOLZAPFEL, W.H. (2005): Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and

Mycobacterium fluoranthenivorans. *International Journal of Food Microbiology*, 105:111-117 p.

YU, Y., QIU, L., WU, H., TANG, Y., YU, Y., LI, X., LIU, D. (2011a): Degradation of zearalenone by extracellular extracts of *Acinetobacter sp.* SM04 liquid cultures. *Biodegradation*, 22:613-622 p.

ZHAO, L.H., GUAN, S., GAO, X., MA, Q.G., LEI, Y.P., BAI, X.N., JI, C. (2010): Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068. *Journal of Applied Microbiology*, 110:147-155 p.

6 A témában megjelent publikációk listája

Tudományos folyóiratokban megjelent (közlésre elfogadott), lektorált, teljes szövegű tudományos közlemény:

- Anita Risa**, Cs. Krifaton, J. Kukolya, B. Kriszt, M. Cserhádi, A. Tánicsics (2018): Aflatoxin B1 and zearalenone detoxifying profile of *Rhodococcus* type strains. *Current Microbiology*, 75:907-917. (IF: 1,373)
- Anita Risa**, D. M. Divinyi, E. Baka, Cs. Krifaton (2017): Aflatoxin B1 detoxification by cell-free extracts of *Rhodococcus* strains. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 64(4):423-438. (IF: 1,107)
- F. Sebők, Cs. Dobolyi, D. Zágoni, **Anita Risa**, Cs. Krifaton, M. Hartman, M. Cserhádi, S. Szoboszlay, B. Kriszt (2016): Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains in Hungarian maize fields. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, (IF: 0,921)
- Harkai, P., I. Szabó, M. Cserhádi, Cs. Krifaton, **Anita Risa**, J. Radó, A. Balázs, K. Berta, B. Kriszt (2016): Biodegradation of aflatoxin-B1 and zearalenone by *Streptomyces* sp. collection. *International Biodeterioration & Biodegradation* 108: pp. 48-56. (IF: 2,131)
- Cs. Krifaton, B. Kriszt, **Anita Risa**, S. Szoboszlay, M. Cserhádi, P. Harkai, M. Eldridge, J. Wang, J. Kukolya (2013): Application of a yeast estrogen reporter system for screening zearalenone degrading microbes. *Journal of Hazardous Materials*, 244-245:429-435. (IF: 4,331)

Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemények (nyomtatott formában v. elektronikus adathordozón – nem hitelesített kiadványokra vonatkozóan)

- Risa Anita**, Krifaton Cs., Divinyi D. M., Kukolya J., Kriszt B. (2016): Az aflatoxin B1 biodetoxifikációja *Rhodococcus* törzsek intracelluláris kivonataiva. VI. Ökotoxikológiai konferencia előadás és poszter kötete p. 29
- Anita Risa**, Cs. Krifaton, D. M. Divinyi, M. Cserhádi, J. Kukolya, B. Kriszt (2015): Examination of the AFB1-degrading profile of *Rhodococcus* type strains. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62: 206-207 pp.
- F. Sebők, Cs. Dobolyi, M. Hartman, **Anita Risa**, Cs. Krifaton, M. Cserhádi, Sándor Szoboszlay, B. Kriszt (2015): Two-year study of the aflatoxin-producing *Aspergillus* strains in the maize fields of Hungary, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62: 212 p.

Anita Risa, Cs. Krifaton, M. Cserhádi, J. Kukolya, B. Kriszt (2014):
Biodetoxification of zearalenone by cell-free extracts. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62. p 90.

Harkai P., Berta K., Szabó I., Krifaton Cs., Balázs A., Radó J., **Risa Anita**, Kriszt B. (2014): Screening for mycotoxin (aflatoxin B1, zearalenon) biodegradation from *Actinomyces* strain collection. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62. p. 29.

Impakt faktor összesen (IF): 9,863