



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
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Környezttudományi Intézet

Témavezetők: Dr. Kriszt Balázs, PhD
egyetemi docens, intézetigazgató
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Környeztbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

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

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1	Jelölések, rövidítések jegyzéke.....	3
2	Bevezetés	5
3	Irodalmi áttekintés.....	7
3.1	Szennyezőanyagok a környezetben	7
3.2	Mikotoxinok	7
3.2.1	Aflatoxin B1 és biológiai hatásai	9
3.2.2	Zearalenon és biológiai hatásai	12
3.3	Élelmiszer-és takarmánybiztonság.....	16
3.4	Mikotoxin-mentesítés	17
3.4.1	Aflatoxin B1 biodegradációja és biotranszformációja	19
3.4.2	Zearalenon biodegradációja és biotranszformációja	27
3.4.3	Biodegradációra alkalmazott baktérium nemzetségek jellemzése	32
3.4.3.1	<i>Rhodococcus</i> nemzetség	32
3.4.3.2	<i>Gordonia</i> nemzetség	33
3.4.3.3	<i>Streptomyces</i> nemzetség	33
3.4.3.4	<i>Pseudomonas</i> nemzetség	34
3.5	Mikotoxinok vizsgálatára alkalmas módszerek.....	34
3.5.1	Analitikai módszerek	35
3.5.1.1	Kémiai analitika	35
3.5.1.2	Immunanalitikai módszerek.....	36
3.5.2	Biológiai módszerek.....	36
3.5.2.1	SOS-Chromo teszt	37
3.5.2.2	BLYES/BLYR teszt.....	39
4	Anyag és módszer.....	41
4.1	Élő sejtekkel végzett AFB1 és ZEA biodegradációjának és biodetoxifikációjának vizsgálata	41
4.1.1	Felhasznált mikroszervezetek és mikotoxin törzsoldatok	41
4.1.2	A mikotoxin bontási kísérletek összeállítása	42
4.1.3	Mikotoxin-koncentráció analitikai meghatározása	43
4.1.4	Biológiai hatásmérés	44
4.1.4.1	SOS-Chromo teszt	44
4.1.4.2	BLYES/BLYR teszt.....	45
4.1.5	Statisztikai értékelés	46
4.2	Baktériumok sejtmentes kivonataival végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biodetoxifikáció vizsgálata	46
4.2.1	Felhasznált mikroszervezetek és mikotoxin törzsoldatok	46
4.2.2	A sejtmentes kivonatok elkészítése és a bontási kísérlet összeállítása	47
4.2.3	Fehérjekoncentráció meghatározása	49
4.2.3.1	Bradford mérés	49
4.2.3.2	Pierce 660 nm fehérje teszt	50
4.2.4	Biológiai hatásmérés	50

4.2.5	Mikotoxin-koncentráció analitikai meghatározása	50
4.2.6	Statisztikai értékelés.....	51
5	Eredmények	53
5.1	Élő sejtekkel végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biodetoxifikáció vizsgálati eredményei.....	53
5.1.1	Az AFB1 biodegradációja	53
5.1.2	A ZEA biodegradációja.....	59
	Új tudományos eredmények	62
5.2	Baktériumok sejtmentes kivonataival végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biodetoxifikáció vizsgálata	
	62	
5.2.1	AFB1 detoxifikációja <i>Rhodococcus</i> törzsek sejtmentes kivonataival	63
5.2.1.1	Fehérjekoncentráció meghatározása	63
5.2.1.2	A sejtmentes kivonatok biodetoxifikációs hatékonysága	64
5.2.1.3	A sejtmentes kivonatokban mért AFB1-koncentráció	66
	Új tudományos eredmény	67
5.2.2	ZEA detoxifikációja sejtmentes kivonatokkal	67
5.2.2.1	Fehérjekoncentráció meghatározása	68
5.2.2.2	Extracelluláris kivonatok biodetoxifikációs hatékonysága	69
5.2.2.3	Intracelluláris kivonatok biodetoxifikációs hatékonysága	70
	Új tudományos eredmény	74
6	Következtetések és javaslatok.....	75
7	Összefoglalás	81
8	English Summary	83
9	Mellékletek	85
M1.	Irodalomjegyzék	85
M2.	Az élelmiszerekben és takarmányokban maximálisan megengedhető határértékek az AFB1 és a ZEA tekintetében.....	100
M3.	Toxikológiai/ökotoxikológiai teszteknel alkalmazott mérési végpontok.....	103
M4.	Alkalmazott tápoldatok	104
M5.	A <i>Rhodococcus</i> típus törzsek első leírásuk és nemzetközi törzsgyűjteményben megtalálható jelölésük	106
10	Köszönetnyilvánítás.....	109

1 Jelölések, rövidítések jegyzéke

AFB1 – Aflatoxin B1

ALARA – As Low As Reasonably Achievable (Az ésszerűen elérhető legalacsonyabb szint)

BG% - Biolumineszcencia gátlási százalék

BI% - Biolumineszcencia intenzifikációs százalék

BLYES – Bioluminescent Yeast Estrogen Screen

BLYR – Bioluminescent Yeast Reporter

BSA – Bovine Serum Albumin (Marha vérsavó albumin)

CPS – Counts per Second (Másodpercenként becsapódó fotonszám)

ED hatás – Endocrine Disrupting (Hormonháztartást megzavaró)

EFSA – European Food Safety Authority (Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság)

ERE – Estrogen Response Elements (Ösztrogén válaszelem)

ESI-TOF – Electrospray Ionization - Time Of Flight

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (Élelmezési és Mezőgazdasági Világszervezet)

FMN – Flavin mononukleotid

GAP – Good Agricultural Practice (Jó mezőgazdasági gyakorlat)

IF – Indukciós faktor

MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight

NÉBIH – Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

OD₆₀₀ – 600 nm-en mért optikai denzitás

PCB – Poliklórozott bifenilek

QPS – Qualified Presumption of Safety

SDS – Sodium Dodecyl Sulphate (Nátrium-dodecil-szulfát)

SOSIP – SOS indukciós potenciál

TDI – Tolerable Daily Intake (Tolerálható Napi Bevitel)

ZEA – Zearalenon

WHO – World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

2 Bevezetés

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. Mára már több mint 400 mikotoxint azonosítottak és azok hatásainak a megismerésével egyre nőtt a figyelem is irányukba. Felfedezésüket követően elsősorban a penészgombák elleni védekezésre fordítottak nagy hangsúlyt a mezőgazdasági termelők, ám ezek a technikák nem bizonyultak elég hatékonynak. A védekezés sikertelensége miatt a penészgombák megjelenése évről-évre súlyos gazdasági károkat okoz, a kisebb terméshozamból eredő károk miatt, valamint a penészes gabona megsemmisítése, vagy megbetegedés esetén az állatok gyógyítását célzó kezelések is nagy költséggel járnak. 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 teljes biodetoxifikáció elérése.

Doktori munkám során a legveszélyesebbnek tartott – természetes rákkeltő – aflatoxin B1 és a súlyos ivarrendszeri problémát okozó zearalenon 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* baktériumnemzetségbe tartozó típustörzsek aflatoxin B1- és zearalenon-bontó képességét vizsgáljam, ellenőrizsem 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 detoxifikációra 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.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 Szennyezőanyagok a környezetben

A környezetben jelenlévő szennyezőanyagok eredetük szerint lehetnek természetes szennyezők, amelyek természetes körülmények között jelen vannak a környezetünkben; illetve mesterséges anyagok, vagyis xenobiotikumok, melyek megjelenése emberi tevékenység eredménye, így természetes körülmények között nem alakulnak ki. A szennyezőanyagok lehetnek könnyen lebomlóak, valamint perzisztensek is, amelyek a környezetben maradnak évekig, felhalmozódnak, akkumulálódnak az élő organizmusok zsírszöveteiben.

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

3.2 Mikotoxinok

A mikotoxinok természetes szennyezők, melyek a fonalas gombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek. Ezek a kis molekulásúlyú szennyezőanyagok az állati és emberi szervezetbe bekerülve már kis dózisban is okozhatnak akut és krónikus megbetegedéseket egyaránt, valamint kis molekulásúlyuk miatt antigén hatással nem rendelkeznek, így természetes immunválasz nem alakul ki velük szemben. A penészgombák megjelenésével kialakult megbetegedéseket mikózisnak, míg a gombatoxin által okozott kórokat pedig mikotoxikózisnak nevezzük. Ezek a mikroszkopikus gombák elsősorban gabonanövényeket fertőznek, melyeket takarmányok és élelmiszerek alapanyagaiként használunk fel, de előfordulnak közöttük fűszernövényeket és olajos magvakat fertőző fajok is. Mikotoxinokkal erősen szennyezett élelmiszer vagy takarmány nagymértékű fogyasztása esetén ezek az anyagok akár azonnali megbetegedéseket idézhetnek elő, hosszú távú szennyezett gabona fogyasztása következtében pedig évekkel később komolyabb megbetegedések alakulhatnak ki. A mikotoxikózisok súlyossága függ az elfogyasztott mikotoxin fajtájától, a fogyasztó korától, nemétől, egészségügyi állapotától és életvitelétől is. Számos penészgombáról

igazolták már mikotoxin-termelő képességét, valamint mára már több mint 400 különböző mikotoxint írtak le (MÉZES – BALOGH, 2010).

A legismertebb mikotoxin-termelő penészgomba nemzetségek és az általuk termelt mikotoxinok a következők (BENNETT – KLICH, 2003):

- *Aspergillus spp.* – aflatoxinok, szterigmatocisztinek, ochratoxin
- *Fusarium spp.* – zearalenon, fumonizinek, trichotecének, deoxinivalenol
- *Penicillium spp.* – ochratoxin, patulin, citrinin, citreoviridin
- *Claviceps spp.* – ergot alkaloidák

A veszélyeztetett szervek szerint megkülönböztethetünk

- genotoxinokat, melyek a szervezet genetikai állományát,
- reprotoxinokat, melyek a reprodukciós rendszert,
- immunotoxinokat, melyek az immunrendszert,
- neurotoxinokat, melyek az idegrendszert,
- hepatotoxinokat, melyek a májat károsítják.

Biológiai hatásuk alapján beszélhetünk többek között

- karcinogén, azaz rákkeltő,
- teratogén, azaz fejlődési rendellenességet okozó,
- mutagén, azaz örökítőanyag károsításával öröklődő mutációt okozó,
- allergén, azaz a szervezetben allergiás reakciót kiváltó anyagokról.

A fenti csoportok több mikotoxinra is igazak lehetnek, valamint egy vegyület többféle hatással rendelkezhet, így több szerv megbetegedéséért is felelős lehet.

A toxinogén penészgombák leg többje mezofil, melyek hőmérsékleti igénye 10-30°C, de nagy számban fordulnak elő pszichotróf (hidegtűrő) fajok is. Széles pH-tartományban, akár savas körülmények között is tudnak szaporodni. A gombák szaporodását elsősorban az oxigén, a hőmérséklet, a nedvesség és a tápanyagok befolyásolják. Ezzel szemben a toxintermelést egy vagy több környezeti tényező hirtelen megváltozása vagy másik gombafaj megjelenése okozza, mely stresszhatást vált ki a szervezetből, így a gomba erre toxintermeléssel válaszol. A mikotoxinok általában nem önmagukban, hanem kevert szennyezések formájában jelennek meg és egymás hatásait felerősíthetik vagy gyengíthetik (BENNETT – KLICH, 2003).

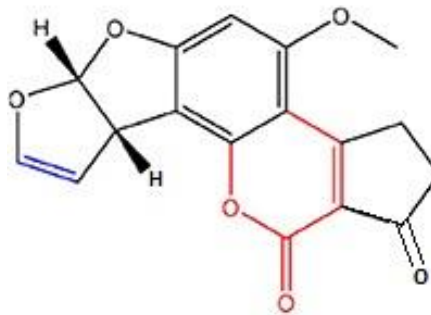
A mikotoxin-termelő penészgombákat megjelenésük alapján CHRISTENSEN és KAUFMANN (1969) két csoportra osztotta. Lehetnek szántóföldi és raktári penészgombák aszerint, hogy a növekedésükhöz mennyi vizet igényelnek. Szántóföldi penészgombák fő jellemzője a nagy nedvesséigény, amelyek képviselői a következők: *Acremonium*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Helminthosporium* fajok. A raktári penészgombák közé tartoznak: *Absidia*,

Aspergillus, *Mucor*, *Penicillium* és a *Rhizopus* nemzetség tagjai. Ez a csoportosítás azért jelentős, mert a penészgombák eredetét ismerve választhatunk a fertőzés megelőzésének módjai közül.

Doktori munkám során két mikotoxinnal foglalkoztam, melyeket részletesen az alábbi fejezetekben mutatok be.

3.2.1 Aflatoxin B1 és biológiai hatásai

Az aflatoxin B1 (AFB1) az aflatoxinok (17 vegyület) csoportjába tartozó mikotoxin, melyet az *Aspergillus* gombanemzetség képviselői, az *A. flavus*, *A. parasiticus* (DIENER – DAVIS, 1987), *A. nomius* (KURTZMAN ET AL., 1987), *A. tamarii*, *A. ochraceoroseus* (KLICH ET AL., 2000), *A. bombycis* (PETERSON ET AL., 2001) és *A. pseudotamarii* (ITO ET AL., 2001) termelik. Az *Aspergillus* penészgombák elsősorban olajos magvakat, gabonanövényeket és fűszereket fertőznek, így aflatoxikózis kockázata ezeknek az élelmiszereknek a fogyasztásával merülhet fel (DIENER ET AL. 1987). Az aflatoxinok közé tartozik



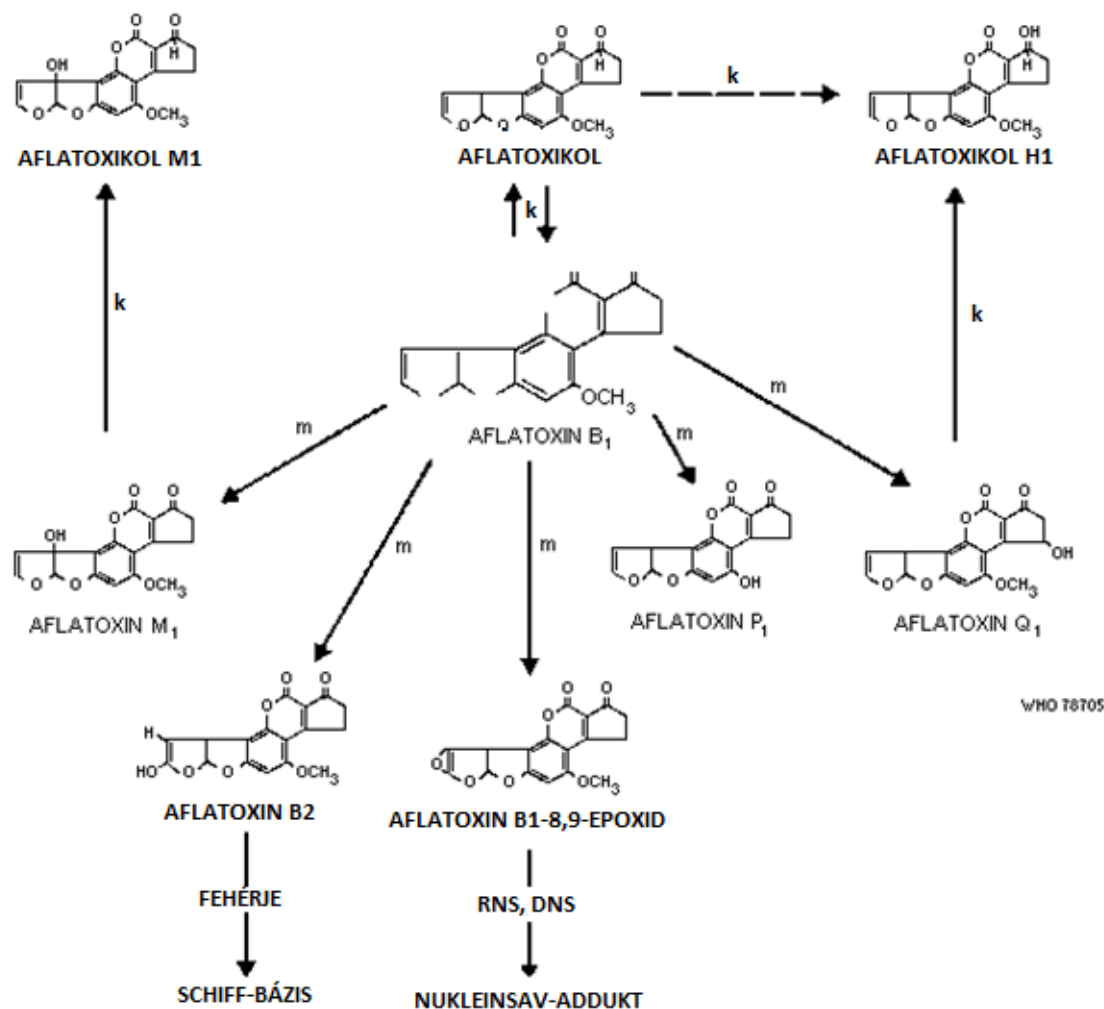
1. ábra: Az aflatoxin B1 szerkezeti képlete (VANHOUE ET AL., 2016). A difurán gyűrűben található, kék színnel jelölt kettős kötés felszakadásának eredményeként jön létre az epoxid-származék (WOGAN ET AL., 1971). Piros szín a lakton gyűrűt jelzi.

az aflatoxin B1, B2, G1, G2, mely nevezéktan az UV-fényben való kék (B = *blue*) ill. zöld (G = *green*) színnel való fluoreszkálásuknak köszönhető. További átalakulási termékeik, metabolitjaik pedig az aflatoxin D1, P1, Q1, az aflatoxikol valamint a tehén- és anyatejben megjelenő aflatoxin M1 és M2. Kémiai szerkezetüket tekintve difuranokumarin-származékok (1. ábra), azaz két furán gyűrű összekapcsolásából álló vegyületek (BENNETT – KLICH, 2003).

Az AFB1 az egyik legveszélyesebb mikotoxin, ugyanis biológiai hatásainak következtében konkrét tünetekkel jelentkező akut, és hosszan elhúzódó dózis-válasz görbével jellemezhető, krónikus megbetegedéseket okozhat. Az akut megbetegedést aflatoxikózisnak nevezzük. A toxin a szervezetbe kerülve a sejtmembránon át felszívódik, és a véráramba kerül, ahonnan könnyen eljut a májig, és ott metabolizálódik. Az AFB1 szerkezetében lévő C₈-C₉ kettős kötés felszakítása következtében egy reaktív vegyület, az ún. aflatoxin-8,9-epoxid keletkezik a máj citokróm P450 enzimjei által végzett átalakítás következtében. Először 1974-ben SWENSON és mtsai (1974) bizonyították *in vivo*, hogy egy metabolikus aktiválási lépést követően az AFB1-ből keletkező termék, az aflatoxin-8,9-epoxid (korábbi nevén aflatoxin B1-2,3-oxid) patkányok DNS-éhez, RNS-éhez és fehérjéihez képes kötődni ún. adduktokat képezve. *In vitro* kimutatták továbbá az AFB1 epoxi-származékának kötődését humán májsejtek

endoplazmatikus retikulumainak részét képező mikroszómában lévő RNS-hez is. Az említett fehérje-adduktok felelősek az akut megbetegedésekért, a DNS-adduktok, mint az AFB1-N⁷-guanin pedig a guanin-citozin bázispárok timin-adenin bázisokká való kicserélődését okozzák, így a májat és a genetikai állományt károsító, hepatotoxikus és genotoxikus hatása később rákos elváltozásokat is eredményezhet. A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (*International Agency for Research on Cancer*) az aflatoxinokat (B1, B2, G1, G2, M1) a „Bizonyítottan humán rákkeltő” kategóriába sorolta (WHO – IARC, 2012).

Az AFB1 nemcsak epoxidáció révén alakulhat át, hanem a máj reduktáz enzimjei aflatoxikollá (aflatoxin R₀) (WONG – HSIEH, 1976), valamint oxidáz enzimjei aflatoxin M1, P1 és Q1 toxinokká alakíthatják, melyek az állati termékekben akumulálódhatnak (pl. AFM1 megjelenése a tehéntejben). Az AFB1 hidrolízis útján AFB2 metabolittá alakul, miután fehérjékhez kötődve Schiff-bázisokat képez (HSIEH, 1987). A leírt átalakítási útvonalakat a 2. ábra jelöli, melyen az „m” a metabolizációt, a „k” pedig a konverziót jelöli.



2. ábra: Az AFB1 metabolizmusa (WHO, 1979)

Az AFB1 – genotoxikus és rákkeltő hatása mellett – több káros hatással rendelkezik. Immunszuppresszív hatására akkor derült fény, amikor kutatók patkányokat tanulmányoztak AFB1 toxinnal való etetést követően. 12 hét elteltével a bélrendszer sejtjeinek osztódása lecsökkent, mely a bélrendszer megfelelő működését megzavarva, csökkentette a szervezet ellenálló képességét (FLEMING ET AL., 1994). Bebizonyították továbbá, hogy az AFB1 már 50 ng/L koncentrációban citotoxikusnak bizonyult az NK-sejtekre, vagyis a természetes ölüsejtekre (METHENITOU ET AL., 2001), valamint 0,5 ng/L-es koncentrációban csökkentette, magasabb koncentrációban pedig teljesen megszüntette a humán monociták immunválasz szabályozását citokin¹-kibocsátását és genetikai átíródását (ROSSANO ET AL., 1999). Az AFB1 celluláris és humorális immunválaszra kifejtett hatásának vizsgálata során elválasztott patkányok esetében 300 és 600 µg/testtömeg kg-onként adagolt AFB1 már szignifikánsan befolyásolta a sejtes immunválaszt, valamint a T- és B-sejtek osztódását (RAISUDDIN ET AL., 1993).

Az AFB1 hormonháztartást megzavaró, ún. ED (endokrin diszruptor) hatását STROVIK és mtsai bizonyították, akik vizsgálataikban kimutatták az AFB1 által indukált aromatáz enzim expresszióját (STROVIK ET AL., 2011). Korábbi tanulmányokban már több AFB1 által okozott, reprodukciós szervekben bekövetkező elváltozásokról számoltak be kutatók. 1980-ban a herék és a petefészek méretének és a tesztoszteron koncentrációjának csökkenését, valamint a szexuális fejlődés lelassulását írták le japán fürjek esetében AFB1 toxinnal történő etetés (5 µg/g táplálékban) után (DOERR – OTTINGER, 1980). Az ED hatással szorosan összefüggő teratogén, vagyis fejlődési rendellenességeket okozó hatása is bebizonyosodott. Vemhes patkányok AFB1 toxinnal történő etetést követően, az anyaállatnál testsúlycsökkenés, a legmagasabb vizsgált koncentrációban (1 mg/kg) pedig magzati elhalás következett be. Ugyanez a koncentráció a magzatoknál fejlődési rendellenességeket okozott, mint pl. az agy koponyán kívüli növekedése és a szemek elváltozása, valamint a csontozat és a belső szervek rendellenes fejlődése (WANGIKAR ET AL., 2004). Ugyanez a kutatócsoport nyulak 6-18 héten keresztül AFB1 mikotoxinnal szennyezett (0,1 mg/testtömeg kg) kukoricával történő etetése után kimutatta az embriók tömegének, csontvázának és belső szerveinek elváltozásait; pl. a szemüreg megnagyobbodása, a koponya hibás csontosodása, máj torzulása (WANGIKAR ET AL., 2005). Az AFB1 teratogén hatását nemcsak állatok, hanem sajnos emberek esetében is leírták. 2002-ben az Egyesült Arab Emírségekben 201 várandós nő köldökzsinór vérének vizsgálták, melyekből 27 esetben AFB1-et, további esetekben pedig AFM1, ill. AFM2 metabolitokat mutattak ki, melyek bizonyítottan hozzájárultak a csecsemők születési súlyának csökkenéséhez (YOUSEF ET AL., 2002).

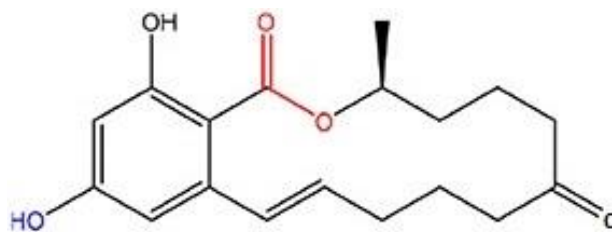
¹ Fehérjék, melyek az immunsejtek közötti információ-átadást és az immunválasz szabályozását végzik

3.2.2 Zearalenon és biológiai hatásai

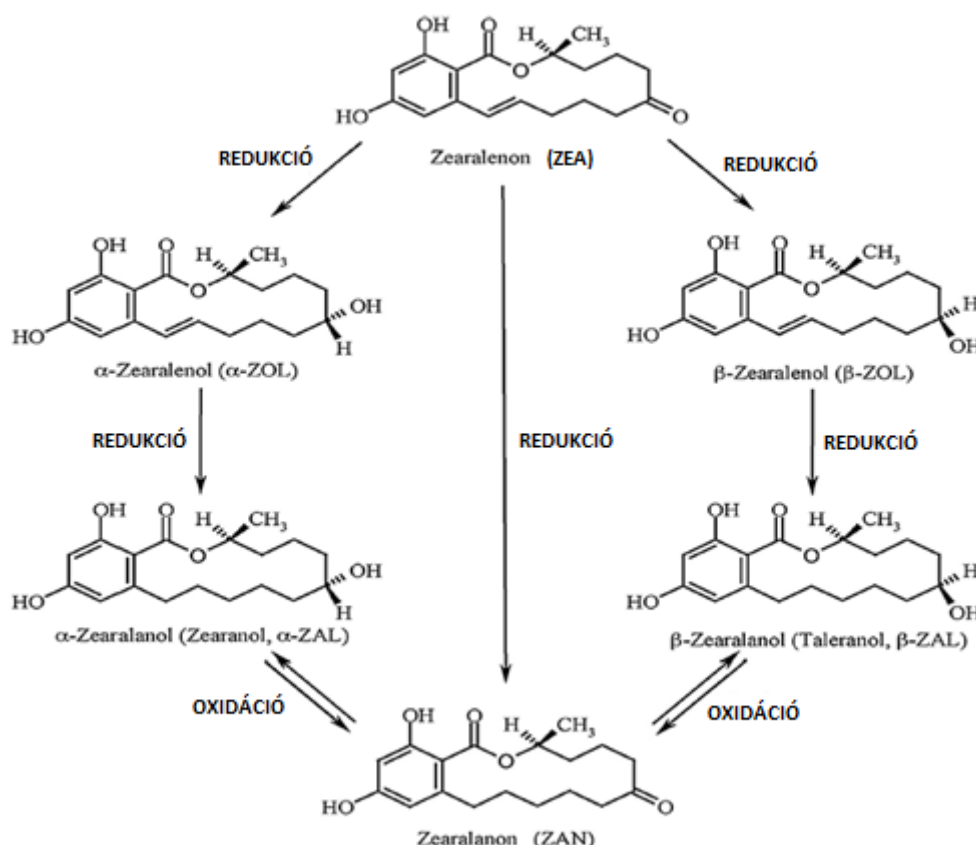
A zearalenon (ZEA), a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fajok által termelt rezolcilsav-lakton (3. ábra). A leggyakoribb termelői a következő fajok: *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. lateritium*, *F. crookwellense*, *F. semitectum* (BENNETT – KLICH, 2003). A *Fusarium* fajokat a szántóföldi gombák közé sorolják, de raktári fertőzésekért is felelőssé tehetőek. A toxint

termelő fuzáriumok elsősorban a kukoricát fertőzik, de megjelenhetnek búzán, árpán is (ZINEDINE ET AL., 2007). A gombafertőzés következtében megjelenő vegyület egy transz-izomer, ami UV-fény hatására cisz-izomerré alakulhat a C₁₁-C₁₂ kettős kötés módosulásával (KÖPPEN ET AL., 2012).

A ZEA felszívódását követően a bélrendszerbe jutva tovább alakul metabolitjaivá. Első lépésként 3 α - és 3 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzimek hidroxiláció útján α - és β -zearalenollá (α -ZOL, β -ZOL) alakítják, melyek aztán a C₁₁ és C₁₂-atomok közötti kettős kötés felszakadásával átalakulnak α - és β -zearalanollá (α -ZAL, β -ZAL) (4. ábra). Metabolitjai között előfordulnak az anyavegyületnél erősebb toxicitással rendelkező változatok, mint az α -ZOL, a zearalanon (ZAN), α -ZAL és β -ZAL (SHIER ET AL., 2001).

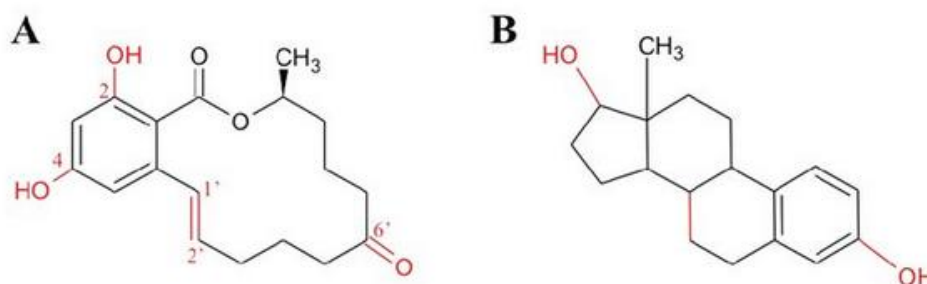


3. ábra: A zearalenon szerkezeti képlete (VANHOUE ET AL., 2016). Piros szín jelöli a lakton gyűrűt, kék színnel jelölt hidroxil csoport pedig lehetőségessé teszi a toxin ösztrogénreceptorhoz való kötődését (EL-SHARKAWY & ABUL-HAJJ, 1988b).



4. ábra: A zearalenon metabolizmusa (BELHASSEN ET AL., 2015)

A ZEA szerkezetének köszönhetően ösztrogén-analóggént viselkedik (5. ábra), ugyanis metabolitjaival együtt képesek az ösztrogén-receptorokhoz ($ER\alpha$ és $ER\beta$) kötődni. A megkötődést követően a ZEA-receptor komplex bekerül a sejtmagba, ahol az ösztrogén válaszelemeknek (ERE) köszönhetően beindítja az ösztrogénspecifikus gének átíródását (RILEY 1998). A ZEA és metabolitjainak ösztrogén-receptorokhoz való kötődésének vizsgálata során kimutatták, hogy a natív ZEA (transz-izomer) borjú és ivaréretlen patkányok méhének receptoraihoz való kötődése csupán 10-szer gyengébb, mint a természetes ösztradiol hormon affinitása. Ezzel szemben viszont a cisz-izomer még erősebben kötődik a hormonreceptorokhoz. A ZEA további két metabolitja, a 8'-hidroxil- és a 6'-amino-származékok pedig nem rendelkeztek receptorkötő képességgel (KIANG ET AL., 1987). Rágcsálókön végzett kísérletek során vizsgálták, hogy a ZEA és metabolitjai hatására milyen mértékben növekedett a méh tömege (*Uterotrophic assay*), melynek eredményeképpen az EFSA a következő sorrendet állította fel ösztrogénaktivitás szempontjából: α -ZOL > α -ZAL > ZEA $\approx$ ZAN $\approx$ β -ZAL > β -ZOL (EFSA, 2016).



5. ábra: A zearalenon (A) és a 17- β -ösztradiol (B) szerkezeti hasonlósága. A pirossal jelölt funkciós csoportok felelősek az ösztrogén-receptorokhoz való kötődésért (LOI ET AL., 2017).

A ZEA ösztrogénszerű hatásának köszönhetően származékaival együtt főként szaporodásbiológiai és ivarzási problémát okoznak (GROMADZKA ET AL., 2008). Elsősorban az endometrium (méhnyálkahártya), a petefészek, a tejmirigy, a hipotalamusz és a hipofízis elülső lebenyének sejtjein található ösztrogén-receptorokhoz kapcsolódnak, így tudják kifejteni a hatásaikat. Ösztrogénszerű hatásukat befolyásolja a receptorok típusa és eloszlása is. Ez okozza az eltérő érzékenységet a fajok között. Sokszor a fuzárium toxinok szinergizmus révén felerősítik egymás hatását még súlyosabb szaporodásbiológiai zavarokat okozva (CSEH – KOVÁCS, 2010).

A 70-es években egy magyar kutatócsoport bizonyította a ZEA hormon- és reprodukciós rendszert zavaró hatását. A kísérletben vizsgált állatok hosszú ideig szennyezett takarmánnyal történő etetése következtében zavarok léptek fel a tüszőérésben valamint a spermatogenezis során is (RUZSAS ET AL., 1979). Erre irányuló további kutatások eredményei részletesebben jellemzik a ZEA ED hatását. A ZEA képes megváltoztatni különböző biológiai markereket: patkánytetési kísérlet során a toxin hatására néhány ösztrogénfüggő génnek az expressziója lecsökkent (APLN, AQP5) ill. megnövekedett (CALB3, C2) (HENEWEER ET AL., 2007). A ZEA proteomra vagyis a szervezet fehérjéire kifejtett hatásának vizsgálata során a H295R mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonalat toxinnal kezelve bebizonyosodott, hogy a ZEA hatással van a hormonrendszert befolyásoló fehérjékre, mint az elektrontranszport-láncban megtalálható citokróm-c oxidáz fehérjék, valamint az androgének termelését szabályzó SCARB (gyökfogó receptor fehérje osztály) fehérjék (BUSK ET AL., 2011). NAKAMURA és KADOKAWA beszámolt a toxin és 5 fő metabolitjának (α -ZAL, β -ZAL, α -ZOL, β -ZOL, ZAN) luteinizáló hormon szintézisét gátló hatásáról a GPR30 receptorhoz való kötődés következtében, mely ezáltal beavatkozott a reprodukciós szervek működésébe (NAKAMURA – KADOKAWA, 2015). Hím patkányok esetében, a here szöveteinek sejtjeiben lévő gének (ciklin D1, E2f1) expressziója fokozódott a ZEA jelenlétében, mely apoptózishoz vezetett, 2 mg/kg dózis fölött pedig patológiás elváltozásokat okozott (CHERAGHI ET AL., 2015). A ZEA hatással van továbbá a here

Sertoli-sejtjeire is, hiszen a citoszkeleton képző fehérjék (F-aktin, α -tubulin) szerkezetét módosítja, más fehérjék (transzferin, inhibin b, FSHR, ABP) szintézisét gátolja (ZHENG ET AL., 2016). Kimutatták továbbá, hogy a toxin hatására oxidatív stresszt indukáló reaktív oxigénformák keletkeznek a Leydig-sejtekben, valamint a toxin a sejten belüli szignalizációt is megzavarja (SAVARD ET AL., 2016). Mindezek összegzett hatására pedig hiba lép fel a spermatogenezisben és a szteroidszintézisben is. Nőivarú egereken végzett vizsgálatok igazolták, hogy a ZEA gátolja a petesejtet körülvevő granulosa sejtek osztódását, zavart kelt a petesejt érésének folyamatában a citoszkeleton fehérjék károsítása révén, valamint kihat a petesejtben lévő kortikális granulumok eloszlására, így negatívan hat a megtermékenyülési képességre is (HOU ET AL., 2015). Az ivarérést szabályzó GPR54 receptor és a hipotalamikus kisspeptin hormon jelátvitel korai aktiválásával a ZEA a prepubertás nőtény patkányok ivarérését felgyorsítja, mely a gonadotropin-felszabadító hormon expresszióját és a méh tömegét is megnöveli (YANG ET AL., 2016). A ZEA teratogén hatását bizonyítva, patkányokon végzett vizsgálatok szerint, a vemhesség korai szakaszában a ZEA-expozíció lassítja a magzat fejlődését, és annak halálához is vezethet (ZHANG ET AL., 2014). KHOSROKHAVAR és mtsai két mellrák sejtvonalat, az ösztrogénreceptor pozitív T47D, és az ösztrogénreceptor negatív MDA-MB-231 sejtvonalat vizsgáltak ZEA és α -ZOL-kitettségek után. Az MDA-MB-231 sejtekre magasabb koncentrációban ($>10^{-5}$ M) citotoxikus hatást fejtek ki, viszont a T47D sejtek osztódását mindkét vegyület megnövelte 10^{-8} M koncentrációban, vagyis a hormonfüggő rákos elváltozások kialakításában szerepet játszanak (KHOSROKHAVAR ET AL., 2009).

A ZEA nemcsak az ösztrogénreceptorokhoz, hanem az emberben lévő szteroid és xenobiotikum érzékelő SXR receptorhoz is kötődni képes. Ez a receptor azért jelentős, mert szabályozza azoknak a géneknek az átíródását, melyek endobiotikumok és xenobiotikumok lebontásában vesznek részt. Ebbe a csoportba tartozik a citokróm P450 enzimesalád tagja a CYP3A4 is. Az SXR receptor szerepet játszik továbbá más enzimek úgy, mint a glükuronil transzferáz szabályozásában is. Hosszú távú kitettség esetén az SXR receptor affinitásnak köszönhetően csökken a glükuronidációs képesség, ezáltal tovább csökken a toxin és metabolitjainak az inaktiválása is (DING ET AL., 2006).

A ZEA további káros biológiai hatása a haematotoxicitás, vagyis vérmérgező tulajdonsága, melyet egyes vérben mért paraméterek (hematokrit, vörösvértest-térfogat) valamint májenzimek (alkalikus foszfataz, amonitranszferázok) értékeinek a megváltozásával bizonyítottak patkányok esetében. A tanulmányban a májenzimek megváltozása már közvetve utalt a májtoxicitásra is (MAAROUFI ET AL., 1996).

Genotoxikus és mutagén hatását illetően, kutatók marha limfocita sejtkultúra ZEA-val történő kezelését követően kromoszóma elváltozásokat tapasztaltak (LIOI ET AL., 2004).

Mindezekon felül egyes vizsgálatok alapján leírták májkárosító hatását és immunotoxicitását is (ZINEDINE ET AL., 2007).

3.3 Élelmiszer-és takarmánybiztonság

Az Élelmezési és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) és az Egészségügyi Világszervezet (WHO) által kiadott *Codex Alimentarius* definiálja az élelmiszerbiztonság fogalmát. Eszerint „Az élelmiszerbiztonság annak biztosítása, hogy az élelmiszer nem okoz egészségi ártalmat a fogyasztónál, ha azt a tervezett módon készítik el és fogyasztják el.”

Az élelmiszer-biztonságért hazánkban a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH), az Európai Unióban pedig az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) felel. Az élelmiszerbiztonság alapvető szabálya a „termőföldről az asztalig” („*from farm to table*”) elv, melynek célja, hogy az élelmiszergyártás lépéseit nyomon kövessék, egészen a környezeti állapottól kezdve a takarmány minőségén át az élelmiszer alapanyagok előállításáig, így biztosítva, hogy a fogyasztók asztalára ellenőrzött, minőségi, biztonságos élelmiszerek kerüljenek.

Az Európai Parlament és Tanács 178/2002/EK rendelete – mely az európai élelmiszerjog általános elveiről és követelményeiről, az EFSA létrehozásáról és az élelmiszer-biztonságra vonatkozó eljárások megállapításáról szól – definiálta az élelmiszer fogalmát. Eszerint élelmiszernek nevezünk „minden olyan feldolgozott, részben feldolgozott vagy feldolgozatlan anyagot vagy terméket, amelyet emberi fogyasztásra szánnak, illetve amelyet várhatóan emberek fogyasztanak el”. A rendelet szerint azok az élelmiszerek nem hozhatók forgalomba, melyek az egészségre ártalmasak vagy emberi fogyasztásra alkalmatlanok. Az emberi egészségre azok az élelmiszerek ártalmasak, melyek az ember egészségét rövidtávon veszélyeztetik, vagy a következő generációknál egészségkárosodást okoznak; halmozottan toxikus hatásúak vagy bizonyos fogyasztók élelmiszerrel szembeni érzékenységet mutatnak rájuk. A rendelet kiterjed a nem biztonságos takarmányokra is. Egy takarmányt akkor tekintünk nem biztonságosnak, ha a takarmány az állatok egészségére ártalmas, vagy az élelmiszertermelés céljára szánt állatokból készült termékek emberi fogyasztásra nem alkalmasak. Az élelmiszer-biztonsági szempontból kockázatot jelentő AFB1 és ZEA mikotoxinok élelmiszerekben és takarmányokban maximálisan megengedhető határértékeit a 2. mellékletben foglaltam össze. Az EFSA meghatározta továbbá a legmagasabb tolerálható napi beviteli (TDI = *Tolerable Daily Intake*) értéket, egy vegyületnek azt a mennyiségét, mely hosszú távú (akár egész életen át tartó) napi fogyasztás esetén sem okoz egészségkárosodást. A ZEA-ra meghatározott TDI érték 0,25 µg/testtömeg kg (EFSA, 2011). Az AFB1 esetében TDI értéket nem határoztak meg, hanem az ún. ALARA-elvet (*As Low As Reasonably Achievable*) tartják be, mely szerint rákkeltő anyagok esetében nincs elfogadható

szint, és a ma alkalmazott legjobb mezőgazdasági és gyártási technológiák mellett sem lehet teljes mértékben kiküszöbölni az aflatoxinok jelenlétét (EFSA, 2018).

3.4 Mikotoxin-mentesítés

A takarmányok és élelmiszerek mikotoxin-szennyezésének kiküszöbölése érdekében többféle technológia terjedt el. Léteznek olyanok, melyek a toxinogén gombákkal történő fertőzés megelőzését célozzák a szántóföldön vagy a tárolás során. Ez a jó mezőgazdasági gyakorlat (GAP = *Good Agricultural Practice*), mely magába foglalja a nitrogén műtrágyázást és a vetésforgó használatát, valamint a növényfajták váltogatását, mellyel a gombafertőzés kialakulását igyekeznek megelőzni (REID ET AL., 2001). A hagyományos technológiák mellett napjainkban széles körben terjedt el a gombaölő növényvédőszer használata, ill. a rezisztencia-nemesítés (BATA ET AL., 2001), valamint a genetikai eszközök fejlődésével a transzgenikus növények (pl. *chi26²* génnel módosított búza) létrehozása is (EISSA ET AL., 2017). Ám a megelőző gyakorlat sokszor nem elég, hiszen legtöbbször a fertőzés a tárolás során következik be. Ilyenkor a védekezés a sérült és penészes gabonaszemek kiválogatására, tisztítására, vagy olyan körülmények biztosítására fókuszál, mely a gombák megtelepedését igyekszik megelőzni a páratartalom és a hőmérséklet szabályozásával, illetve fertőzés esetén a gombaspórákat öli el gamma- vagy elektronsugárzással (CHELACK ET AL., 1991).

Amennyiben a prevenció ellenére mikotoxin-szennyezés áll fenn, cél a gabonaalapú takarmányok és élelmiszerek mikotoxin-mentesítése és az élelmiszer-biztonsági kockázat kiküszöbölése. Az Európai Bizottság mikotoxin-mentesítő ágensként azokat az anyagokat határozta meg, melyek úgy eliminálják a mikotoxinokat a takarmányokból, hogy csökkentik vagy megakadályozzák a toxin felszívódását, elősegítik annak kiválasztását vagy megváltoztatják hatását (386/2009 EK). Mikotoxin-mentesítő technológiák közül fizikai, kémiai és biológiai eljárások ismeretesek. Amikor fizikai mentesítésről beszélünk, a toxin valamilyen nagy molekulású hordozóhoz történő megkötését, adszorpcióját értjük, ami a toxin biológiai hozzáférhetőségének csökkenését eredményezi. A szén- vagy szilika-alapú, szerves vagy szervetlen hordozók a tápcsatornán végighaladva megakadályozzák a toxin felszívódását a szervezetben, így azok nem jutnak el a célszervekig. Azonban az adszorbensek használata – jó toxin-megkötő képességük ellenére – kockázattal is járhat, ugyanis ezek az ágensek sokszor nem szelektálnak, így a vitaminokkal és ásványi anyagokkal is interakcióba léphetnek (EFSA, 2009). Szakirodalomból ismeretes pl. AFB1 (EL-NEZAMI ET AL., 1998, HASKARD ET AL., 2001), illetve

² Árpából származó kitináz enzimtermelést kódoló gén rezisztenssé teszi a növényt a lisztharmatot okozó penésszel szemben

ZEА (EL-NEZAMI ET AL. 2002) *Lactobacillus* sejtek felszínéhez való kötődése, továbbá agyag és szilika-alapú hordozón való adszorpció is (VEKIRU ET AL., 2015).

A kémiai mikotoxin-mentesítés során, a gabonán szerves savakat (pl. propionsav), alkalikus anyagokat (pl. ammónia) és oxidálószeret (pl. hidrogén-peroxid, ózon) használnak, melyek kémiai reakciók során megváltoztatják a toxinok szerkezetét, így a hatásukat is. A propionsavra leginkább gombanövekedés-gátló hatása jellemző (PETTERSOEN ET AL., 1989). AFB1 ózonnal történő kezelése például azonnali toxin-degradációt (MAEBA ET AL., 1988), nátrium-diszulfid és hidrogén-peroxid együttes használata a toxin koncentrációjának 65%-os csökkenését eredményezte (ALTUG ET AL., 1990). Ám ezek az anyagok általában kevésbé hatékonyak, használatuk drága és veszélyekkel járhat, hiszen a kémiai kezelés alatt is megjelenhetnek káros, toxikus vegyületek illetve tápértékcsökkenés is bekövetkezhet (SCOTT, 1998).

Biológiai eljárások közé a biotranszformációs, -degradációs ill. -detoxifikációs módszerek tartoznak, melyek során baktériumok, gombák vagy azok enzimeik végzik a mikotoxinok átalakítását, lebontását vagy toxikus hatásait megszüntetését (EFSA, 2009). A biológiai átalakítási folyamatok hatékonysága az egyes mikroorganizmusok metabolikus képességétől függően változik. A szakirodalomból számos igen hatékony mikotoxinbontó képességgel rendelkező törzs ismert, melyeket a következő alfejezetekben részletesebben fogok bemutatni. A biológiai mikotoxin-mentesítés is járhat kockázattal, ugyanis a lebontási folyamatok sokszor nem ismertek, így az anyavegyületből kialakult átalakítási-, ill. bomlástermékeket és azok hatásait sem ismerjük. Az EFSA 2010-ben kiadott tanulmánya erre a problémára hívja fel a figyelmet, és kimondja, hogy a mentesítésre használt anyagok alkalmazása esetén, melyek a toxinok kémiai szerkezetét megváltoztatják, nem csak a mentesítő ágens, hanem a keletkezett metabolitok biológiai hatását is nyomon kell követni toxikológiai vizsgálatokkal (EFSA, 2010).

A FAO egy tanulmányában összefoglalja mindazon pontokat, melyeket az élelmiszerek és takarmányok mikotoxin-mentesítése során be kell tartani (SCOTT, 1998):

1. A mikotoxint el kell távolítani vagy inaktiválni;
2. nem keletkezhet, vagy nem maradhat a végtermékben vagy a szennyezett takarmánnyal etetett állatokból készült termékben toxikus, genotoxikus vagy mutagén maradékanyag;
3. meg kell őrizni a termék tápértékét és elfogadhatóságát;
4. nem változhatnak jelentősen a takarmányok és az élelmiszerek főbb technológiai tulajdonságai;

5. a gombaspórákat és micéliumokat el kell pusztítani, melyek kedvező körülmények között szaporodhatnak, és új toxinokat termelhetnek.

3.4.1 Aflatoxin B1 biodegradációja és biotranszformációja

Az AFB1 biológiai átalakítására képes eukarióta és prokarióta szervezeteket, valamint az általuk termelt és azonosított AFB1-bontásra képes enzimeket az 1., 2. és 3. táblázatban foglaltam össze. A táblázatokban a „Degradáció” elnevezésű oszlop a mikotoxinra (és metabolitjaira) vonatkozó lebontás mértékét és az esetlegesen megfigyelt egyéb mikroszervezetre jellemző tulajdonságokat jelöltem. A „toxikológia teszt” jelölésű oszlop foglalja össze, hogy a szerzők milyen módszerrel végezték a keletkezett átalakítási termékek által okozott biológiai hatás mérését és azok milyen eredményt mutattak.

Az AFB1 gombákkal végzett degradációjának vizsgálata során (1. táblázat) – bár a bontás mértéke meghaladta az 50%-ot, sőt sok esetben a 100%-ot is elérte – az átalakulási termékek között több kutató is toxikus (DETROY – HESSELTINE, 1969; MANN – RHEM, 1976; NAKAZATO ET AL., 1990) vagy az AFB1-hez hasonló fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező vegyületet (CIEGLER ET AL., 1966; COLE ET AL., 1972; DAS ET AL., 2015) azonosított. Néhány esetben pedig sem a metabolitok azonosítása, sem pedig azok biológiai hatásának a vizsgálata nem történt meg (HACKBART ET AL., 2014; KUSUMANINGTYAS ET AL., 2006; NOUT, 1989; SHANTHA, 1999; ZHANG ET AL., 2014). Mindezek okán a gombák hatékonyságát nem a toxinbontó képességük adja, hanem az a tulajdonságuk, hogy képesek az aflatoxinogén *Aspergillus* fajok szaporodását vagy bennük a toxin szintézisét gátolni (KUSUMANINGTYAS ET AL., 2006; NOUT, 1989; SHANTHA, 1999).

1. táblázat: Aflatoxin B1 átalakítására képes eukarióta szervezetek

Nemzetség	Degradáció	Toxikológiai teszt	Keletkezett metabolit	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	n.a.	n.a.	Fluoreszcens metabolit	CIEGER ET AL., 1966
<i>Penicillium raistrickii</i> NRRL 2038	n.a.	n.a.	AFB2	
<i>Aspergillus niger</i> ND-1	AFB1: 58%	n.a.	n.a.	ZHANG ET AL., 2014
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor ambiguus</i> , <i>Trichoderma viridae</i>	n.a.	n.a.	Aflatoxin R0 = aflatoxikol	MANN – RHEM, 1976
<i>Dactylum dendroides</i> , <i>Mucor griseocyanus</i> , <i>M. alternans</i> , <i>Absidia repens</i> , <i>Helminthosporium sativum</i>	AFB1: 50-60%	n.a.	Aflatoxin R0 = aflatoxikol	DETROY – HESELTEINE, 1969
<i>Neurospora sp.</i> <i>Rhizopus sp.</i>	AFB1: 60-84%, <i>Aspergillus flavus</i> növekedés-gátlása	n.a.	n.a.	NOUT, 1989
<i>Rhizopus oligosporus</i> F0216	Degradáció mellett, az AFB1 bioszintézis-gátlása	n.a.	n.a.	KUSUMANINGTYAS ET AL., 2006
<i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>R. arrhizus</i>	AFB1: 58%	n.a.	fluoreszcens metabolit: AFB2	COLE ET AL., 1972
<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Eurotium sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i>	n.a.	n.a.	aflatoxikol	NAKAZATO ET AL., 1990
<i>Alternaria sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Phoma sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Sporotrichum sp.</i>	AFB1: >80%, AFB1 bioszintézis-gátlása	n.a.	n.a.	SHANTHA, 1999
<i>Rhizopus oryzae</i> CCT7560 <i>Trichoderma reesi</i> QM9414	AFB1: 100%	n.a.	n.a.	HACKBART ET AL., 2014
<i>Pleurotus ostreatus</i> GHBBF10 és MTCC 142	AFB1: ~90 % <i>Aspergillus flavus</i> -szal való együttzaporítás esetén	n.a.	AFB2	DAS ET AL., 2015
n.a.	nincs adat			

Az eukarióta szervezetekkel ellentétben, a baktériumokra kevésbé jellemző a toxinogén penészgombák szaporodásának gátlása, hiszen eddig csak két *Bacillus* törzsről mutták ki ezt a tulajdonságot (PETCHONGKAEW ET AL., 2008). Ezzel szemben viszont baktériumok igen széles köréről bizonyították AFB1-átalakító képességét a szakirodalomban, sőt néhány vizsgált törzs az AFB1 degradációja mellett képes volt más aflatoxinok különböző mértékű bontására is (Gao et al., 2011; SANGARE ET AL., 2014). A biodegradáció mértékének meghatározása mellett viszont nem minden esetben ellenőrizék a folyamat biztonságosságát toxikológiai módszerekkel vagy az átalakulási termékek identifikálásával. A 2. táblázatban szereplő adatok alapján *Lactobacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* és *Streptococcus* nemzetségek tagjairól mutatták ki, hogy metabolikus aktivitásuk révén nem vagy kevésbé toxikus termékekké alakítják az AFB1-et (CIEGLER ET AL., 1966; CHEN ET AL., 2015; CSERHÁTI ET AL., 2013; ESHELLI ET AL., 2015; HARKAI ET AL., 2016; KRIFATON ET AL., 2011; SAMUEL ET AL., 2014).

2. táblázat: Aflatoxin B1 átalakítására képes prokarióta szervezetek

Nemzetség	Degradáció	Toxikológiai teszt	Keletkezett metabolit	Referencia
<i>Nocardia corynebacterioides</i> (régén <i>Flavobacterium</i> <i>auranthiacum</i> NRRL B-184)	AFB1: 70%	Kacsa-teszt: epe-toxicitás megszűnt	Veszélyes metabolitok nem jelentek meg	CIEGLER ET AL., 1966
<i>Nocardia asteroides</i> IFM 8 <i>Corynebacterium rubrum</i> ATCC 14898	AFB1: 100%	n.a.	Fluoreszcens metabolitok nem jelentek meg	ARAI ET AL., 1967
<i>Corynebacterium rubrum</i>	AFB1: 99%	n.a.	n.a.	MANN – RHEM, 1976
<i>Bacillus subtilis</i>	ANSB060 AFB1: 81%, AFM1: 60%, AFG1: 80%	n.a.	n.a.	GAO ET AL., 2011
	UTBSP1 95%	n.a.	Fluoreszcens metabolitok nem jelentek meg	FARZANEH ET AL., 2012
<i>Bacillus subtilis</i> <i>B. licheniformis</i>	AFB1: 70-80% <i>Aspergillus flavus</i> növekedés-gátlása	n.a.	n.a.	PETCHONGKAEW ET AL., 2008
<i>Stenotrophomonas sp.</i> NMO-3	AFB1: 85%	n.a.	n.a.	LIANG ET AL., 2008

Nemzetség	Degradáció	Toxikológiai teszt	Keletkezett metabolit	Referencia
<i>Stenotrophomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Brevundimonas</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Brachy bacterium</i> sp., <i>Cellulosimicrobium</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp.	AFB1: >70%	n.a.	n.a.	GUAN ET AL., 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N17-1	AFB1: >80% AFB2: >40% AFM1: >30%	n.a.	n.a.	SANGARE ET AL., 2014
<i>Pseudomonas putida</i> MTCC 1274 és 2445	AFB1: 90%	HeLa-sejtek: toxicitás csökkent	AFD1, D2, D3	SAMUEL ET AL., 2014
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>P. anguilliseptica</i> <i>Staphylococcus</i> sp.	AFB1: ~50 %	n.a.	n.a.	ADEBO ET AL., 2016A
<i>Mycobacterium</i> <i>fluoranthenorans</i> FA4 ^T	AFB1: 100%	n.a.	n.a.	HORMISH ET AL., 2004
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	AFB1: >95%	n.a.	n.a.	KONG ET AL., 2012
<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>R. pyridinivorans</i> , <i>R. rhodochrous</i> , <i>R. globerulus</i>	AFB1: >90%	SOS-Chromo teszt: genotoxicitás megszűnt	n.a.	KRIFATON ET AL., 2011 CSERHÁTI ET AL., 2013
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277, <i>Streptomyces lividans</i> TK24, <i>S. aureofaciens</i> ATCC 10762	AFB1: 86-100 %	n.a.	AFD1, AFD2, glikolízis és zsírsav-lebontás köztitermékei	ESHELLI ET AL., 2015
<i>Streptomyces cacaoi subsp.</i> <i>asoensis</i> K234	AFB1: 88%	SOS-Chromo teszt: genotoxicitás megszűnt	n.a.	HARKAI ET AL., 2016
<i>Streptomyces</i> spp.	AFB1: ~80 %	n.a.	n.a.	VERHEECKE ET AL., 2014
<i>Lactobacillus plantarum</i>	AFB1: 77%	n.a.	n.a.	KHANAFARI ET AL., 2007
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	AFB1: 100%	MTT-teszt: citotoxicitás megszűnt	AFB2, AFD2	CHEN ET AL., 2015
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> <i>Sporosarcia</i> sp. <i>Staphylococcus warneri</i>	AFB1: 47-61%	n.a.	n.a.	ADEBO ET AL., 2016B
n.a. nincs adat				

Az 1. és a 2. táblázatban bemutatott mikroorganizmusok által végzett AFB1 lebontást mélyrehatóbban vizsgálva, a törzsek extra- és/vagy intracelluláris kivonatainak bontási képességéről többen is beszámoltak (3. táblázat). Az élő sejtek hatékonyságát a sejtmentes kivonatok néhány esetben fokozni is tudták (ADEBO ET AL., 2016A; ADEBO ET AL., 2016B; SANGARE ET AL., 2014; SHANTHA, 1999). Toxikológiai vizsgálatokkal gombák esetében az *Armillariella*, *Phanerochaete* és *Trametes* nemzetségekről (ALBERTS ET AL., 2009; LIU ET AL., 2001; WANG ET AL., 2011), baktériumok esetében pedig a *Rhodococcus* és a *Bacillus* nemzetségekről (ADEBO ET AL., 2016A; ADEBO ET AL., 2017B; ALBERTS ET AL., 2006; RAKSHA RAO ET AL., 2017) mutatták ki, hogy sejtmentes kivonataik az AFB1 lebontását nem vagy kevésbé káros bomlástermékek megjelenése mellett végezték.

A kutatások során a bontást végző enzimeket csak néhány esetben sikerült identifikálni. A *Peniophora*, *Pleurotus*, *Trametes* eukarióta nemzetségek tagjai lakkáz enzimmal végzik az AFB1 átalakítását (ALBERTS ET AL., 2009; LOI ET AL., 2016). További oxidáz enzimsaládba tartozó enzimek közül az *Armillariella tabescens* E-20 törzsében található aflatoxin-oxidázt és a *Phanerochaete sordida* YK-624 törzs által termelt mangán-peroxidázt sikerült AFB1 toxin-bontó enzimként azonosítani (CAO ET AL., 2011; WANG ET AL., 2011). Prokarióták közül a *Myxococcus fulvus* ANSM068 törzse által termelt MADE (*myxobacteria aflatoxin degradation enzyme*) névvel ellátott enzim felelős a toxin bontásáért (ZHAO ET AL., 2010), aktinobaktériumok esetében pedig F₄₂₀H₂-függő reduktázok közül az FDR-A és FDR-B enzimsalád AFB1-bontó képességéről számoltak be (LAPALIKAR ET AL., 2012; TAYLOR ET AL., 2010).

3. táblázat: Aflatoxin B1 átalakítása enzimekkel vagy sejtmentes kivonatokkal

Nemzetség	Degradáció	Azonosított enzim	Toxikológiai teszt	Keletkezett metabolit	Referencia
<i>Phoma</i> sp.	Extracelluláris kivonat: 65%, intracelluláris kivonat: 90%	hőstabil enzimek	n.a.	n.a.	SHANTHA, 1999
<i>Armillariella tabescens</i> E-20	AFB1 furán-gyűrűjének hasítása	aflatoxin-detoxifizym multienzim (ADTZ), később oxidázként azonosították: aflatoxin-oxidáz (AFO)	Patkány-kísérlet: máj-toxicitás csökkenés Ames teszt: mutagenitás csökkenés csirke embrio-teszt: genotoxicitás csökkenés	AFB1-8,9-hidrodiol	LIU ET AL., 1998 LIU ET AL., 2001 CAO ET AL., 2011, WU ET AL., 2015
<i>Rhizopus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	Intracelluláris kivonatok	n.a.	n.a.	aflatoxikol	NAKAZATO ET AL., 1990
<i>Trametes versicolor</i>	AFB1: 67-87%	lakkáz	<i>Salmonella typhimurium</i> -teszt: mutagenitás csökkenés	n.a.	ALBERTS ET AL., 2009 ZEINVAND-LORESTANI ET AL., 2015
<i>Peniophora</i> sp. SCC0152, <i>Pleurotus ostreatus</i> St2-3	Sejtmentes kivonatok: 40%, koncentrált kivonatok 50-80%	lakkáz (multiréz-oxidáz enzimesalád)	n.a.	n.a.	ALBERTS ET AL., 2009
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Extracelluláris enzim az AFB1 lakton-gyűrűjét hasítja	90 kDa enzim	n.a.	Fluoreszcens metabolit nem keletkezett	MOTOMURA ET AL., 2003
	AFB1: 90%	Mangán-peroxidáz (42 kDa)	n.a.	n.a.	YEHIA ET AL., 2014
<i>Pleurotus pulmonarius</i> ACR-16	AFB1: 90% AFM1: 100%	Extracelluláris lakkáz + acetosziringon ³	n.a.	n.a.	LOI ET AL., 2016

³ Az acetosziringon egy redox mediátor, mely szubsztrátként szolgál a lakkáz enzimeknek, oxidációjuk és redukciójuk körkörösen zajlik, és intermediereként lehetővé teszi újabb vegyületek szubsztrátként való hasznosulását

Nemzetség	Degradáció	Azonosított enzim	Toxikológiai teszt	Keletkezett metabolit	Referencia
<i>Phanerochaete sordida</i> YK-624	AFB1: 86%	Extracelluláris mangán-peroxidáz	Umu teszt: mutagenitás csökkenése	AFB1-8,9- epoxid → AFB1-8,9- dihidrodol	WANG ET AL., 2011
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 14303	Intracelluláris kivonat: 100% konstitutív extracelluláris kivonat: 70%	n.a.	Ames teszt: mutagenitás csökkenése	n.a.	TENIOLA ET AL., 2005 ALBERTS ET AL., 2006
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 35-3	Konstitutív extracelluláris kivonat: 85%	n.a.	n.a.	n.a.	GUAN ET AL., 2008
<i>Bacillus subtilis</i> ANSB060 és UTBSP1	Konstitutív extracelluláris kivonat: 79%	n.a.	n.a.	n.a.	GAO ET AL., 2011
	Konstitutív extracelluláris kivonat: 78%	n.a.	n.a.	Fluoreszcens metabolit nem keletkezett	FARZANEH ET AL., 2012
<i>Bacillus licheniformis</i> CFR1	Extracelluláris kivonat: 94%	n.a.	Ames tesztben a mutagén hatás megszűnt	n.a.	RAKSHA RAO ET AL., 2017
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N17-1	Extracelluláris kivonat: 72%, Cu ²⁺ hozzáadása: 94%	n.a.	n.a.	Fluoreszcens metabolit nem keletkezett	SANGARE ET AL., 2014
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> VGF1, <i>P. fluorescens</i> , <i>Staphylococcus sp</i> VGF2.	Intracelluláris kivonatok: 100% proteáz inhibitor jelenlétében	n.a.	Humán limfocita-vizsgálat: citotoxicitás csökkenése	n.a.	ADEBO ET AL., 2016A
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> <i>Sporosarchia sp.</i> <i>Staphylococcus warneri</i>	Intracelluláris kivonatok: 100% proteáz inhibitor jelenlétében	n.a.	Humán limfocita-vizsgálat: citotoxicitás csökkenése	n.a.	ADEBO ET AL., 2016B

Nemzetség	Degradáció	Azonosított enzim	Toxikológiai teszt	Keletkezett metabolit	Referencia
<i>Myxococcus fulvus</i> ANSM068	Extracelluláris kivonat: >70% AFB1, >60% G1 és M1 lebontás, tisztított enzimmel >90% lebontás	MADE (myxobacteria aflatoxin degradation enzyme)	n.a.	n.a.	ZHAO ET AL., 2010
<i>Mycobacterium smegmatis</i> m ^c 2155	100% degradáció, aflatoxinok telítetlen észterkötését hidrolizálják	F ₄₂₀ H ₂ -függő reduktázok (FDR-A , FDR-B)	n.a.	n.a.	TAYLOR ET AL., 2010
<i>Franki alni</i> , <i>Janibacter sp.</i> , <i>Marine actinobacterium</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. vanbaalenii</i> , <i>Nocardia farcinica</i> , <i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>Rhodococcus jostii</i> , <i>R. erythropolis</i>	F ₄₂₀ H ₂ -függő reduktázokat termelnek, FDR-A enzimeket <i>Escherichia coli</i> -ba klónozva bontják az AFB1 és G1 toxinokat	F ₄₂₀ H ₂ -függő reduktázok (FDR-A , FDR-B)	n.a.	n.a.	LAPALIKAR ET AL., 2012
n.a.	nincs adat				

3.4.2 Zearalenon biodegradációja és biotranszformációja

A ZEA biológiai átalakítására képes eukarióta és prokarióta szervezeteket, valamint az általuk termelt és azonosított ZEA-bontásra képes enzimeket a 4. 5. és 6. táblázatban foglaltam össze. A táblázat fejlécei megegyeznek a 3.4.1. alfejezetben leírtakkal.

A ZEA eukariótákkal végzett lebontása során (4. táblázat) a toxin és metabolitjai által okozott ösztrogénhatást a legtöbb esetben ellenőrizték, és a nagymértékű degradáció mellett a kutatók kimutatták a hormonhatás csökkenését illetve megszűnését (EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1987; EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1988A, KAKEYA ET AL., 2002; MOLNAR ET AL., 2004; JARD ET AL., 2010). A ZEA hormonhatású metabolitjai mellett új metabolitokat is azonosítottak, úgymint a toxin glükózid-, éter-, hidroxid- és szulfát-származékait (EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1987; EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1988A; EL-SHARKAWY ET AL., 1991; JARD ET AL., 2010; KAKEYA ET AL., 2002).

4. táblázat: Zearalenon átalakítására képes eukarióta szervezetek

Nemzetség	Degradáció	Toxikológiai teszt	Keletkező metabolit	Referencia
<i>Thamnidium elegans</i> , <i>Mucor bainieri</i>	n.a.	Patkány-méh ösztrogénreceptor- kötődés: nem kötődik	ZEA-4-O- glükózid	EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1987 EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1988A
<i>Cunninghamella bainieri</i> ATCC 9244B	n.a.	Patkány-méh ösztrogénreceptor- kötődés: nem kötődik	ZEA-2- (di)metil-éter	EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1988A
<i>Clonostachys rosea</i> (régén <i>Gliocladium</i> <i>roseum</i>)	Lakton-gyűrű nyitása	n.a.	n.a.	EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1988B
	Lakton-gyűrű nyitása	MCF-7 sejtvonal: ösztrogénhatás megszűnt	1-(3,5- dihidroxi- fenil)-10- hidroxi-1E- undekán-6-on	KAKEYA ET AL., 2002
<i>Rhizopus arrhizus</i> IFO- 6155	n.a.	n.a.	ZEA-4-O- szulfát	EL-SHARKAWY ET AL., 1991
<i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>R. microsporus</i> , <i>R. homotollicus</i>	ZEA: 100%	n.a.	n.a.	VARGA ET AL., 2005
<i>Trichosporon</i> <i>mycotoxinivorans</i>	ZEA: 100%	MCF-sejtek: ösztrogénhatás megszűnt	α - és β -ZOL nem keletkezett	MOLNAR ET AL., 2004
<i>Aspergillus niger</i>	ZEA: 70-90%	MCF-sejtek: ösztrogénhatás csökkenése	ZEA-4-O- szulfát	JARD ET AL., 2010
<i>Aspergillus niger</i> FS-10	ZEA: 90% degradáció mellett adszorpció a micéliumokon	Patkányok-kísérlet: máj- és a vese- toxicitás csökkenése	n.a.	SUN ET AL., 2014
<i>Yarrowia lipolytica</i> NRRL Y-1094	80% ZEA-bontás, és a <i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i> szaporodás-gátlása	n.a.	n.a.	ELAASSER ET AL., 2017

n.a. nincs adat

Számos baktériumtörzs ZEA-bontó képességét vizsgálták idáig a szakirodalomban, ám az újabb kutatási eredmények, melyek kimutatják a toxin nagymértékű lebontását, sem térnek ki minden esetben a metabolitok káros hatásának vizsgálatára (5. táblázat). Néhány esetben a toxin ösztrogénhatású metabolitjainak megjelenést ellenőrizték (ALTALHI, 2007; CHO ET AL., 2010), de a tanszékünkön zajlott korábbi vizsgálatok mellett (CSERHÁTI ET AL., 2013; HARKAI ET AL., 2016;

KRIFATON ET AL., 2013) csak egy esetben vizsgálták a bomlástermékek ösztrogén-receptorokhoz való kötődését. Ez a viszonylag régi tanulmány kimutatta a hormonhatással nem rendelkező 8-hidroxizearalenon megjelenését (EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1988A).

5. táblázat: Zearalenon átalakítására képes prokarióta szervezetek

Nemzetség	Degradáció	Toxikológiai teszt	Keletkező metabolit	Referencia
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	n.a.	n.a.	n.a.	WESTLAKE ET AL., 1987
<i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Achromobacter sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i>	A törzsek individuálisan nem, csak konzorciumban képesek a ZEA lebontására	n.a.	n.a.	MEGHARAJ ET AL., 1997
<i>Pseudomonas putida</i> ZEA-1	ZEA: 100%	<i>Artemia salina</i> teszt: citotoxicitás csökkenése	α - és β -ZOL nem keletkezett	ALTALHI, 2007
<i>Pseudomonas alcaliphilia</i> TH-C1, <i>P. plecoglossicada</i> TH-L1	ZEA: 68%, 57 %	n.a.	n.a.	TAN ET AL., 2014
<i>Pseudomonas otitidis</i> TH-N1	ZEA: 60%	n.a.	n.a.	TAN ET AL., 2015
<i>Bacillus subtilis</i>	ZEA: 99%	n.a.	α - és β -ZOL nem keletkezett	CHO ET AL., 2010
<i>Bacillus licheniformis</i> CK1	98% degradáció, erős xilanáz-, celluláz- és proteáz- aktivitás	n.a.	n.a.	YI ET AL., 2011
<i>B. pumilus</i> ES-21	ZEA: 96%	n.a.	1-(3,5- dihidroxifenil)- 60-hidroxi-l0- undecén-l00-on	WANG ET AL., 2017
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	ZEA: >70%	BLYES teszt: ösztrogénhatás megszűnése	n.a.	CSERHÁTI ET AL., 2013 KRIFATON ET AL., 2013
<i>Streptomyces rimosus</i> NRRL-2234	n.a.	Patkány-méh ösztrogénreceptor- kötődés: nem kötődik	8- hidroxizearalenon	EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1988A
<i>Streptomyces spp.</i>	ZEA: >90%	n.a.	Fluoreszcens metabolit nem jelent meg	JARD ET AL., 2010
<i>Streptomyces rimosus</i> K145, K189	ZEA: ~100 %	BLYES teszt: ösztrogénhatás megszűnése	n.a.	HARKAI ET AL., 2016

n.a. nincs adat

Az AFB1 toxintól eltérően, a ZEA enzimatis leontásáról kevesebb tanulmány készült (6. táblázat). Sejtmentes kivonatok néhány esetben az alacsonyabb bontási hatékonyság miatt alulmaradtak az élő sejtek által végzett bontás mértékéhez képest (CHO ET AL., 2010; ELAASSER ET AL., 2017). A nagymértékű ZEA-bontást végző intra- és extracelluláris kivonatokban a folyamat során amiláz, enoláz, reduktáz, citokróm, proteináz és peroxiredoxin fehérjék aktiválódtak. Az adatok alapján a *Trametes versicolor* taplófajból nemcsak AFB1 (ALBERTS ET AL., 2009), hanem ZEA bontásra képes lakkáz enzimet (BANU ET AL., 2013) is, valamint *Clonostachys rosea* IFO 7063 törzséből egy 30 kDa méretű laktonohidroláz enzimet sikerült azonosítani (TAKAHASHI-ANDO ET AL., 2002; UTEMARK – KARLOVSKI, 2007).

6. táblázat: Zearalenon átalakítása enzimekkel vagy sejtmentes kivonatokkal

Nemzetség	Degradáció	Azonosított enzim	Toxikológiai teszt	Keletkezett metabolit	Referencia
<i>Clonostachys rosea</i> IFO 7063	Laktongyűrű hidrolízise, majd a termék dekarboxilációja	Laktonohidroláz (30kDa)	n.a.	n.a.	TAKAHASHI-ANDO ET AL., 2002 UTEMARK – KARLOVSKY, 2007
<i>Trametes versicolor</i>	ZEA: 80%	Lakkáz	n.a.	n.a.	BANU ET AL., 2013
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Extracelluláris kivonat: 75%	n.a.	n.a.	n.a.	ELAASSER ET AL., 2017
<i>Aspergillus niger</i> FS-10	Extracelluláris kivonat: 68% Az enzim immobilizálása növelte a degradációt (75-90%) és az enzim aktivitásának idejét	Glükoamiláz, Pepropglükoamiláz, Ismeretlen fehérje	Patkányok: máj- és a vese-toxicitás csökkenése MTT-teszt: citotoxicitás csökkenése	ZEN-A, ZEN-B	SUN ET AL., 2014 HE ET AL., 2015 HE ET AL., 2016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ZEA-bontása mellett, sejteken történő adszorpció is kialakult	enoláz, NADH-citokróm b5 reduktáz, peroxiredoxin	n.a.	n.a.	ZHANG ET AL., 2016
<i>Pseudomonas putida</i> ZEA-1 törzs, rekombináns <i>E. coli</i>	AFB1: 100 %	n.a.	<i>Artemia salina</i> teszt: toxicitást csökkenése	n.a.	ALTALHI – EL-DEEB, 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	Intracelluláris kivonat: 55%	n.a.	n.a.	n.a.	CHO ET AL., 2010
<i>Bacillus subtilis</i> 168, <i>B. natto</i> CICC 24640	Extracelluláris kivonat közel 100%	metalloproteináz	n.a.	α -ZOL, α -ZAL nem jelent meg	TINYIRO ET AL., 2011
<i>Acinetobacter sp.</i> SM04	Extracelluláris kivonat: 100%	peroxiredoxin, citokróm, fimbriális fehérjék	MCF-7 sejtek: ösztrogénhatás csökkenése	ZEN-1, ZEN-2	YU ET AL., 2011A YU ET AL., 2011B

n.a. nincs adat

3.4.3 Biodegradációra alkalmazott baktérium nemzetségek jellemzése

Az előző fejezetekből jól látszik, hogy az AFB1 és a ZEA lebontására számos eukarióta és prokarióta szervezet képes, mely lebontási folyamatok enzimátikus hátterét is többen mélyrehatóbban vizsgálták, viszont bontásért felelős enzimeket ezidáig csak kis számban azonosítottak, sőt a veszélyes bomlástermékek vizsgálata nem minden esetben történt meg. Ahhoz, hogy toxinok biodegradációjára képes mikroszervezeteket és azok enzimjeit a takarmánybiztonság területén gyakorlati célokra használhassuk, könnyen szaporítható, biztonságos törzsek kiválasztása a cél. Doktori munkám során az AFB1 és ZEA toxinok biodegradációjára a következő nemzetségekhez tartozó baktériumtörzseket alkalmaztam.

3.4.3.1 *Rhodococcus* nemzetség

A *Rhodococcus* nemzetség tagjai Gram-pozitív, aerob nocardioform aktinomicéták, melyek változatos környezeti körülmények között fellelhetők (FINNERTY, 1992). Ez a heterogén csoport kiválóan alkalmas szerves és szervetlen vegyületek bontására. A biodegradációs képességük különösen nagy genomjuknak köszönhető, mely meghaladhatja a 9,7 Mb-t is (PETRUSMA, 2011). Rendkívül sokféle katabolikus génnel rendelkeznek, melyek különböző lebontást végző enzimek termeléséért felelősek (monooxygenázok, dioxigenázok, citokróm P450 enzimcsalád). Jellegzetességük, hogy katabolikus génjeik nemcsak kromoszómán, hanem lineáris és cirkuláris plazmidokon vannak kódolva. További jellemzőjük a különböző klaszterben elhelyezkedő gének együttes szabályozása. Degradációs hatékonyságukat tovább fokozza felületaktív anyag termelésük is (LARKIN ET AL., 2005). Sejtfaluk sajátos szerkezete – mikolsav tartalma miatt – segíti a hidrofób anyagok könnyebb bekerülését a sejtbe (BELL ET AL., 1998). Nemcsak biokémiai tulajdonságuk, hanem kiváló ellenálló képességük is – mely segítségével adaptálódnak a változó éghajlati körülményekhez – hatékonyá teszik őket különféle szennyezőanyagok lebontására (LARKIN ET AL., 2005).

Képesek lebontani többek között rövid- és hosszúláncú alkánokat (LIU ET AL., 2012, TÁNCICS ET AL., 2015), heterociklikus és policiklikus aromás szénhidrogéneket (SONG ET AL., 2011), ásványolajat (BINAZADEH ET AL., 2009), szteroidokat (HOMKLIN ET AL., 2012) és fenolokat (REHFUSS – URBAN, 2005) is. A nemzetség tagjai jelentős mértékben képesek a mikotoxinok bontására, mely tulajdonságról már a 2., 3., 5., és 6. táblázatban is említést tettem (ALBERTS ET AL., 2005; CSERHÁTI ET AL., 2013; ESHELLI ET AL., 2015; GUAN ET AL., 2008; KONG ET AL., 2012; KRIFATON ET AL., 2011; KRIFATON ET AL., 2013; LAPALIKAR ET AL., 2012; TENIOLA ET AL., 2006).

Hatékony aromás vegyületeket bontó képességüket a gyűrű felhasítását végző dioxigenázok vezérlik, nitrilek bontását pedig nitriláz és nitril-hidratáz enzimjeik segítségével

végzik (MARTÍNKOVÁ ET AL., 2009). Szteroidgyűrű bontását a ketoszteroid hidroxiláz (KSH), és a ketoszteroid dehidrogenáz (KSTD) valamint a hidroxiszteroid dehidrogenázok (HSD) segítik elő (PETRUSMA, 2011; KISIELA, 2012).

3.4.3.2 *Gordonia* nemzetség

A *Gordonia* nemzetség tagjai aerob, Gram-pozitív aktinomicéták. A környezetben széles körben elterjedtek, képesek növényvédőszer (triazinok, klórpírifosz) bontására (COOK – HÜTTER, 1986; ABRAHAM ET AL., 2013). A triazinok bontása az s-triazin hidroláz által végzett deklorinizációs és deaminációs folyamatokon keresztül megy végbe (COOK – HÜTTER, 1986). Az említett vegyületek mellett jellemző rájuk a kőolajszármazékokban megtalálható aromás vegyületek (KIM ET AL., 2000), üzemanyag-adalékként használt metil- és etil-terc-butil-éterek (HERNANDEZ-PEREZ ET AL., 2001), valamint természetes és szintetikus gumik bontása (LINOS ET AL., 2000). Hosszú oldallánccal rendelkező szteroid vegyületek (koleszterin, ergoszterin) lebontására képes típus törzs – *G. cholesterolivorans* – mellett a nemzetség több tagjáról is bebizonyosodott ez a degradációs képesség, mely koleszterol oxidáz enzimek által vezérelt folyamat (DRZYGA ET AL., 2011). Vízben nem, ill. nehezen oldható vegyületek bontását felületaktív anyag termelő képességük teszi lehetővé, mely növeli a szennyezőanyagok biológiai hozzáférhetőségét, valamint nagyobb felületet biztosít a mikroorganizmusoknak. Számos más aktinomicétához hasonlóan sejtfaluk mikolsavat tartalmaz, ami hozzájárul a szennyezők sejtfalhoz kötődéséhez (ARENSKÖTTER ET AL., 2004).

3.4.3.3 *Streptomyces* nemzetség

A *Streptomyces* nemzetség Gram-pozitív, fonalasan növekvő, spórázó fajokat tartalmaz, melyekre igen magas fokú heterogenitás jellemző. Megtalálhatók vízi környezetben is, de leginkább talajlakóként tartják őket számon, melyek részt vesznek a talaj mineralizálásában. Exoenzim termelésüknek köszönhetően képesek a pektin, kitin, keratin, cellulóz, latex bontására, valamint sziderofor termelésük révén vas vegyületek hasznosítására is (CHATER ET AL., 2010). A *Streptomyces* nemzetség egyéb szerves vegyületeket bontó képességét többen bizonyították. Egy *Streptomyces* sp. M7 jelű törzs képes volt lindán növényvédőszerrel szennyezett talaj szennyezettségét 56%-kal csökkenteni (BENIMELI ET AL., 2008). Egy poliaromás szénhidrogének – úgy, mint antracén, fluorén, fenantrén, pirén – bontására képes, PAH-13 jelzésű törzs a *Streptomyces rochei* fajhoz tartozik (CHAUDHARY ET AL., 2011). A *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 törzs által termelt lakkáz enzim képes a textiliparban felhasznált, rákkeltő azo-festéket degradálni és káros hatását csökkenteni (MOYA ET AL., 2010). A nemzetség mikotoxin-bontásáról is beszámoltak, melyet a 2., 3. és 5. táblázatban mutattam be (ESHELLI ET AL., 2015;

HARKAI ET AL., 2016; JARD ET AL., 2011; LAPALIKAR ET AL., 2012). A nemzetség tagjai a toxinok lebontásán túl képesek a toxinogén penészgombák (*Fusarium culmorum*) szaporodását is gátolni (YEKKOUR ET AL., 2012). Gyakorlati jelentőségük viszont ezeknek a fajoknak leginkább az antibiotikum-termelésben van, így kiemelkedő szerepet játszanak a humán- és állatgyógyászatban. A ma használt antibiotikumok közül több mint 50 származik *Streptomyces* fajoktól (MADIGAN ET AL., 2000).

3.4.3.4 *Pseudomonas* nemzetség

A *Pseudomonas* nemzetség a talajban élő mikroorganizmusok közül az egyik legnagyobb számban előforduló csoport, melybe aerob Gram-negatív baktériumok tartoznak. A nemzetség tagjai nagy hatékonysággal képesek különböző szerves vegyületek, köztük alifás, aromás és poliaromás szénhidrogének biodegradációjára. Petrokémiai iparterületről izolált *P. aeruginosa* és *P. citronellolis* fajokhoz tartozó törzsek képesek voltak a három aromás gyűrűből álló antracén bontására (JACQUES ET AL., 2005). A *P. aeruginosa* fajról bizonyították 12-33 szénatomszámú alkánokat tartalmazó nyersolaj- (PASUMARTHI ET AL., 2013), dibenzo-furán és dioxin- (ISHIGURO ET AL., 2010), valamint glifozát- és 2,4-D-bontó (CHELOUFI ET AL., 2017) képességét is. Mikotoxinbontó képességük számos tanulmányban bizonyításra került, melyeket a 2., 3., 5. és 6. táblázatban gyűjtöttem össze (ADEBO ET AL., 2016; ALTALHI, 2007; ALTALHI – EL-DEEB, 2009; SAMUEL ET AL., 2014; SANGARE ET AL., 2014; TAN ET AL., 2014; TAN ET AL., 2015). Effektív aromás vegyületet bontó képességüket az alábbi fontos genetikai tulajdonságoknak köszönhetik:

- A xenobiotikumok lebontása számos perifériális útvonalon zajlik, melynek során a bonyolultabb vegyületeket egyszerűbb köztitermékekké bontják, melyek aztán bekapcsolódnak a központi metabolizmusukba.
- A nemzetség tagjai könnyen alkalmazkodnak a külső stresszhez, amire válaszul megváltoztatják a lipid metabolizmusukat.
- Hatékony efflux pumpával is rendelkeznek, melyen keresztül könnyen bejutnak a vegyületek, amit szén- és energiaforrásként hasznosítani tudnak.

További jellemző tulajdonságaik a biofilmképzés valamint a sejtek közötti kommunikáció. Ráadásul a katabolikus és a transzport gének, valamint az efflux-pumpát és a kemotaxist szabályzó gének egy génklaszteren való előfordulása is megjelenik a nemzetségen belül (NOGALES ET AL., 2017).

3.5 Mikotoxinok vizsgálatára alkalmas módszerek

A mikotoxinok minőségi és mennyiségi mérésére számos módszert dolgoztak ki. Mivel ezek az anyagok már kis koncentrációban veszélyt jelenthetnek, ezért a különböző módszerek

érzékenysége rendkívül fontos. Kimutatásukra többnyire nagyműszeres analitikai módszereket fejlesztettek ki, melyek a vegyületek eltérő kémiai szerkezetének köszönhetően határozzák meg azokat. Műszerigényüknek köszönhetően ezek a technológiák drágák és időigényesek is. Elterjedtek biológiai módszerek is, melyek kisebb költségigényűek, viszont nem a pontos vegyületet, hanem annak biológiai hatását mutatják ki. A módszereket és a köztük lévő különbségeket részletesebben a következő alfejezetekben mutatom be.

3.5.1 Analitikai módszerek

3.5.1.1 Kémiai analitika

A toxinok minőségi elválasztására elsősorban kromatográfiás módszereket használnak, melyek lehetnek vékonyréteg kromatográfia, gázkromatográfia, magasnyomású folyadékkromatográfia. Közülük a leghatékonyabb pontosságának és megbízhatóságának köszönhetően a magasnyomású folyadékkromatográfia (HPLC = High-Performance Liquid Chromatography). A kromatográfiás eljárások során két fázis, az ún. mozgó- és állófázis játszik szerepet. A folyadékminta a mozgófázisba kerülve eljut a kromatográfiás oszlopon kötött szemcsés hordozóhoz. Itt történik meg az elválasztás, ugyanis az anyagok különböző oldódási sebessége miatt a jobban oldódó anyagok hosszabb, míg a kevésbé oldódóak rövidebb idő alatt jutnak el az oszlop mögött lévő detektorba. Ez az elválasztási vagy retenciós időbeli különbség biztosítja az egyes anyagok minőségi elválasztását. A mozgófázisban nemcsak a minta vándorol, hanem szükség van referencia-mérésre is, így a mérés két részre oszlik, az ismert és az ismeretlen anyag meghatározására. A detektálás a HPLC esetében kétféle módon történhet. Az egyik mérési mód a sűrűség- vagy törésmutató, mely a mintával történő érintkezés miatt bekövetkező tulajdonságváltozás detektálása a mozgófázisban. A másik típus a minta tulajdonságát vizsgálja, mely lehet UV elnyelési képesség vagy fluoreszcencia. A minta meghatározása a kromatogramon történik, mely az idő függvényében ábrázolja a detektor jelét. Az egyes csúcsok az anyag minőségét, a görbe alatti terület pedig a mennyiségét határozzák meg (KRISTÓF, 2000). A HPLC készüléket nemcsak detektorral, hanem tömegspektrométerrel is összekapcsolhatják, mely az identifikálást a molekula ionizálását követően határozza meg a mintában lévő molekulák tömeg-töltés aránya alapján. Ez a módszer a mennyiségi meghatározáson túl, lehetővé teszi az ismeretlen anyagok azonosítását szerkezeti tulajdonságaikból adódóan (NATHANAIL ET AL., 2015).

A kromatográfiás módszerek előnye a pontosság, hátrányuk pedig a drágaság, az időigényesség, valamint, hogy kezelésük megfelelő szaktudást igényel.

3.5.1.2 Immunanalitikai módszerek

A mikotoxinok mennyiségi meghatározására alkalmazott másik módszer, a kisebb költségigényű és gyorsabb, mikrotiter lemezen végezhető enzim-kapcsolt immunosorbens esszé (ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Többféle elven működő ELISA mérés létezik; eszerint megkülönböztetünk direkt, kompetitív direkt és kompetitív indirekt módszereket. A mikotoxinok meghatározása általában kompetitív direkt ELISA tesztben történik. Az immunanalitika az antitestek toxinfelismerő tulajdonságán alapul, hiszen a toxinok háromdimenziós szerkezete más és más, így minden toxin mérésére speciális antitesteket fejlesztettek ki. A kompetitív teszt a mintában található – az antigén szerepét betöltő – toxin és a toxin-enzim konjugátum versenyén alapul, ugyanis azoknak a lemez falához kötött antitestekhez kell kötődniük, melyek száma limitált. A toxin-enzim konjugátum, vagy más néven „jelölt toxin” felelős a színreakcióért, ugyanis az alkalmazott enzimhez a szubsztrát hozzáadását követően színreakció történik. Minél nagyobb a minta toxinkoncentrációja, annál több helyet foglal el a toxin a konjugátum előtt, így a szubsztrát hozzáadását követően gyengébb színreakció következik be. A színintenzitás optikai úton mérhető, és abszorbancia értékkel fejezhető ki. Az ELISA a kromatográfiás módszerekkel szemben gyorsabb, olcsóbb és egyszerűbben alkalmazható, viszont hátránya, hogy keresztreakciók vagy mátrixhatás következhet be. A toxin szerkezetéhez nagyon hasonló molekulák is megkötődhetnek az antitesteken, vagy a mátrixban található anyagok reakcióba léphetnek a konjugátummal, így befolyásolva a színreakciót. Ennek kiküszöbölésére megfelelő kontroll és ismert mátrix alkalmazandó. Az ELISA tesztnek nemcsak mikrotiter-alapú változatai ismertek, hanem már elterjedtek hordozható változataik is, ahol az antitestek tesztsíkon vannak megkötve. A csíkot a mintába helyezve megtörténik az immunreakció, majd egy hordozható eszköz használatával gyors eredményt kapunk (PITTET, 2005).

3.5.2 Biológiai módszerek

A biológiai hatásmérő tesztek a környezetbe került természetes vagy mesterséges anyagok élő szervezetre kifejtett káros hatásával, azaz toxicitásával foglalkozik (GRUIZ ET AL., 2001). Ezeknek a biológiai tesztrendszereknek a célja, hogy különböző szennyezőanyagok egy adott szervezetre való hatásának vizsgálatával az eredményeket az ökológiai rendszerekre vetíthessük (CALOW, 1993), így általuk nem konkrét anyagokat azonosíthatunk, hanem ismert és ismeretlen szennyezőanyagok környezeti hatásait ismerhetjük meg. Egy egyed vizsgálata során annak élettani változásait vizsgálhatjuk, másik esetben pedig az egész populációban bekövetkező változásokra (szaporodás, egyedsűrűség) következtethetünk. A biotesztek tervezése során elsődleges szempont a tesztrendszer kiválasztása, ugyanis annak laboratóriumi körülmények között fenntarthatónak és megfelelően érzékenynek kell lennie, hogy következtetni lehessen

magasabb szerveződési szintekre, esetleg az egész ökoszisztéma érzékenységére is, tehát elsősorban a vizsgálati célt, valamint a vizsgálandó szennyezőanyagot és annak koncentrációját kell figyelembe venni (GRUIZ ET AL., 2001).

A biológiai hatásmérésen alapuló tesztek lehetnek akut, néhány óra alatt lezajló, illetve krónikus, a tesztorganizmus egész élettartama vagy reprodukciós ciklusa(i) alatt zajló tesztek. Ezek a módszerek különböző toxicitási dózisokat, illetve koncentrációkat mérnek, különböző végpontokat vizsgálnak, melyeket a 3. mellékletben foglaltam össze. A dózis azt a toxikológia által alkalmazott konkrét anyagmennyiséget jelöli, melyet egy organizmus különböző expozíciós útvonalakon felvesz. A biológiai hatásmérés esetében, amikor a pontos dózis nem ismert, környezeti koncentrációt alkalmazunk, mivel a környezetben jelenlevő szennyezés során nem tudjuk, hogy mely anyagok milyen arányban, mekkora mennyiségben vannak jelen, illetve azokból ténylegesen milyen mennyiség jut be a tesztorganizmusba. A kapott eredmények függvényében rajzolhatjuk fel a szigmoid koncentráció-válasz görbét, mely megmutatja a növekvő koncentráció által kiváltott hatást. A négy alapvető szempont, melyet a biológiai hatáselemző módszerektől elvárhatunk: I.) reprodukálhatóság, II.) érzékenység, III.) megbízhatóság, IV.) környezeti realizmus (GRUIZ ET AL., 2001).

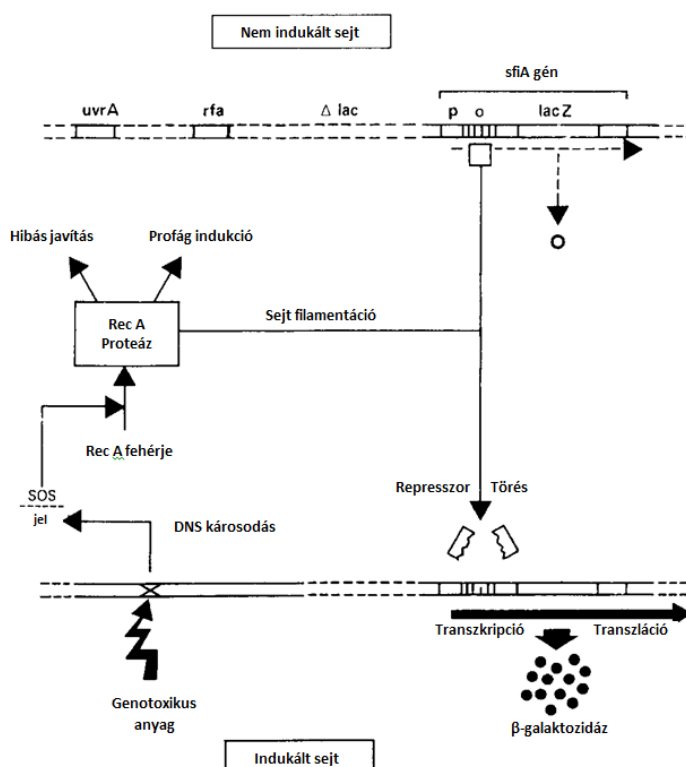
A biológiai tesztrendszerek kiválóan alkalmasak a mintában lévő vegyületek összegzett biológiai hatásának vizsgálatára, ugyanis általuk olyan tényezőkre is fény derülhet, melyek az analitikai módszerek számára rejtve maradnak, mivel a vizsgált paraméterek között nem szerepelnek. A biológiai hatásmérő és kémiai analitikai vizsgálatok együttesen alkalmasak annak a megállapítására, hogy mekkora kockázattal, milyen változás bekövetkeztével és milyen hatással jár az élő szervezetekre a szennyezőanyagok felszabadulása.

Az alacsony szerveződési szinten lévő tesztorganizmust alkalmazó biológiai hatáselemző módszerek előnye, hogy nem vetnek fel etikai problémát, mert a tesztorganizmusok mikroorganizmusok, növények, vagy sejtkultúrák. A vizsgálati módszerekre jellemző, hogy minél bonyolultabb a módszer, annál nagyobb a környezeti realizmusa, de ezzel együtt egyre inkább nő a hely- és időigénye, valamint a költsége és romlik a reprodukálhatósága. A biológiai tesztrendszerek hátránya, hogy sokszor a laborban kapott eredmények nem vonatkoztathatók ténylegesen a környezetben lejátszódó folyamatokra, így alkalmazásuk csak az analitikai módszerekkel együttesen vezetnek célhoz (CALOW, 1993).

3.5.2.1 SOS-Chromo teszt

Az SOS-Chromo teszt (Environmental Bio-Detection Products Inc., Kanada) genotoxicitás mérésére alkalmas, kolorimetrián alapuló módszer, mely tesztorganizmusként az

Escherichia coli K12 vad típusú törzsének PQ37 jelzésű mutáns törzsét alkalmazza. A teszt az *E. coli* PQ37 törzsében bekövetkező SOS válasz mechanizmuson alapul, mely a DNS-károsítás hatására lép működésbe. A törzs genomjában olyan változtatásokat végeztek, melyek során az *sfiA* és *lacZ* gének fúzióját vitték véghez, és a *lacZ* gént az eredeti helyéről kivágták. Az *sfiA* gén a genetikai állomány sérülését javító SOS mechanizmust, a *lacZ* gén pedig a β -galaktozidáz kódolja. Az *uvrA* gén mutációja következtében megnövelték a genotoxikus anyag hatására bekövetkező válaszreakció mértékét, az *rfa* gén mutációjának következtében a sejt lipopoliszacharid rétege vált átjárhatóbbá így a külső ágensek könnyebben bekerülnek a citoplazmába. A genotoxikus anyag hatására bekövetkező DNS károsodás a RecA fehérjét aktiválja, mely ezután hasítja az *sfiA* gén átíródását gátló LexA represszort, melynek következtében az *sfiA:lacZ* operon átíródik és β -galaktozidáz termelődik (6. ábra). Ez az enzim az 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozid (X-gal) nevű szubsztráttal reakcióba lépve kék színű terméket eredményez. Erősebb genotoxinok esetében az átíródás többször végbemegy, így a β -galaktozidáz mennyisége és a kék szín erőssége arányos a genotoxicitás erősségével. A tesztben a citotoxicitás mérésére alkalmazott kontroll mérés az alkalikus foszfatáz termelődésének az ellenőrzése, hiszen az enzimtermelést kódoló gének megfelelő sejtszaporodás mellett folyamatosan kifejeződnek. Az alkalikus foszfatáz enzim *p*-nitrofenil-foszfát hozzáadása után sárga színű terméket képez. A bekövetkezett színreakciót követően a kék szín 620 nm-en, a sárga pedig 405 nm-en spektrofotométerrel mérhető (QUILLARDET ET AL., 1982).



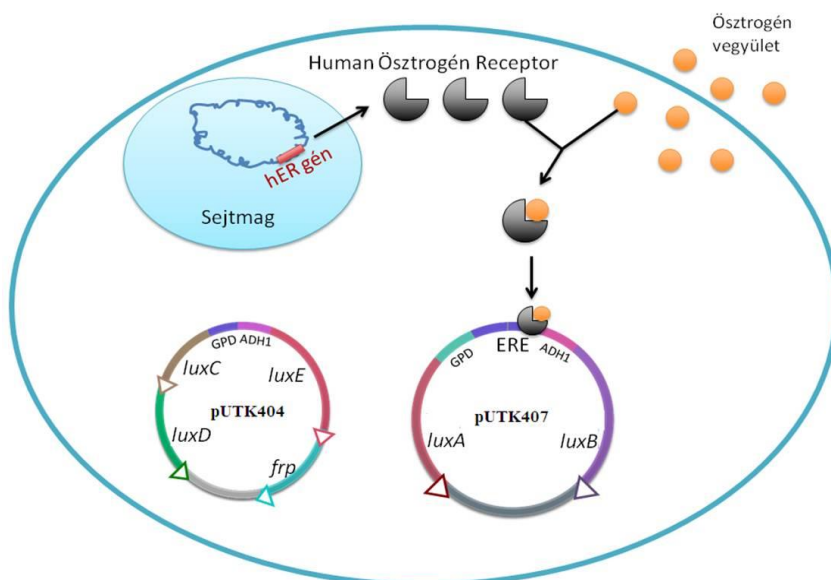
6. ábra: SOS-Chromo teszt sematikus rajza (QUILLARDET ET AL., 1985)

3.5.2.2 BLYES/BLYR teszt

A BLYES és a BLYR teszt ösztrogén- és citotoxikus hatás mérésére alkalmas, biolumineszcencián alapuló teszt (SANSEVERINO ET AL., 2005). Az alkalmazott tesztrendszer a *Saccharomyces cerevisiae* genetikailag módosított törzsei a BLYES és a BLYR törzsek.

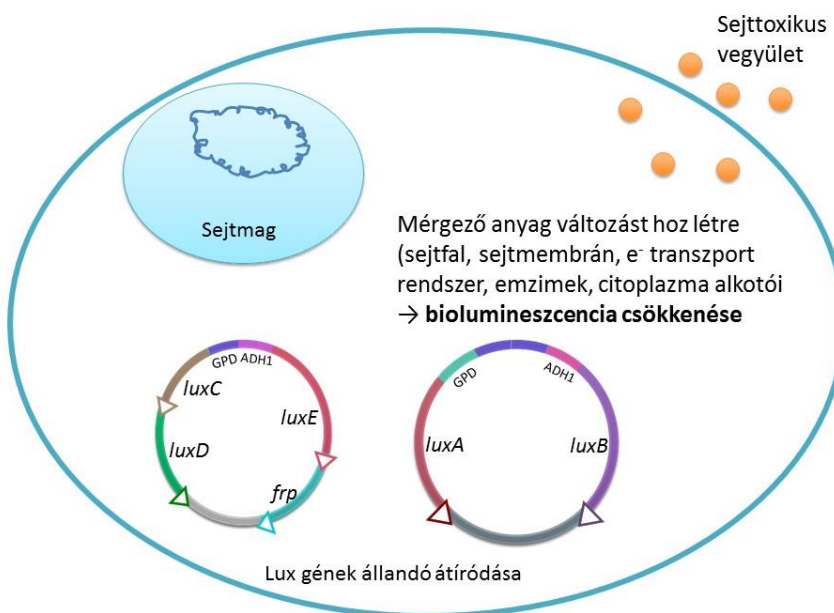
A BLYES (Bioluminescence Yeast Estrogen System) törzs genetikai állományába humán ösztrogénreceptor ($hER\alpha$) génjét, valamint két plazmidot (*pUTK404*, *pUTK407*) inszertáltak, melyeken a biolumineszcenciáért felelős géneket helyeztek el. A *Photorhabdus luminescens* baktériumból származó *lux* gén-kazetta tartalmazza a *luxA*, -B, -C, -D, -E géneket, melyek egy heterodimer luciferáz enzimet (luciferáz α - és β -alegység), valamint annak szubsztrátját egy, a fénykibocsátáshoz szükséges hosszú szénláncú zsír-aldehidet (flavin-mononukleotid – FMN) előállító enzim-komplexet kódol. A *pUTK404* plazmidon megtalálható továbbá a *Vibrio harveyi* baktériumból származó FMN H_2 kofaktort kódoló *frp* (flavin oxidoreduktáz) gén is, a *pUTK407* plazmidon pedig 2 ösztrogén válaszelem (ERE – *Estrogen Response Element*) a GDP és ADH1 konstitutív promóterek között (7. ábra). Amennyiben a receptorhoz ösztrogénhatású anyag kötődik, a receptor-ligand dimer az ösztrogén válaszelemekhez kapcsolódik, melyek beindítják a szomszédos promóterek, majd a fénykibocsátásért felelős *lux* gének egyszerre történő átíródását a két plazmidon (SANSEVERINO ET AL., 2005). Az oxigén jelenlétében bekövetkező biolumineszcenciát a luciferáz enzim és a FMN katalizálja, mely reakcióhoz elektron donorként NADH-ra van szükség. A bakteriális *lux* génkazetta (*luxCDABE*) által indított fénykibocsátáshoz nincs szükség külső szubsztrátra, így viszonylag gyors reakcióról beszélhetünk (MEIGHEN, 1993).

A BLYES tesztrendszer esetében a biolumineszcencia intenzitása egyenesen arányos a vegyület hormonhatásának mértékével (SANSEVERINO ET AL., 2005).



7. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES teszt sematikus ábrája (SANSEVERINO ET AL., 2005)

A BLYR (Bioluminescence Yeast Reporter) kontrollként alkalmazott törzs, mely a citotoxicitás mérésére alkalmas. Ez esetben a sejtbe csak biolumineszcenciáért felelős géneket inszertáltak, melyek folyamatosan, konstitutívan íródnak át (8. ábra). Ha egy anyag a sejtre toxikus, a sejt általi fénykibocsátás csökken (ELDRIDGE ET AL., 2007).



8. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYR teszt sematikus ábrája (ELDRIDGE ET AL., 2007)

4 Anyag és módszer

4.1 Élő sejtekkel végzett AFB1 és ZEA biodegradációjának és biodetoxifikációjának vizsgálata

Az AFB1 és a ZEA élő sejtekkel történő vizsgálatára a kiváló katabolikus képességekkel rendelkező *Rhodococcus* nemzetséget választottam. Tanszékünkön zajlott korábbi mikotoxinbontó kísérletekben (CSERHÁTI ET AL., 2013, KRIFATON ET AL., 2011, KRIFATON ET AL., 2013) a szóban forgó nemzetség tagjai kiváló bontási képességet mutattak, ezért munkám során teljes képet szerettem volna kapni arról, hogy a nemzetség tagjai, típustörzsei közül mely fajokra és milyen különbségekkel jellemző a mikotoxinok biodegradációja és biodetoxifikációja.

4.1.1 Felhasznált mikroszervezetek és mikotoxin törzsoldatok

A toxinok biodegradációs kísérleteiben a *Rhodococcus* típustörzsekből álló törzsgyűjtemény 42 tagját alkalmaztam, melyek fajneveit, izolálási helyét, származási adatait az 7. táblázat és a 4. számú melléklet tartalmazza.

Az AFB1 (CAS-szám 1162-65-8, tisztaság: $\geq 98\%$) és a ZEA (CAS-szám: 17924-92-4, tisztaság: $\geq 98\%$) toxinokat por formában a Fermentek Kft-től (Izrael) szereztem be, majd acetonban (CAS-szám: 67-64-1, tisztaság: a.r., Reanal Laborvegyszer Kft., Magyarország) oldottam 1 mg/mL koncentrációban.

7. táblázat: Aflatoxin B1 és zearalenon bontási kísérletben alkalmazott *Rhodococcus* típus törzsek és származásuk

Fajok neve	Törzsszámok	Izolálás helye
<i>R. aerolatus</i>	JCM 19485 ^T	Északi-sarkvidéki esővíz
<i>R. aetherivorans</i>	JCM 14343 ^T	Petrokémiai bioreaktorból származó iszap
<i>R. agglutinans</i>	KCTC 39118 ^T	Talaj
<i>R. antrifimi</i>	KCTC 29469 ^T	Denevér ürülék
<i>R. artemisiae</i>	DSM 45380 ^T	Gyógynövény
<i>R. baikonurensis</i>	DSM 44587 ^T	Mir úrállomás
<i>R. biphenylivorans</i>	KCTC 29673 ^T	PCB-szennyezett üledék (Kína)
<i>R. canchipurensis</i>	JCM 17578 ^T	Mészkő lerakó (India)
<i>R. cerastii</i>	DSM 45579 ^T	Levél felszín
<i>R. cercidiphylli</i>	DSM 45141 ^T	Levél felszín
<i>R. coprophilus</i>	JCM 3200 ^T	Tóvíz és iszap (Anglia)
<i>R. corynebacterioides</i>	JCM 3376 ^T	Levegő
<i>R. defluvii</i>	DSM 45893 ^T	Szennyvíz
<i>R. enclensis</i>	DSM 45688 ^T	Tengeri üledék (India)
<i>R. erythropolis</i>	JCM 3201 ^T	Talaj
<i>R. fascians</i>	JCM 10002 ^T	Fodrosodott levelű cukorborsó
<i>R. globerulus</i>	JCM 7472 ^T	Nincs adat
<i>R. imtechensis</i>	JCM 13270 ^T	Növényvédőszerrel-szennyezett terület (India)
<i>R. jostii</i>	JCM 11615 ^T	Középkori sírboltból származó emberi combcsont
<i>R. koreensis</i>	JCM 10743 ^T	Ipari szennyvíz
<i>R. kroppenstedtii</i>	JCM 13011 ^T	Hideg sivatag (Himalája, India)
<i>R. kunmingensis</i>	JCM 15626 ^T	Rizoszféra talaj (Kína)
<i>R. kyotonensis</i>	JCM 23211 ^T	Talaj (Japán)
<i>R. lactis</i>	DSM 45625 ^T	Iszap
<i>R. maanshanensis</i>	JCM 11374 ^T	Talaj (Kína)
<i>R. nanhaiensis</i>	DSM 45608 ^T	Tengeri üledék
<i>R. opacus</i>	JCM 9703 ^T	Talaj
<i>R. percolatus</i>	JCM 10087 ^T	Iszap
<i>R. phenolicus</i>	JCM 14914 ^T	Szennyvíziszap kezelő
<i>R. pyridinivorans</i>	JCM 10940 ^T	Ipari szennyvíz
<i>R. qingshengii</i>	DSM 45222 ^T	Karbendazim-szennyezett talaj (Kína)
<i>R. rhodnii</i>	JCM 3203 ^T	Rablópoloska
<i>R. rhodochrous</i>	JCM 3202 ^T	Nincs adat
<i>R. ruber</i>	JCM 3205 ^T	Nincs adat
<i>R. soli</i>	JCM 19627 ^T	Talaj (Japán)
<i>R. sovatisensis</i>	H004 ^T	Heliothermikus tó (Románia)
<i>R. triatoma</i>	JCM 13396 ^T	Vérszívó poloska
<i>R. trifolii</i>	DSM 45580 ^T	Levél felszín
<i>R. tukisamuensis</i>	JCM 11308 ^T	Talaj (Japán)
<i>R. wratislaviensis</i>	JCM 9689 ^T	Talaj
<i>R. yunnanensis</i>	JCM 13366 ^T	Talaj (Kína)
<i>R. zopfii</i>	JCM 9919 ^T	Bioreaktor

JCM Japán mikroorganizmusok gyűjteménye (*Japan Collection of Microorganisms*)

DSM Német mikroorgaizmusok és sejt kultúrák gyűjteménye
(*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*)

KCTC Koreai típus törzsek gyűjteménye (*Korean Collection for Type Cultures*)
^T Típustörzs

4.1.2 A mikotoxin bontási kísérletek összeállítása

A típus törzseket -80°C-on történő tárolást követően LB (2. melléklet) agar lemezre széleszttem, majd a lemezeket 28°C-on inkubáltam a telepek megjelenéséig. A folyékony tenyészet készítéséhez egy tiszta telepet LB tápoldatba (30 mL) oltottam, majd a lombikokat 3

napon keresztül 28°C-on és 170 rpm-en termosztátban (Sartorius Stedim Certomat BS-1) rázattam. A harmadik napon az inokulum sejtsűrűségét optikai denzitás (OD) alapján ellenőriztem, majd a 600 nm hullámhosszon mért abszorbancia értéket $OD_{600}=0,6\pm0,05$ -re állítottam be spektrofotométerrel (Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer, Thermo-Fischer Scientific). A beállított sejtsűrűségű inokulumból 5 mL-t oltottam be 45 mL LB tápoldatba, végül mikotoxinnal kontamináltam a kísérleti rendszereket. Az AFB1 esetében 3 µg/mL, a ZEA esetében 1 µg/mL végkoncentrációt alkalmaztam. Minden beállítást három párhuzamosban készítettem el, melyek mellé toxinnal szennyezett, mikrobamentes kontrollt állítottam. A biodegradációs kísérlet a korábbi kísérletek tapasztalatai alapján az AFB1 esetében 3, míg a ZEA esetében 7 napon keresztül zajlott 28°C-on (170 rpm). A lombikokból 24 óránként 1 mL mintát vettem, melyeket 4°C-on 20 percig 14000 rpm-en centrifugáltam (Eppendorf 5810R), majd a pellet és felülúszó frakciókat -20°C-on tároltam a további vizsgálatokig.

A biodegradáció hatékonyságára 6 kategóriát alakítottam ki. 20% alatt a biodegradációt elhanyagolhatónak tekintettem, 20-30% között gyenge, 30-50% között közepes, 50% felett megfelelő, 80% felet jó, 90% felett pedig kiváló besorolást kapott az adott törzs.

4.1.3 Mikotoxin-koncentráció analitikai meghatározása

A mintákban és a kontroll oldatokban a maradék AFB1 és ZEA toxinok koncentrációját a Wessling Hungary Kft. fluoreszcens detektorral felszerelt magasnyomású folyadékkromatográffal (HPLC-FLD) határozta meg. A mintaelőkészítés során a három párhuzamos felülúszó mintáit ultrahanggal homogenizálták, amit az oszlop előtti származékképzés követett 55°C-on 15 percen keresztül. A toxinok elválasztásához Agilent 1100 típusú HPLC készüléket (Agilent Technologies) használtak, amit Restek C18 oszloppal (150mm x 4,6 mm x 5 µm, Restek Corporation) volt felszerelve. A pelleten kötött toxin mennyiségének meghatározásához a mintaelőkészítés első lépéseként 1 mL mintából származott pellet frakciót 1 mL metanollal extraháltak, centrifugálták (2700 g, 4 °C, 10 perc) (EL-NEZAMI ET AL., 2002), majd az így kapott felülúszót vetették analitikai vizsgálat alá a fent említett paraméterek szerint. Az alkalmazott protokoll és a mérések további paramétereit a 8. táblázatban foglaltam össze.

8. táblázat: Aflatoxin B1 és zearalenon koncentrációjának HPLC-s meghatározása során alkalmazott paraméterek

	<i>AFB1 mérés</i>	<i>ZEA mérés</i>
<i>Módszer</i>	AOAC 990.33	AOAC 985.18
<i>Származékképző reagens</i>	Trifluoecetsav:ecetsav:desztillált víz (1:1:8)	Metanol:desztillált víz (1:1)
<i>Eluens</i>	Víz:acetonitril:metanol (68:16:16)	Víz:acetontiril (45:55)
<i>Detektálás módja</i>	Fluoreszcens detektor	Fluoreszcens detektor
<i>Hullámhossz</i>	Elnyelés: 365 nm Emisszió: 440 nm	Elnyelés: 274 nm Emisszió: 440 nm
<i>Kimutatási határ</i>	1 µg/mL	10 µg/mL

4.1.4 Biológiai hatásmérés

A bontási kísérletből származó mintákat és a kontroll oldatokat biológiai hatáselemzésnek is alávettem, hogy nyomon követhessem a mikotoxinok és bomlástermékeik káros hatásának a változását, illetve megszűnését. Az AFB1 genotoxicitását SOS-Chromo, a ZEA ösztrogénhatását BLYES teszttel mértem.

4.1.4.1 SOS-Chromo teszt

A teszthez szükséges reagenseket (SOS-ChromoTest™ Kit) az Environmental Bio-Detection Products Inc. (Kanada) cégtől szereztem be. A fagyasztva szárított *E. coli* PQ37-es törzset a tesztet megelőző napon 10 mL Casiton broth oldattal reaktiváltam (2. melléklet), melyből 100 µL-t oltottam 10 mL tápoldatba, amit 37°C-on, sötétben inkubáltam 16-18 órán keresztül. A tesztet 96-lyukú, átlátszó aljú mikrotiter lemezek (µClear® lemez, PS, Greiner Bio-One Hungary Kft.) készítettem el, ahol pozitív kontrollként az indirekt genotoxikus hatású AFB1-ből és a 2-amino-antracénből (2AA), valamint a direkt genotoxikus hatású 4-nitroquinolin-1-oxidből (4NQO) készült 1:2-es hígítási sort alkalmaztam. Negatív kontrollként a hígító oldatként alkalmazott 10%-os DMSO és 85%-os sóoldat keverékét, valamint a bontási kísérletből származó minták közegéül szolgáló LB tápoldatot használtam. Az indirekt hatású anyagok vizsgálatához metabolikus aktiválásra volt szükség, melyet az ún. S9 mix segítségével végeztem el. Az S9 mix tartalmaz előzetesen genotoxikus anyaggal (Aroclor 1254) kezelt patkánymáj kivonatot, ami alkalmas a genotoxikus anyagok metabolikus átalakítására, valamint a reakcióhoz szükséges egyéb vegyületeket (S9 mix: KCl+MgCl₂ oldat, 0,5 M glükóz-6-foszfát oldat, nikotinamid-dinukleotid-foszfát [NADP], Tris HCl puffer, desztillált víz, patkánymáj enzim-kivonat) is tartalmazza. A teszt szerkezet „overnight” tenyésztésének sejtsűrűségének beállítása után (OD₆₀₀=0,05) S9 mixet tartalmazó, ill. nem tartalmazó baktérium-szuszpenziót

készítettem a nem, ill. aktiválni kívánt minták mérésére. A mintákból és a kontrollokból három párhuzamosban 10-10 μL -t mértem ki. Az indirekt hatású genotoxinokhoz és a mintákhoz 100 μL S9 mix-et tartalmazó baktérium-szuszpenziót adtam, a direkt hatású pozitív kontrollra az S9 mixet nem tartalmazó baktérium-szuszpenziót mértem. A lemezt 2 órán keresztül 37°C -on inkubáltam sötétben mikrotiter lemezhez kialakított termosztátban (Biosan PST-60HL-4, Lengyelország). Ezt követően a szubsztrát-mix mintákhoz való hozzáadása következett, mely a Blue Chromogene (X-gal) és *p*-nitrofenil-foszfát keverékét tartalmazta, melyből szintén 100 μL -t mértem a mintákra. Ezt 1,5 órás inkubáció követte sötétben, 37°C -on. A színreakció bekövetkezése után a lemezt ELISA abszorbancia mérővel (ELx800 Absorbance Reader, BioTek Instruments) 620 és 405 nm-es hullámhosszokon mértem. A kapott abszorbancia értékekből ún. indukciós faktort (IF) határoztam meg az alábbi képlet alapján (LEGAULT ET AL., 1996):

$$\text{Indukciós faktor (IF)} = (K_{405} * M_{620}) / (M_{405} * K_{620}),$$

ahol a K a negatív kontroll, az M a minta abszorbancia értékét jelöli az alsó indexben feltüntetett hullámhosszokon.

A minták IF értéke határozza meg a genotoxicitást, mely 1,5-nél kisebb érték esetén a genotoxikus hatás megszűnését jelenti (QUILLARDET ET AL., 1982).

4.1.4.2 BLYES/BLYR teszt

A teszthez a BLYES és BLYR törzseket 30 mL Growth médiumba (2. melléklet) oltottam, melyekből 30°C -on „overnight” tenyészeteket készítettem. A felszaporítást követően a tenyészet sejtsűrűségét $\text{OD}_{600}=1\pm0,05$ -re állítottam be. A tesztet 96-lyukú, fehér PS mikrotiter lemezekben (Greiner Bio-One Hungary Kft.) végeztem. Az ösztrogénhatás mérése során pozitív kontrollként ZEA-ból metanollal (CAS-szám: 67-56-1, tisztaság: a.r., Reanal Laborvegyszer Kft.) készült 1:2 hígítási sort alkalmaztam, negatív kontrollként pedig a tesztorganizmet, a tesztorganizmet és oldószer (metanol) keverékét, valamint a tesztorganizmet és a bontási kísérletből származó mintáknál alkalmazott tápoldat (LB) keverékét alkalmaztam. A mintákból három párhuzamosban 20-20 μL -t mértem a lemezre, melyekhez, valamint a pozitív és negatív kontrollokhoz 200 μL beállított sejtsűrűségű tesztorganizmet adtam. Ezt követően a mikrotiter lemezt 5 órán keresztül 30°C -on inkubáltam. Az idő leteltével leolvastam a fénykibocsátást VictorX luminométer (Perkin Elmer) segítségével.

A kapott biolumineszcencia értékekből a BLYES esetében az alábbi egyenlet alapján biolumineszcencia intenzifikációt számoltam (KRIFATON ET AL., 2013):

$$\text{Biolumineszcencia intenzifikáció (\%)} = ((K-M)/K * 100) * (-1),$$

ahol a K a negatív kontroll, az M pedig a minta cps-ben (másodpercenként becsapódó fotonszám) kifejezett biolumineszcencia értéke 5 órás kontaktidőnél.

A BLYR törzs esetében a fenti egyenlet reciprokából biolumineszcencia gátlási százalékot fejeztem ki.

4.1.5 Statisztikai értékelés

Az eredmények statisztikai vizsgálatához a Microsoft Excel (Microsoft Office, USA) és a Past 3 (HAMMER ET AL., 2001) szoftvereket használtam. A felülúszóban mért genotoxicitást indukciós faktorban (IF), az ösztrogénhatást a biolumineszcencia intenzifikáció százalékában (BI%), a toxin koncentrációját pedig $\mu\text{g/mL}$ -ben fejeztem ki. A biológiai hatáselemzést kétszer ismételttem a kísérletben beállított három párhuzamos mintára, így az eredmények bemutatása hat mérési pont átlagában történt. Az analitikai eredmények három párhuzamos méréséből származó átlagértékek. A ZEA-detoxifikáció sikerességének mérésére a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérés ($p < 0,05$) meghatározásához kétmintás t-tesztet használtam. Genotoxicitás értékelése során azt a mintát tekintettem nem genotoxikusnak, ahol az IF szignifikánsan kisebb volt az 1,5-ös határértéknél egymintás t-tesztet alkalmazva (QUILLARDET ET AL., 1982). Az ösztrogénhatás változását a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérés határozta meg. A biológiai és analitikai mérések közötti összefüggés igazolására Spearman-féle rangkorrelációt alkalmaztam.

4.2 Baktériumok sejtmentes kivonataival végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biotetoxifikáció vizsgálata

A *Rhodococcus* típus törzsekkel végzett élő sejt kísérletek mellett, ismert AFB1, ill. ZEA-detoxifikációs tulajdonsággal rendelkező törzsek sejtmentes kivonatait is kísérletbe vontam, hogy ellenőrizsem azok hatékonyságát, továbbá azért, hogy a lebontásért felelős enzimek természetét megismerjem a későbbi biotechnológiai felhasználás céljából.

4.2.1 Felhasznált mikroszervezetek és mikotoxin törzsoldatok

A sejtmentes kísérletbe vont, ismert degradációs és detoxifikációs képességgel rendelkező (KRIFATON ET AL., 2011; KRIFATON ET AL., 2013) baktériumtörzsek a Szent István Egyetem Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék törzsgyűjteményébe tartoznak.

Az AFB1 sejtmentes kivonatokkal végzett bontási kísérletekben alkalmazott törzsek:

- *Rhodococcus erythropolis* NI1
- *R. rhodochrous* NI2

A ZEA sejtmentes kivonatokkal végzett bontási kísérletekben alkalmazott törzsek:

- *Gordonia paraffinivorans* NZS6
- *Pseudomonas pseudoalcaligenes* FEH28
- *Rhodococcus aetherivorans* AK44
- *R. erythropolis* NI1
- *R. globerulus* N58
- *R. pyridinivorans* AK37
- *R. pyridinivorans* K402
- *R. pyridinivorans* K404
- *R. pyridinivorans* K408
- *R. ruber* N361
- *Streptomyces cavourensis* K14

4.2.2 A sejtmentes kivonatok elkészítése és a bontási kísérlet összeállítása

A -80°C-on tárolt törzseket LB agar lemezre szélesztettem, majd 28°C-on inkubáltam. A telepek megjelenése után egy tiszta telepet oltottam 30 mL LB tápoldatba majd 28°C-on szaporítottam három napon keresztül.

A sejtmentes kivonatok alkalmazásával a bontásban résztvevő enzimek természetét vizsgáltam, mely szerint két vizsgálati irányt különítettem el. Kísérletemben szerettem volna felderíteni, 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. A másik vizsgálati irány pedig arra szolgált, hogy megkülönböztessem az extracelluláris enzimek (i) degradációs képességét az intracelluláris enzimek (ii) képességétől. Az első (i) esetben a sejtet körülvevő térben szubsztrátként jelen levő toxin az extracelluláris térbe kiválasztott enzimekkel kapcsolódik, addig a másik (ii) esetben a toxin a sejtbe diffundál és a citoplazmában jelen lévő enzimek bontják le. Az említett irányok szerint a sejtmentes kivonatok az alábbi módon készítettem el.

I. Konstitutív enzimek

10 mL felszaporított inokulumot oltottam
90 mL LB tápoldatba (2x100 mL), majd
további inkubáltam 28°C-on 48 órán át

II. Indukált enzimek

10 mL felszaporított inokulumot
oltottam 90 mL, toxinnal kontaminált
(1 µg/mL) LB tápoldatba (2x100 mL),
majd inkubáltam 28°C-on 48 órán át

III. Extracelluláris enzimek

Felszaporítást követően az inokulumot centrifugáltam (20 perc, 4°C, 3220 g),
majd a felülúszót a pellettől elválasztottam és 0,2 µm pórusátmérőjű
membránszűrőn átszűrtem.

IV. Intracelluláris enzimek

A folyékony tenyészet említett centrifugálását követően a pellet frakciót foszfát
pufferrel (67 mM, pH=7) mostam át, majd újra centrifugáltam a fentiekkel
meg egyező paraméterek között. Ezt a lépést megismételtem, majd az átmosásra
használt puffert a pelletről leöntöttem. A pellet tömegének megmérése után újra
foszfát puffert mértem a sejtekre (1g pellet 3 mL pufferben felvéve). Ehhez a
szuszpenzióhoz cirkon (ZrSiO₄) port adtam, majd ultrahangos sejtroncsolásnak
vetettem alá (Branson Digital Sonifier, Emerson Industrial Automation). Az
ultrahangos szonikálást 20% amplitúdóval, 6*1 percig pulzáló módban, jégen
végeztem el, hogy megakadályozzam a közeg túlhevülését. A roncsoláson
átesett baktérium szuszpenziót centrifugáltam, majd 0,2 µm pórusátmérőjű
membránszűrőn átszűrtem.

A sejtmentes bontási kísérletek 1,5 mL térfogatú mikro centrifugacsövekben zajlottak,
ahol a vizsgálati irányok szerint a mintákból három párhuzamost készítettem el, melyeket 1
µg/mL végkoncentrációban AFB1 ill. ZEA toxinnal kontamináltam. Az AFB1 bontása során az
extraktumok mellett kontrollként 1 µg/mL toxint tartalmazó foszfát puffert alkalmaztam, melyet
a kivonatokkal együtt inkubáltam. A ZEA bontása során az előbbiektől eltérő kontroll
alkalmazására volt szükség, melyet úgy alakítottam ki, hogy a toxinnal kontaminált kivonatok
mellett toxint nem tartalmazó kivonatot is összeállítottam, amit a teszt végén szintén
lefagyasztottam majd felolvasztottam, így inaktíválva az enzimeket, majd a mérés előtt a
korábban használt törzsoldatból mértem hozzá azonos mennyiségű ZEA-t. Erre a lépésre azért
volt szükség, hogy kiküszöböljem a fénykibocsátásra eltérően ható különböző színű kivonatok
által okozott különbséget. A törzsek eltérő színű kivonatai az AFB1 mérése során az
abszorbancia mérést nem befolyásolták, ám a BLYES tesztben zavaróak voltak. Ezt

részletesebben az Eredmények fejezet 5.2.2.3. alfejeztében mutatom be. A jövőbeli esetleges takarmányadalékként való felhasználhatóság miatt az extraktumok hatékonyságát semleges kémhatáson és 37°C-on vizsgáltam és a kísérletet 6 órán keresztül inkubáltam sötétben. Az AFB1 esetében a kivonatok hatékonyságát enyhén lúgos kémhatáson (pH=7,5 és 8) is vizsgáltam. A kivonatokból a nulladik és hatodik órában vettem mintát, melyeket -20°C-on tároltam a további vizsgálatokig.

A degradáció enzimátikus mivoltának az igazolására proteináz K (CAS-szám: 39450-01-6, Merck KGaA, Németország) + 1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS, CAS-szám: 151-21-3, tisztaság: ≥98,5%, Merck KGaA, Németország) keverékével történő kezelést alkalmaztam. A proteináz K egy *Tritirachium album* gombából izolált proteáz, mely erős proteolitikus aktivitással rendelkezik számos fehérjére és képes hidrolizálni a keratint is (EBELING ET AL., 1974). A fenti tulajdonságának köszönhetően a feltárt enzimek emésztésére is alkalmas, hatékonyságát SDS kiegészítéssel fokoztam. A kísérletben, a sejtfeltárást követően a kivonatokhoz 1 mg/mL proteináz K + 1% SDS keverékét adtam, majd 1 órán át 37°C-on inkubáltam. A feltárt enzimek emésztését követően a kivonatok a toxinnal kontamináltak (1 µg/mL végkoncentrációban) és a fentiekhez hasonlóan 6 órán keresztül inkubáltam szintén 37°C-on.

4.2.3 Fehérjekoncentráció meghatározása

A sejtmentes kivonatok detoxifikációs hatékonyságának összehasonlításához szükség volt azok relatív fehérjekoncentrációjának a mérésére. A fehérjetartalom meghatározása lehetővé teszi, hogy egyrészt a különböző fajok, valamint az extra- és intracelluláris, továbbá a konstitutív és indukált kivonatok között különbséget lehessen tenni. A vizsgálataim első ütemében, az AFB1 méréseknél Bradford mérésre volt lehetőség, később a ZEA-nál áttértem a pontosabb Pierce 660 módszerre.

4.2.3.1 Bradford mérés

A régóta ismert Bradford-féle fehérjekoncentráció meghatározási módszer alapja a Coomassie Briliáns Kék G-250 festék azon tulajdonságán alapul, miszerint fehérjéhez kötődve a festék elnyelési maximuma 465 nm-ről 595 nm-re változik. A keletkezett kék színű fehérje-festék komplex spektrofotométerrel mérhető 595 nm hullámhosszon (BRADFORD, 1976).

A mérés során standard fehérjeként marha vérsavó albumint (BSA) használtam, melyből foszfát puffer alkalmazásával a következő koncentrációjú oldatokat állítottam össze: 0,025; 0,125; 0,250; 0,500; 0,750; 1,000; 1,500; 2,000 mg/mL. Az ismert fehérjéből és a mintából 100 µL-t és 1 mL Coomassie reagenst (Sigma-Aldrich Co., USA) kevertem össze. 2 perc várakozási

időt követően, mely alatt bekövetkezik a festék fehérjékhez való kötődése, az abszorbanciát UV-VIS spektrofotométerrel (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific Inc.) határoztam meg. A BSA hígítási sorának koncentrációs értékeihez tartozó abszorbancia értékeket grafikonon ábrázoltam, majd az egyenes egyenlete alapján meghatároztam a mintában található fehérjék koncentrációját.

4.2.3.2 Pierce 660 nm fehérje teszt

Az újabb típusú teszt szintén az elnyelési maximum megváltozásán alapul, csak ebben az esetben a polihidroxi-benzén-szulfoftalein festék és fémkomplex kötődik a fehérjékhez. A komplex eredeti színe barna, mely 450 nm-en mérhető. A fehérjekötődést követően a barna szín zöldes-kékes színre változik, ezáltal az abszorpciós maximum pedig 660 nm-re ugrik. A Pierce fehérje-meghatározási módszer lineárisabb összefüggést mutat, mint a fenti Bradford-féle teszt (ANTHARAVALLY ET AL., 2009).

Ezesetben is BSA-t alkalmaztam, mint referenciafehérje, melyből a fenti bekezdésben leírt hígítási sort készítettem foszfát puffer segítségével. A mintából és a BSA-ból 100 µL-hez 1,5 mL Pierce 660 nm fehérje teszt-reagenst kevertem (Thermo Fisher Scientific Inc.), majd 5 percet vártam a megkötődés bekövetkeztére. A minták 660 nm-en mért abszorbanciáját UV-VIS spektrofotométerrel (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific Inc.) határoztam meg, majd a BSA koncentrációs és abszorbancia értékeiből grafikon segítségével meghatároztam az ismeretlen minta fehérjekoncentrációját.

4.2.4 Biológiai hatásmérés

Az AFB1-tartalmú minták maradék genotoxicitásának meghatározását a kolorimetrikus SOS-Chromo teszttel, a ZEA-t tartalmazó minták ösztrogénhatásának detektálását pedig fénykibocsátáson alapuló BLYES teszttel végeztem. Az SOS-Chromo tesztet a 4.1.4.1., a BLYES és BLYR tesztet pedig a 4.1.4.2. alfejezetek szerint végeztem el. A citotoxicitás értékelése során a mintákat négy kategóriába soroltam. <20% gyenge, 20-40% között közepes, 40-60% jelentős, >60% pedig erős citotoxikus hatás jelentkezett.

4.2.5 Mikotoxin-koncentráció analitikai meghatározása

Az AFB1 sejtmentes kivonatokkal végzett lebontása utáni maradék mikotoxin-koncentrációt a Wessling Hungary Kft. végezte HPLC-FLD módszerrel a 4.1.3. alfejezetben foglaltak szerint.

A ZEA sejtmintes kivonatokkal végzett biodegradációs kísérletből származó mintákban a mikotoxinok koncentrációjának meghatározását a Szent István Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszék munkatársai végezték magasnyomású folyadékkromatográf és tandem tömegspektrométer (HPLC-MS/MS) összekapcsolásával. A mintaelőkészítés során a mintákat izotóp jelzett belső sztenderddel (ISTD) kezelték (100 μL minta + 25 μL ISTD), majd nitrogén gáz alatt elpárologtatták és visszaoldották 50-50% A:B keverékéből (A: víz + 5 mM ammónium-acetát, 0,1% ecetsav; B: metanol, 5 mM ammónium-acetát, 0,1% ecetsav) álló eluensben. A kromatográfiás elválasztás Agilent 1100 típusú HPLC készülékkel (Agilent Technologies) történt, melyben Agilent Zorbax (C18 3,5 μm , XDB-C18, 2,1 x 50mm) oszlopot alkalmaztak. Az előkészített mintából 10 μL -t injektáltak a mozgó fázisba, mely a fentebb említett A:B eluenst tartalmazta. Az áramlási sebesség 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, a kolonna hőmérséklete pedig 40°C volt. Az alkalmazott tömegspektrométer típusa a 3200 QTRAP LC/MS/MS rendszer (Applied Biosystems) volt. A ZEA mérése negatív ionmódban, MRM üzemmódban történt, ahol 1 anyaion és 2 leányion alapján azonosították a célvegyületet. A ZEA esetében a kimutatási határ 2 ng/mL volt.

4.2.6 Statisztikai értékelés

Az eredmények statisztikai értékelését a 4.1.5 alfejezetben leírtak szerint végeztem. A biológiai mérések értékelése során két ismételt mérésből származó három párhuzamos, azaz összesen hat mérési pont átlagát vettem alapul, az analitikai vizsgálat során pedig három párhuzamos mérése történt meg. A szignifikáns eltérést ($p < 0,05$) t-tesztben határoztam meg.

5 Eredmények

5.1 Élő sejtekkel végzett AFB1 és ZEA biodegradáció és biodetoxifikáció vizsgálati eredményei

5.1.1 Az AFB1 biodegradációja

A 3 napig zajló AFB1 bontási kísérlet végén a felülúszóban és a pelleten maradt toxin koncentrációjának mérése HPLC-FLD módszerrel történt.

A baktériumsejteken való toxinmegkötődés ellenőrzése azért nélkülözhetetlen lépés, mert koncentrációcsökkenés esetében meg kell győződnünk, hogy az valóban a törzsek biodegradációjának az eredménye. A pelletről extrahált AFB1 koncentrációja egyik törzs esetében sem volt jelentős mértékű. A legmagasabb pelletről származó toxinkoncentrációt (0,095 µg/mL) a *R. ruber* JCM 3205^T törzs esetében mértem, mely a kiindulási 3 µg/mL-nek alig 3%-a. Ez az adszorpció elenyésző, a többi törzsnél pedig ennél is kisebb mennyiségű AFB1 kötődött a sejtfalhoz. Ennek tükrében kijelenthetem, hogy a biodegradációs hatékonyságot nem befolyásolta az adszorpció jelensége, így a toxin lebontásának mértékét a kontrollhoz viszonyított százalékos értékekkel fejeztem ki. Az SOS-Chromo tesztben kapott IF értékeket is előzetesen feltüntettem, ám, hogy melyik törzsek voltak képesek a detoxifikációra, azt a degradációs potenciál jellemzése után ismertetem. Ezeket a számszerű értékeket a 9. táblázatban foglaltam össze.

A *Rhodococcus* típus-törzsek biodegradációs képessége igen széles skálán mozog (9. táblázat). Kettő közülük, a *R. kunmingensis* JCM 15626^T és a *R. jostii* JCM 11615^T törzsek egyáltalán nem vagy elhanyagolható mértékben voltak képesek az AFB1-et bontani, ugyanis vagy nem történt csökkenés a kontrollhoz viszonyítva, vagy a mértéke 20% alatt maradt. Nyolc törzs bontási képessége gyenge (20-30%-os) volt az eredmény alapján. Ezzel szemben viszont közepesnél (>50%) nagyobb mértékű degradációt figyeltem meg 14 típus-törzsnél, ahol a kiindulási koncentráció 50-80% közötti mértékben csökkent. Ami ennél is lényegesebb, hogy a vizsgált törzsek közel 2/3-a jó, 80%-nál nagyobb bontási képességet mutatott és ezek közül 18 esetben a biodegradáció mértéke meghaladta a 90%-ot is. Ezek a leghatékonyabb típus-törzsek a következő fajokból kerültek ki, és növekvő bontási képesség alapján a következők: *R. kyotonensis*, *R. percolatus*, *R. yunnanensis*, *R. imtechensis*, *R. erythropolis*, *R. tukisamuensis*, *R. rhodnii*, *R. aerolatus*, *R. enclensis*, *R. lactis*, *R. trifolii*, *R. qingshengii*, *R. artemisiae*, *R. baikonurensis*, *R. globulus*, *R. kroppenstedtii*, *R. pyridinivorans* és *R. corynebacterioides*.

9. táblázat: Aflatoxin B1 biodegradációs kísérletébe vont *Rhodococcus* típus törzsek bontási képessége és a mintákban mért genotoxikus hatás

Faj neve	Törzs jele	Genotoxicitás (IF) 3. nap	AFB1 koncentráció a felülúszóban (µg/mL)	AFB1 koncentráció a pelleten [♦] (µg/mL)	Biodegradációs hatékonyság (%)
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. rhodnii</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

Félkövért AFB1 biotetoxifikációjára képes törzsek (IF <1,5; p <0,05)

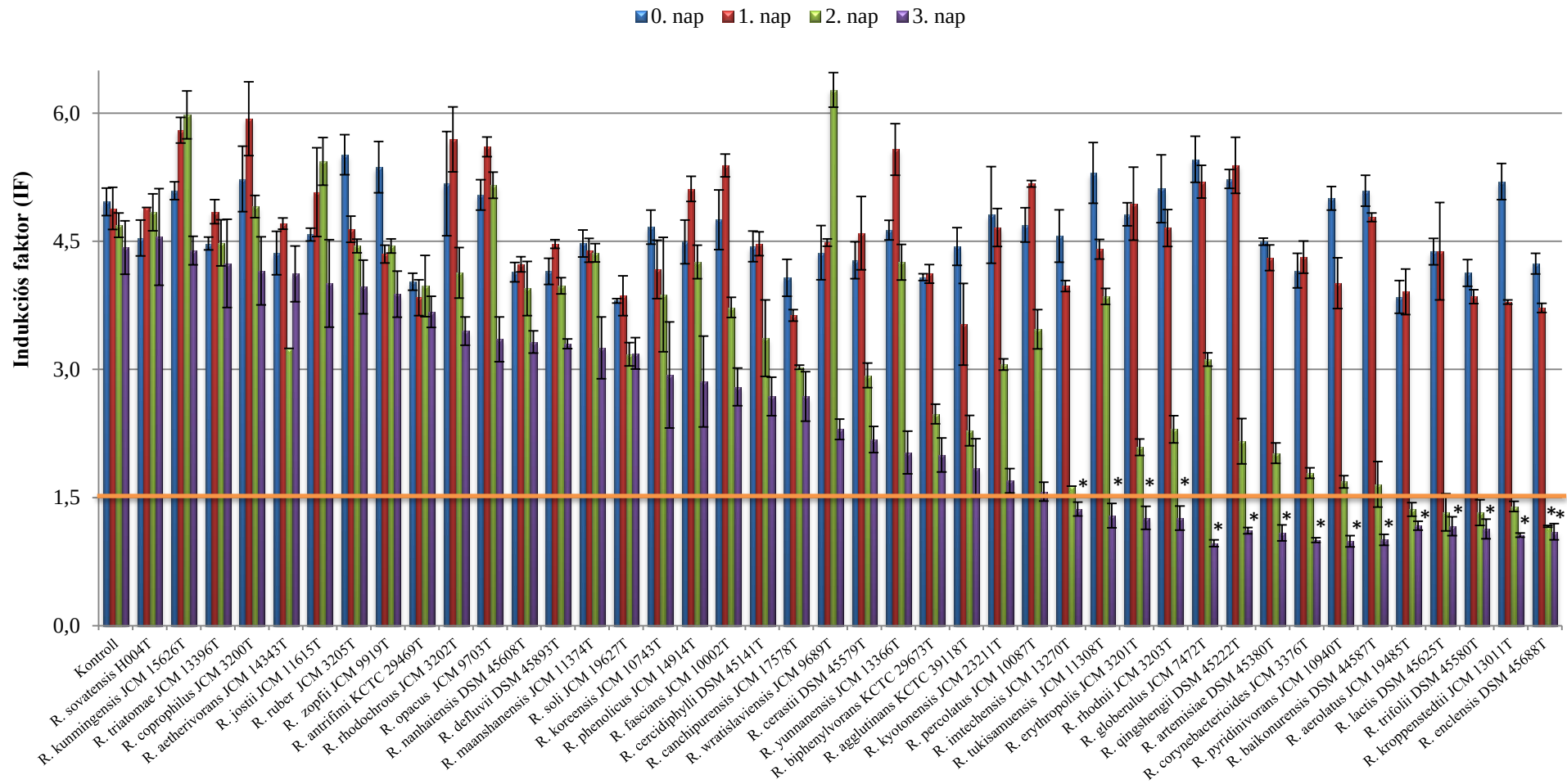
^T Típustörzs

¹ Korábban nem bizonyított AFB1 biotetoxifikációs képességgel rendelkező törzsek

[♦] 1 mL metanollal extrahálva

A típustörzsek AFB1 toxint detoxifikáló tulajdonságát SOS-Chromo teszttel vizsgáltam és a hatást IF (indukciós faktor) értékben fejeztem ki. A törzsek felülúszó mintájában a kísérlet három napja során mért genotoxicitás változását a 9. ábrán tüntettem fel, ahol az IF=1,5 határ jelzi a genotoxicitás megszűnését. Az említett 18 törzs közül, melyek 90% fölötti biodegradációs hatékonysággal rendelkeznek, a kísérlet végére 15 szüntette meg a toxin és bomlástermékei genotoxikus hatását. A *R. imtechensis* JCM 13270^T, *R. tukisamuensis* JCM 11308^T, *R. erythropolis* JCM 3201^T, *R. rhodnii* JCM 3203^T, *R. globulus* JCM7472^T, *R. qingshengii* DSM 45222^T, *R. artemisiae* DSM45380^T, *R. corynebacterioides* JCM3376^T, *R. pyridinivorans* JCM 10940^T, *R. baikonurensis* DSM 44587^T, *R. aerolatus* JCM 19485^T, *R. lactis* DSM 45625^T, *R. trifolii* DSM 45580^T és *R. kroppenstedtii* JCM 13011^T törzsek esetében 72 óra után, a *R. enclensis* DSM 45688^T jelölésű törzs esetében 48. óra után nem volt genotoxikus hatás kimutatható, hiszen az IF érték szignifikánsan kisebb ($p < 0,05$) volt, mint 1,5 (9. ábra).

A biológiai és analitikai mérések közötti összefüggés vizsgálatát Spearman-féle rangkorrelációs együtthatóval értékeltem. A statisztikai vizsgálat alapján $r_s = 0,968$ és $p = 3,01E-53$ volt, ami bizonyítja a pozitív összefüggést az analitikai (HPLC-FLD) és a biológiai (SOS-Chromo teszt) mérések között. Egy eset különbözött a fentiektől, ugyanis a *R. yunnanensis* JCM 13366^T az egyik leghatékonyabban bontó törzs volt 95% bontási képességgel, mégsem volt képes a toxin teljes biodetoxifikációjára. Ennek az eltérésnek valószínűsíthető oka genotoxikus bomlástermék(ek) keletkezése az AFB1 biodegradációja során.

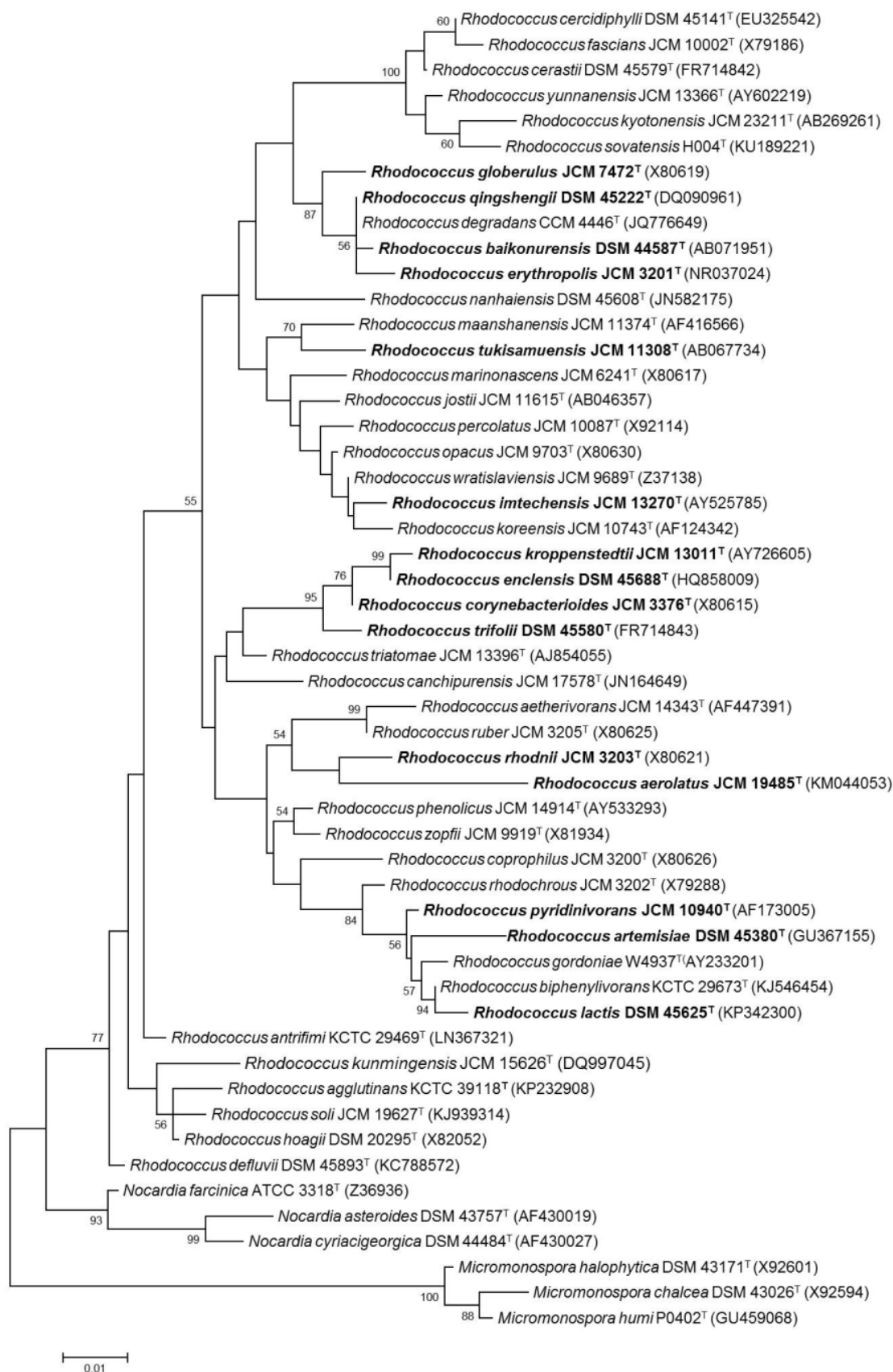


9. ábra: Aflatoxin B1 biodegradációs kísérletbe vont *Rhodococcus* típus törzsek felülíró mintáinak genotoxikus hatása SOS-Chromo teszttel meghatározva. Az értéket indukciós faktorban fejeztem ki. A genotoxicitás megszűnését * jelzi (IF<1,5 [p<0,05])

Az eredményeket összegezve, az AFB1 biodegradációjára és biodetoxifikációjára egyidejűleg képes 15 *Rhodococcus* típus törzs a következő fajokhoz tartozik: *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 detoxifikációs tulajdonságát elsőként bizonyítottam.

A *R. erythropolis* típus törzs AFB1 bontási képességét ESHELLI és mtsai (2015) is vizsgálták, akik eredményeimhez hasonlóan 95%-os biodegradációról számoltak be. Az általuk publikált adatok alapján a törzs olyan vegyületekké alakította át a mikotoxint, melyek vélhetően a glikolízis és zsírsav metabolizmus során keletkező melléktermékek voltak. Munkám során a metabolitok vizsgálatára nem volt lehetőség, ám biológiai hatásmérésen alapuló eredményeim megerősítik, hogy az átalakulási termékek nem rendelkeztek genotoxikus hatással.

A fenti eredményeket értékelve kijelenthető, hogy a *Rhodococcus* nemzetség igen változatos képet mutat AFB1 degradációs és detoxifikációs tulajdonságuk tekintetében. A típus törzsek 16S rRNS szekvenciája alapján felrajzolt törzsfa a 10. ábrán látható, ahol vastaggal szedve az AFB1 detoxifikációjára képes törzseket tüntettem fel. A fán szembetűnően látszik, hogy ezek a törzsek nem minden esetben állnak közeli rokonsági kapcsolatban, azonban további vizsgálatokat igényel annak feltárása, hogy milyen genetikai elemek felelősek az AFB1 biodegradációjában közreműködő enzimek termelődéséért. Az AFB1-detoxifikációra képes törzsek filogenetikai pozíciója alapján feltételezhető, hogy az enzimtermelése nem, vagy nem kizárólag kromoszómán kódolt, hanem mobilis genetikai elemek játszhatnak a folyamatban szerepet.



10. 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 nyugszik, és az 50% feletti értékek vannak jelölve (Mega 6).

5.1.2 A ZEA biodegradációja

A *Rhodococcus* típus törzsekkel végzett ZEA biodegradációs kísérlet 7 napon keresztül zajlott. A minták ösztrogénhatásának vizsgálatát a BLYES teszt szervezettel végeztem, valamint a tényleges hatás detektálásához az esetleges citotoxicitást is ellenőriztem a BLYR törzsszel. Az utóbbi törzs esetében a sejttöxicitást a fénykibocsátás csökkenése jelzi, mely egyik mintában sem volt detektálható, vagyis toxikus hatás nem lépett fel a vizsgált törzsek esetében. Ennek tükrében a BLYES teszt szervezettel kimutatott ösztrogénhatás, ill. annak hiánya ténylegesen a ZEA és bomlástermékeinek hormonhatását tükrözi. A típus törzsek esetében mért biolumineszcencia intenzifikációs (BI%) értékek a 10. táblázatban láthatók, ahol az intenzifikáció mértéke az ösztrogénhatás mértékével arányos. A biodetoxifikáció sikerességét aszerint határoztam meg, hogy a kísérlet végén, azaz a 7. napon kapott BI% hogyan változott a kiindulási intenzifikációhoz képest.

10. táblázat: Zearalenon biodegradációs kísérletbe vont *Rhodococcus* típus törzsek felülúszó 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. triatomae</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. biphenylvorans</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. sovatisensis</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

Félkövér >70% ösztrogénhatás csökkenés

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

¹ Korábban nem bizonyított ZEA biodetoxifikációs képességgel rendelkező törzsek

Néhány típus törzs (*R. fascians*, *R. aetherivorans*, *R. cerastii*, *R. kroppenstedtii*, *R. phenolicus*, *R. erythropolis*, *R. canchipurensis*, *R. triatoma*, *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 (10. táblázat). 13 törzs, a *R. kyotonensis* JCM 23211^T, *R. soli* JCM 19627^T, *R. agglutinans* KCTC 39118^T, *R. antrifimi* KCTC 29469^T, *R. rhodnii* JCM 3203^T, *R. koreensis* JCM 10743^T, *R. jostii* JCM 11605^T, *R. yunnanensis* JCM 13366^T, *R. opacus* JCM 9703^T, *R. nanhaiensis* DSM 45608^T, *R. defluvii* DSM 45893^T, *R. trifolii* DSM 45580^T, *R. lactis* DSM 45625^T esetében szignifikáns ($p < 0,05$), ám a gyakorlati felhasználás szempontjából igen kismértékű BI% csökkentést figyeltem meg. A 42 vizsgált törzs közül csak egy, a *R. percolatus* JCM 10087^T törzs volt képes az ösztrogénhatást nagyobb mértékben csökkenteni, melyet a BI% 70%-os csökkenése jelez. A törzs felülúszó mintáiban mért ösztrogénhatás mértékének 7 napon keresztül mért értékeit a 11. táblázatban tüntettem fel. Ahogy az a táblázatból is látható, JCM 10087^T törzs már a 2. napon képes volt szignifikáns mértékben csökkenteni a ZEA ösztrogénhatását a kontrollhoz viszonyítva, és a közel 70%-os biolumineszcencia csökkenés (740%-ról 224%-ra) a 6. napra következett be, mely tovább már nem csökkent.

11. táblázat: *Rhodococcus percolatus* JCM 10087^T zearalenon bontási kísérletből származó felülúszó minták biolumineszcencia intenzifikációs értékei, melyek a minta ösztrogénhatását jelzik. A kontrollhoz viszonyított szignifikáns csökkenést * jelöli ($p < 0,05$).

	Biolumineszcencia intenzifikáció (%)	
	ZEA kontroll	<i>R. percolatus</i> JCM 10087 ^T
0. nap	880 ± 4,60	902 ± 4,41
1. nap	966 ± 1,55	1037 ± 5,56
2. nap	951 ± 2,07	723* ± 8,68
3. nap	903 ± 1,23	496* ± 5,92
4. nap	838 ± 4,82	381* ± 2,69
5. nap	826 ± 4,44	318* ± 6,02
6. nap	740 ± 4,42	224* ± 4,73
7. nap	784 ± 4,72	256* ± 4,02

A legtöbb törzs 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 µg/mL ZEA-t mutattunk ki, ami az 1,171 µg/mL kontrollhoz képest 95%-os degradációt jelent. A törzs esetében a lebontást igazolja, hogy a pelleten kötött ZEA

koncentrációja 0,014 µg/mL volt, így az ténylegesen a sejt metabolikus aktivitásának köszönhető, nem pedig a sejtfalon történő adszorpciónak.

Összefoglalva a fenti eredményeket, a 42 vizsgált *Rhodococcus* típusörzs közül csak a *R. percolatus* JCM 10087^T tudta a ZEA ösztrogénhatását 70%-kal csökkenteni és a toxint szinte teljes mértékben lebontani. A faj ZEA-bontó és ösztrogénhatást csökkentő tulajdonságáról elsőként számoltam be.

Új tudományos eredmények

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

II. tézis (Az 5.1.2 alfejezetben ismertetett eredmények alapján): A 42 *Rhodococcus* nemzetséghez tartozó típusörzs 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.

Az I. és II. tézis eredményeit az alábbi publikációban adtuk közre:

Risa A., Krifaton Cs., Kukolya J., Kriszt B., Cserhádi M., Táncsics A. (2018): Aflatoxin B1 and zearalenone-detoxifying profile of *Rhodococcus* type strains. *Current Microbiology*, 75:907-917. IF: 1,373; Q2

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

A típusörzseket érintő vizsgálatokkal párhuzamosan, az AFB1 és ZEA detoxifikációjának vizsgálatára olyan törzseket alkalmaztam, melyek detoxifikációs képességéről élő sejtekkel végzett kísérletekben a Tanszékünk munkatársai korábban beszámoltak (KRIFATON ET AL., 2011; KRIFATON ET AL., 2013).

5.2.1 AFB1 detoxifikációja *Rhodococcus* törzsek sejtmentes kivonataival

Az AFB1 sejtmentes lebontására a *Rhodococcus erythropolis* NI1 és a *R. rhodochrous* NI2 törzset alkalmaztam. A tanszékünkön zajlott korábbi vizsgálatokban a szóban forgó törzsek képesek voltak az AFB1 ~98%-os biodegradációjára és a teljes detoxifikációjára 72 óra alatt (KRIFATON ET AL., 2011). A sejtmentes vizsgálat célja az volt, hogy megismerjem a bontásban résztvevő enzimek természetét, miszerint sejten belül végzik a lebontást, vagy pedig kiválasztódnak a sejten kívüli extracelluláris térbe. Vizsgáltam továbbá, hogy ezen enzimek konstitutívan vagy a toxin által indukálva termelődnek.

5.2.1.1 Fehérjekoncentráció meghatározása

A sejtmentes kivonatokban lévő fehérjekoncentrációt Bradford-módszerrel határoztam meg, ahol az ismeretlen fehérjéket a BSA-hoz hasonlítottam.

Az extracelluláris kivonatokban mért érték kevesebb volt, mint a sztenderd (BSA) sor legkisebb értéke, azaz ezeknek az extraktumoknak a fehérje tartalma <0,025 mg/mL volt. Az intracelluláris kivonatok fehérjekoncentráció értékei a 12. táblázatban szerepelnek a két törzs (NI1 és NI2) konstitutív és indukált kivonatai szerint elkülönítve. Az értékek között elhanyagolható különbséget tapasztaltam, a fehérjekoncentráció a kivonatokban 6 mg/mL körül volt. A feltárt fehérjék mennyisége feltételezhetően elegendő a toxin bontásához, hiszen más szerzők adatai szerint, a *R. erythropolis* DSM14303 és a *Mycobacterium fluoranthorivorans* sp. nov. DSM 44556^T törzsek intracelluláris kivonataiban mért 3,4 illetve 3,8 mg/mL fehérjekoncentrációt mértek, és a kivonatokkal 2,5 µg/mL AFB1-t kezelve 90%-os csökkentését érték el (TENIOLA ET AL., 2005).

12. táblázat: *Rhodococcus erythropolis* NI1 és *R. rhodochrous* NI2 intracelluláris kivonataiban mért fehérjekoncentráció

Fehérje-koncentráció	Intracelluláris kivonat	
	Konstitutív fehérjék [mg/mL]	Indukált fehérjék [mg/mL]
<i>R. erythropolis</i> NI1	6,09 ± 0,29	6,52 ± 0,50
<i>R. rhodochrous</i> NI2	5,95 ± 0,34	5,88 ± 0,98

5.2.1.2 A sejtmentes kivonatok biodetoxifikációs hatékonysága

A bontási kísérlet kezdeti (0. óra) és végpontjában (6. óra) vett minták genotoxicitását SOS-Chromo teszttel indukciós faktorban kifejezve határoztam meg, melyek a 13. táblázatban láthatóak. Biodetoxifikáció, azaz a genotoxicitás megszűnése abban az esetben következett be, amikor az IF szignifikánsan kisebb volt, mint 1,5 ($p < 0,05$).

Az NI1 és NI2 törzsek extracelluláris kivonatainak esetében sem a konstitutív, sem az indukált extraktumok nem tudták a genotoxicitást csökkenteni a mintákban. A kivonatokban mért IF értékek 2,49 és 2,95 között mozogtak, mely a kontrollhoz (átlag IF=2,61) viszonyítva szignifikánsan ($p < 0,05$) nem különbözött, így biodetoxifikációról az extracelluláris kivonatok esetében nem beszélhetünk. Ennek oka lehet az extracelluláris kivonatokban mért alacsony fehérjekoncentráció ($< 0,025$ mg/mL), mely koncentrációval talán hatékonyabbá tehető, vagy az, hogy e törzsek esetében a bontásért felelős enzimek nem extracellulárisan termelődnek.

Az extracelluláris kivonatokkal szemben az intracelluláris kivonatok sokkal hatékonyabbnak bizonyultak. A kísérlet végére (6. óra) minden mintában megszűnt a genotoxikus hatás, vagyis képesek voltak az AFB1 teljes detoxifikációjára, viszont ennek gyorsasága a különböző mintákban eltérő volt. Az NI1 konstitutív, valamint az NI2 konstitutív és indukált mintáiban nagymértékű genotoxicitás-csökkenés történt már az első mintavételt megelőzően, a 6. órában pedig nem detektáltam egyik extraktumban sem genotoxicitást. Az NI1 indukált extraktumára fontos felhívni a figyelmet, hiszen ebben a mintában a detoxifikáció már az első mintavételt megelőzően bekövetkezett (IF=1,19; $p < 0,05$).

Egy enzimalapú takarmányadalék esetében – mely az állat bélcsatornájában képes a mikotoxinok detoxifikációjára – a két legfontosabb limitáló tényező a hőmérséklet és a kémhatás. Az enzimaktivitás 40°C-ig növelhető, ezért a gyakorlati felhasználás céljából a testhőmérsékletnek megfelelő 37°C-ot választottam, valamint a gasztrointesztinális traktusban uralkodó enyhén lúgos kémhatás miatt vizsgáltam az intracelluláris kivonatok pH-toleranciáját és detoxifikációs hatékonyságát pH=7,5 és 8 kémhatáson is. Az NI1 és NI2 indukált enzimjei pH=7,5 kémhatáson azonnali detoxifikációt végeztek, melynél mindkét esetben IF=1,39 értéket mértem ($p < 0,05$). A konstitutív enzimek ezt az eredményt a 6. órára tudták elérni ($p < 0,05$). A kivonatok pH=8 kémhatáson való vizsgálata során csak az NI1 indukált extraktumában szűnt meg a genotoxicitás azonnal (IF=1,40; $p < 0,05$), és bár ennél a magasabb pH értéknél hosszabb időre volt szükség a többi mintában a detoxifikáció bekövetkezéséhez, a kísérlet 6 órás időtartamának végére a detoxifikáció pH=8 értéknél is minden mintában bekövetkezett. Az eredmények azt tükrözik, hogy mivel minden beállításnál detoxifikáció történt, az enzimek stabilak a beállított pH-tartományon belül.

13. táblázat: *Rhodococcus erythropolis* NI1 és *R. rhodochrous* NI2 sejtmintes 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])															

5.2.1.3 A sejtmentes kivonatokban mért AFB1-koncentráció

A semleges kémhatáson végzett kísérletben résztvevő kivonatok toxintartalma, azaz a biodegradációs hatékonyság ellenőrzése analitikai módszerrel (HPLC-FLD) történt. A pontos koncentráció értékek a 14. táblázatban láthatóak. Minden intracelluláris kivonat esetében 80%-nál magasabb biodegradációs hatékonyságot mértünk az AFB1 kontrollhoz viszonyítva. Az NI2 törzs indukált és konstitutív intracelluláris kivonatainak bontási hatékonysága megegyezett, a degradáció mértéke mindkét esetben 84% volt. Az NI1 intracelluláris kivonatai között sem kaptam jelentős különbséget, a konstitutív intracelluláris kivonatban kevesebb, mint 0,01 µg/mL AFB1-t mértünk, ami magasabb, azaz 91%-os eliminációnak felel meg, míg az NI1 intracelluláris indukált extraktumában 84%-os degradáció történt.

Annak érdekében, hogy bizonyítsam a degradáció enzimátikus voltát, a két törzs intracelluláris kivonatait proteináz K és 1% SDS keverékével kezeltem. A kezelés után az analitikai vizsgálat nem, ill. elhanyagolható mértékű toxincsökkenést mutatott a kontrollhoz képest az extraktumokban. A kezelés inaktíválta a bontásért felelős enzimeket, mely bizonyítja, hogy a kezeletlen kivonatokban enzimátikus degradáció következett be.

14. táblázat: *Rhodococcus erythropolis* NI1 és *R. rhodochrous* NI2 aflatoxin B1 bontási kísérletbe vont kezeletlen és proteináz 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 + proteináz K + SDS	0,986 ± 0,11	-
<i>R. erythropolis</i> NI1 konstitutív intracelluláris kivonata + proteináz K + SDS	0,887 ± 0,06	10 %
<i>R. rhodochrous</i> NI2 konstitutív intracelluláris kivonata + proteináz K + SDS	1,002 ± 0,15	0 %

Más szerzők által publikált adatokhoz viszonyítva eredményeimnek gyakorlati jelentősége nagy lehet, hiszen a detoxifikáció más, korábban leírt sejtmentes kivonatok esetében

jelentősen lassabban következett be. Például a *R. erythropolis* DSM 14303 törzs intracelluláris kivonatával, bár 1,75 µg/mL AFB1 90%-os degradációját érték el, de ehhez 72 órára volt szükség (TENIOLA ET AL., 2005). Egy évvel későbbi publikáció szerint ugyanennek a törzsnek az extracelluláris kivonata az említett koncentrációban alkalmazott toxin genotoxicitásának megszüntetésére is alkalmas volt, de szintén csak 72 óra elteltével (ALBERTS ET AL., 2006). *Stenotrophomonas*, *Bacillus* és *Pseudomonas* törzsek extracelluláris extraktumai 72 óra után 80%-ot meghaladó mértékben eliminálták a 100 ng/mL koncentrációjú AFB1 toxint (GUAN ET AL., 2008; GAO ET AL., 2011; SANGARE ET AL., 2014). *B. licheniformis* CFR1 törzs enzimátikus detoxifikációt 24 óra alatt végzett, ahol 500 ng/mL-es AFB1 koncentrációt alkalmaztak (RAKSHA RAO ET AL., 2017). ADEBO és mtsai által publikált eredmények alapján *Pseudomonas anguilliseptica*, *P. fluorescens*, *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus warneri*, *Sporosarcina* sp. és *Lysinibacillus fusiformis* intracelluláris kivonatait alkalmazva proteáz-inhibitor jelenlétében 12 óra elteltével a kiindulási 500 ng/mL AFB1 nem volt kimutatható, a citotoxikus hatás csökkenését bizonyították, ám a maradékanyagok genotoxikus hatását nem ellenőrizték (ADEBO ET AL., 2016a; ADEBO ET AL., 2016b). A szakirodalmi adatok szerint ezidáig csak gombákból (*Armillariella tabescens*, *Trametes versicolor*, *Phenophora* sp., *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *Phanerochaete sordida*) és egy baktériumfajból (*Myxococcus fulvus*) sikerült AFB1 bontásra képest enzimet izolálni (LIU ET AL., 2001; ZHAO ET AL., 2010).

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.

A III. tézis eredményeit az alábbi publikációban adtuk közre:

Risa A., Divinyi D.M., Baka E., Krifaton Cs. (2017): Aflatoxin B1 detoxification by cell-free extracts of *Rhodococcus* strains. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 64(4):423-438 p. IF=1,107; Q3

5.2.2 ZEA detoxifikációja sejtmentes kivonatokkal

A ZEA sejtmentes kivonatokkal végzett lebontására ismert ZEA-bontó képességgel rendelkező törzseket alkalmaztam (KRIFATON ET AL., 2013), melyek a *Rhodococcus*, *Gordonia*,

Pseudomonas és *Streptomyces* nemzetségekhez tartoztak. Kísérletemben arra kerestem a választ, hogy a sejtmentes kivonatok képesek-e a toxin lebontására és ösztrogénhatásának csökkentésére, valamint az átalakítási folyamatban résztvevő enzimek extra- vagy intracellulárisak, ill. konstitutívan vagy indukáltan termelődnek.

5.2.2.1 Fehérjekoncentráció meghatározása

A ZEA bontására használt sejtmentes kivonatok esetében elsőként azok fehérjekoncentrációját határoztam meg. Míg az AFB1 sejtmentes kivonatokkal történő bontása során a fehérjekoncentrációt Bradford módszerrel ellenőriztem, a ZEA esetében Pierce 660 nm módszert választottam, mert az utóbbi módszer az előzőhöz képest lineárisabb összefüggést mutat, így pontosabb mérést tesz lehetővé. Az extracelluláris kivonatokban lévő fehérjék mennyisége nem érte el a kimutatási határt (0,025 mg/mL), így a 15. táblázatban csak az intracelluláris fehérjék koncentrációs értékeit tüntettem fel.

15. táblázat: Zearalenon biodegradációs kísérletben vont törzsek intracelluláris kivonataiban mért fehérjekoncentráció Pierce 660 nm módszerrel meghatározva.

Fehérje-koncentráció	Intracelluláris kivonat	
	Konstitutív fehérjék [mg/mL]	Indukált fehérjék [mg/mL]
<i>P. pseudoalcaligenes</i> FEH28	2,21 ± 0,16	2,66 ± 0,01
<i>R. erythropolis</i> NI1	2,90 ± 0,14	2,96 ± 0,05
<i>R. pyridinivorans</i> AK37	2,64 ± 0,03	2,31 ± 0,54
<i>R. aetherivorans</i> AK44	2,34 ± 0,20	3,18 ± 0,05
<i>R. globerulus</i> N58	2,35 ± 0,06	2,08 ± 0,04
<i>R. pyridinivorans</i> K402	1,55 ± 0,05	1,56 ± 0,03
<i>R. pyridinivorans</i> K404	1,63 ± 0,08	1,68 ± 0,03
<i>R. pyridinivorans</i> K408	1,51 ± 0,16	1,36 ± 0,04
<i>R. ruber</i> N361	1,92 ± 0,01	2,74 ± 0,01
<i>G. paraffinivorans</i> NZS6	0,27 ± 0,05	0,26 ± 0,00
<i>S. cavourensis</i> K14	0,21 ± 0,04	0,32 ± 0,01

A vizsgált extraktumok közül az NZS6 és a K14 törzseknél nagyon kevés, ~0,2 mg/mL intracelluláris fehérjét sikerült feltárnom. Ehhez képest a *Pseudomonas* nemzetséghez tartozó FEH28 és az összes *Rhodococcus* törzs kivonataiban 2 mg/mL-hez közeli vagy azt meghaladó fehérjekoncentrációt mértem. A legmagasabb értéket a *R. erythropolis* NI1 indukált és konstitutív intracelluláris kivonatai esetében kaptam, mely majdnem elérte a 3 mg/mL-es értéket. SANGARE és mtsai 0,24 mg/mL fehérjekoncentrációjú sejtmentes kivonattal értek el 50%, 1,22 mg/mL koncentrációjú oldattal pedig 70%-körüli ZEA-bontást (SANGARE ET AL., 2014), így feltételeztem az általam mért értékek is megfelelőek a toxin bontásához.

5.2.2.2 Extracelluláris kivonatok biodetoxifikációs hatékonysága

A törzsek extracelluláris kivonatainak detoxifikációs tulajdonságát BLYES tesztel vizsgáltam, melynek eredményeit (BI%) a citotoxicitásra vonatkozó értékkel (BG%) kiegészítve a 16. táblázatban foglaltam össze. Minden törzs extracelluláris kivonata mellé olyan abiotikus kontrollt állítottam, melyet úgy készítettem el, hogy az extraktumokat fagyasztással-olvasztással inaktiváltam, majd mérés előtt kontamináltam ZEA-val (1µg/mL végkoncentráció). Ehhez viszonyítottam az aktív enzimeket tartalmazó kivonatokat, hogy a sejtek által termelt pigmentek okozta zavaró hatást kiküszöböljem (4.2.2. alfejezet).

16. táblázat: Zearalenon bontási kísérletbe vont baktériumtörzsek 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	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
<i>R. aetherivorans</i> AK44	771 ± 64	733 ± 53	764 ± 56	908 ± 83	883 ± 94	894 ± 99	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
<i>R. erythropolis</i> NI1	846 ± 66	833 ± 60	855 ± 50	929 ± 76	915 ± 63	910 ± 72	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
<i>R. globerulus</i> N58	900 ± 44	863 ± 48	888 ± 34	971 ± 59	954 ± 68	951 ± 70	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
<i>R. pyridinivorans</i> K404	783 ± 97	722 ± 78	727 ± 68	867 ± 48	809 ± 40	806 ± 75	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
<i>R. pyridinivorans</i> K402	777 ± 74	763 ± 69	743 ± 66	858 ± 51	814 ± 67	788 ± 48	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
<i>R. pyridinivorans</i> K408	799 ± 46	806 ± 86	765 ± 58	887 ± 84	869 ± 37	860 ± 51	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
<i>R. pyridinivorans</i> AK37	782 ± 37	791 ± 60	782 ± 66	854 ± 56	832 ± 63	820 ± 75	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
<i>R. ruber</i> N361	828 ± 65	810 ± 60	846 ± 65	995 ± 80	983 ± 57	975 ± 90	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
<i>S. cavourensis</i> K14	918 ± 105	848 ± 111	885 ± 107	909 ± 87	858 ± 93	857 ± 102	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.

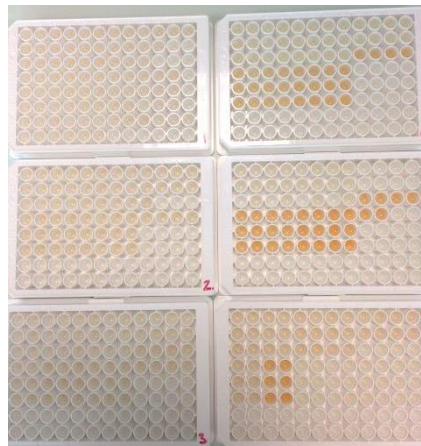
K Kontroll: A törzs extracelluláris kivonata 1 µg/mL ZEA-val kontaminálva
n.g. nincs gátlás

Az extracelluláris kivonatokban detektált ösztrogénhatás egyik törzs esetében sem mutatott szignifikáns csökkenést, így kijelenthetem, hogy a kivonatokban nem voltak olyan extracelluláris enzimek, melyek mérhető toxin-bontásáért felelősek. A BLYR törzzsel mért eredményeim alapján a *Gordonia paraffinivorans* NZS6 törzs indukált és konstitutív kivonatában erős (>70%) citotoxikus hatás volt mérhető. Ennek oka lehet a törzs

anyagcseretermék, melyet kiválasztott az extracelluláris térbe. A többi törzs extracelluláris extraktuma nem volt gátló hatással a BLYR tesztorganizetre.

5.2.2.3 Intracelluláris kivonatok biodetoxifikációs hatékonysága

Az intracelluláris kivonatokban mért biolumineszcencia intenzifikációs értékeket – melyek a minta ösztrogénhatásának mértékével arányosak – a 7. ábrán tüntettem fel. Az intracelluláris kivonatok esetében is olyan abiotikus kontrollt alkalmaztam, melyet az intracelluláris kivonat létrehozását követően annak az inaktiválása, majd toxinnal történő kontaminálása követett. Ehhez a kontrollhoz viszonyítottam az aktív kivonatok hatékonyságát. Ezzel a megoldással sikerül kiküszöbölnöm a biolumineszcenciát befolyásoló mátrix-hatást, melyet a törzsek által termelt különböző pigmentek okoztak (1. kép).



1. kép: *Rhodococcus* törzsek színes intracelluláris kivonatai a BLYES tesztben (saját fotó)

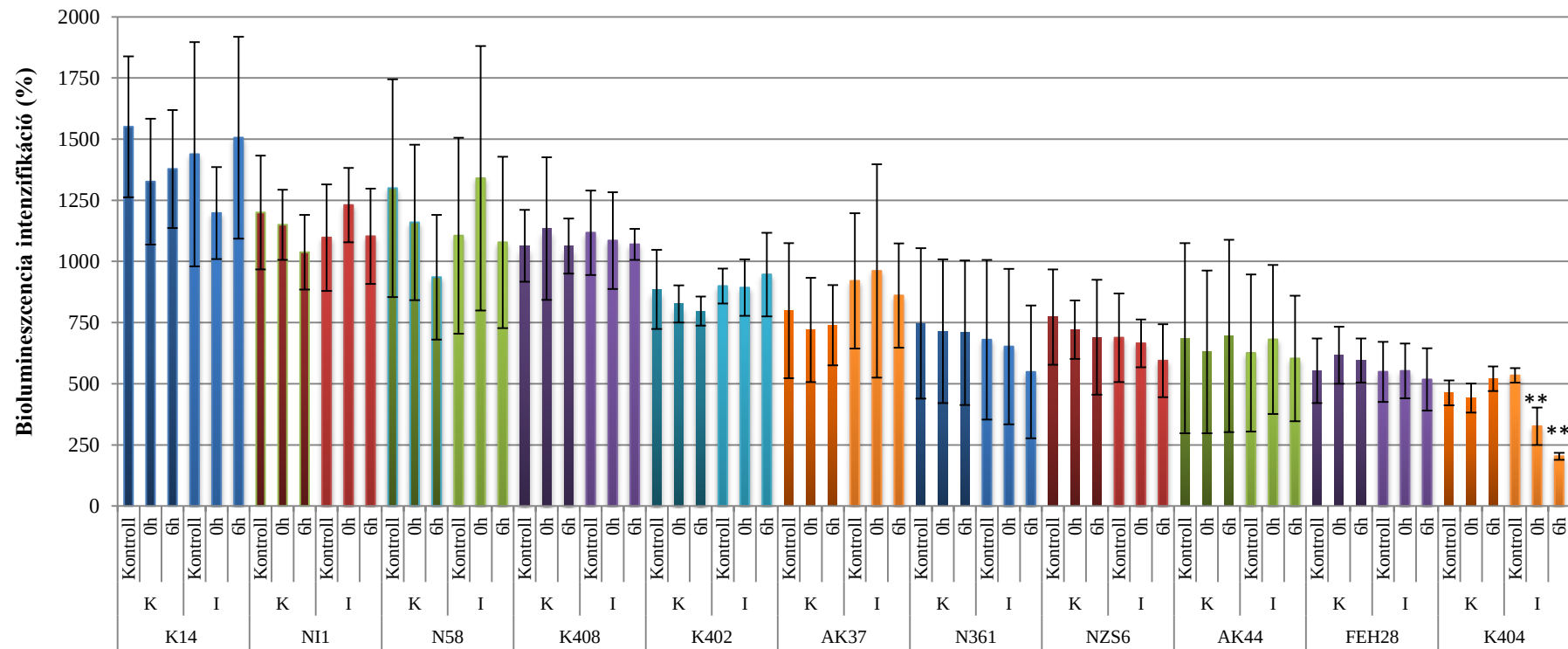
Elsőként a citotoxicitást értékeltem, melyet a BLYR tesztorganizetnél fellépő biolumineszcencia gátlásából származtattam. Három törzs, a K14, az AK44 és a FEH28 törzsek intracelluláris kivonatai mutattak sejtoxikus hatást a tesztorganizetre nézve. A K14 konstitutív és intracelluláris kivonataiban 20% körüli citotoxicitást detektáltam. Az AK44 és FEH28 törzs kivonata ettől erősebb gátló hatást eredményezett. Az AK44 konstitutív kivonataiban a citotoxicitás közepes mértékű (>30%) volt, ugyanennek a törzsnek az indukált kivonata pedig a 40%-ot is meghaladó jelentős mértékű sejtoxikus hatást mutatott. A legnagyobb biolumineszcencia gátlást a FEH28 konstitutív és indukált kivonataiban detektáltam, ahol a 70% körüli gátlás rendkívül erős citotoxikus hatást jelez. Ezeknél a törzseknél a BLYES által mért ösztrogénhatást a fentiek tükrében nem lehet megfelelően értékelni.

A többi törzs intracelluláris kivonatainak a BLYES tesztorganizet által detektált ösztrogénhatása értékelhető, mivel citotoxicitás nem volt tapasztalható a BLYR teszttel. Az N11, N58, K408, K402, AK37, N361 és NZS6 törzsek intracelluláris kivonatai nem mutatkoztak eredményesnek a ZEA detoxifikációja tekintetében (11. ábra). Sem a konstitutív, sem az indukált kivonatok nem okoztak szignifikáns különbséget a kontrollhoz viszonyítva.

A *R. pyridinivorans* K404 konstitutív kivonata sem bizonyult hatékonynak BLYES teszttel vizsgálva, indukált sejtmentes kivonata viszont szignifikáns ($p < 0,05$) mértékben csökkentette a ZEA ösztrogénhatását. Már a nulladik órában 40%-os biolumineszcencia

intenzifikáció csökkenést detektáltam ($p < 0,05$), mely a hatodik órára, több mint 60%-ot ért el ($p < 0,05$).

Analitikai elemzést a *R. pyridinivorans* K404 törzs konstitutív és indukált intracelluláris kivonataiból végeztünk, amelyek a 17. táblázatban láthatók. A konstitutív kivonatban nem mértünk koncentráció-csökkenést a kontrollhoz viszonyítva (a kapott magasabb érték mérési pontatlanság eredménye), amely alátámasztja a BLYES teszt eredményét. Az indukált kivonatban 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 tapasztalható koncentráció-csökkenés a kontrollhoz képest, a bontást végző enzimek inaktiválódtak, melynek következménye a degradáció hiánya.



11. ábra: Zearalenon bontási kísérletbe vont baktériumtörzsek 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.

17. 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 %

Összességében elmondható, hogy a vizsgált 11 törzs extra- és intracelluláris kivonata eltérő ZEA-detoxifikációs képességet mutatott, mint azok korábban leírt (KRIFATON ET AL., 2013) élő sejtekkel végzett kísérlet eredményei. A törzsek közül élő sejtekkel a *R. pyridinivorans* K402, K408, *Streptomyces cavourensis* K14 és a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* FEH28 80%-ot meghaladó bontást végzett, ám a sejtmentes kivonatok nem voltak hatékonyak, valószínűsíthetően ezen törzseknél a sejtfeltárás nem volt sikeres. A *Rhodococcus* törzsek esetében ennek oka a sejtfal speciális összetétele, mely arabinogalaktán-peptidoglikán komplexet, mikolsavat és hosszú szénláncú zsírsavakat tartalmaz (LARKIN ET AL., 2010), mely egyrészt ellenállóvá teszi őket, másrészt a sejtfeltárást is megnehezíti (NORAZAH ET AL., 2015). Továbbá HE és mtsai beszámoltak arról a jelenségről, miszerint az általuk vizsgált extracelluláris enzim immobilizációja növelte a lebontás mértékét (HE ET AL., 2016). Eredményeim szerint a K14, az AK44 és a FEH28 törzsek erős citotoxikus hatású anyagot termeltek, melyek a sejtfeltárás során a közegbe kerültek, ami az élő sejt lebontásánál nem jelentkezett. A *R. pyridinivorans* AK37, *R. erythropolis* NI1, *R. ruber* N361 és *G. paraffinivorans* NYS6 törzsek által végzett közepes ZEA-bontást a kivonatok nem tudták elvégezni. A *R. aetherivorans* AK44 és a *R. globerulus* N58 sem élő sejtekkel, sem sejtmentes kivonatokkal nem volt képes a ZEA lebontására, így kijelenthetem, hogy belőlük feltehetően hiányoznak, vagy inaktívak a lebontásért felelős enzimek. A vizsgált törzsek közül csak a *R. pyridinivorans* K404 indukált intracelluláris kivonata volt képes a ZEA 98%-nak degradációjára, illetve az ösztrogénhatásának >60%-os csökkentésére. Ugyanez a törzs élő sejtekkel 7 napos ZEA-bontási kísérletben 87%-os biodegradációt és az ösztrogénhatás megszűnését mutatta, tehát detoxifikációs hatékonysága, bár nagyobb mértékű, de sokkal lassabb volt.

A szakirodalomban megtalálható eredmények szerint más nemzetségek törzseinek sejtmentes kivonataival történő lebontás a legtöbb esetben 24 óra elteltével következett be. *Bacillus subtilis* törzs extracelluláris kivonata – az általam vizsgált törzsekhez hasonlóan – nem mutatott ZEA-bontó képességet, ellenben az intracelluláris kivonat az 1 µg/mL ZEA 55% degradációját eredményezte 24 óra elteltével (CHO ET AL., 2010). Ezzel szemben viszont másik két *Bacillus* törzs (*B. subtilis* 168, *B. natto* CICC 24640) extracelluláris kivonatai képesek voltak 500 ng/mL ZEA biodetoxifikációjára szintén 24 óra elteltével (TINYIRO ET AL., 2011). *Acinetobacter* sp. SM04 törzs extracelluláris kivonata egészen kiváló eredményt mutatott, hiszen 4 óra alatt a 20 µg/mL ZEA szinte teljes mértékű lebontását és ösztrogénhatásának 80%-os csökkentését végezte el (YU ET AL., 2011a). Azonban ennek a baktériumnak a faj szintű meghatározása hiányzik, így a használata egészségügyi kockázatot vethet fel, hiszen az *Acinetobacter* nemzetségben több fakultatív patogén faj található. Ezidáig ZEA-bontásra ill. detoxifikációra képes enzimeket többnyire gombák esetében írták le, melyek a következők: a *Clonostachys rosea* laktonohidroláz enzimje (TAKAHASHI-ANDO ET AL., 2002), a *Trametes versicolor* egy törzséből izolált lakkáz enzimje (BANU ET AL., 2013), valamint a *Saccharomyces cerevisiae* extracelluláris enoláz, NADH-citokróm b5 reduktáz és peroxiredoxin enzimjei (ZHANG ET AL., 2016). Az említett *Acinetobacter* sp. extracelluláris kivonatában peroxiredoxin, citokróm és fimbriális fehérjék aktiválódtak a ZEA bontása során (YU ET AL., 2011a, YU ET AL., 2011b).

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.

6 Következtetések és javaslatok

A *Rhodococcus* típustörzsekből 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 nem függ össze egyértelműen a rokonsági kapcsolataikkal.

A *Rhodococcus* típustörzsek 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 típustörzsek detoxifikációs képessége igazolja, hogy a *R. erythropolis* és *R. pyridinivorans* fajokhoz tartozó törzsek képesek az AFB₁ detoxifikációjára. A *R. erythropolis* fajhoz tartozó poliaromás szénhidrogénnel 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, melyek függvényében a mikrobák más és más katabolikus képességre tesznek szert, valamint szerepet játszhatnak a mobilis genetikai elemek (pl. plazmidok) is. Az AFB₁ lebontás további aktinobaktériumoknál is megfigyelhető, mint például a *Corynebacterium* (MANN – RHEM, 1976), a *Mycobacterium* (HORMISH ET AL., 2004), a *Cellulosimicrobium* (GUAN ET AL., 2008) és a *Streptomyces* (ESHELLI ET AL., 2015; HARKAI ET AL., 2016) nemzetségbe tartozó fajok esetében.

A *Rhodococcus* típustörzsek 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 korábban a *R. pyridinivorans* fajhoz tartozó K402, K404 és K408 törzsek ZEA-detoxifikációs képessége került bizonyításra (CSERHÁTI ET AL., 2013; KRIFATON ET AL., 2013). Ezzel szemben az általam vizsgált *R. pyridinivornas* típus-törzs (JCM 10940^T) nem képes a ZEA ösztrogénhatásának csökkentésére. Annak ellenére, hogy a K402, K404 és K408 törzsek szénhidrogénekkel szennyezett kárhelyekről, a típus-törzs 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. Ez a megállapítás is igazolja, hogy a ZEA-bontó képesség azonos fajhoz tartozó különböző törzsek esetében is nagy különbségeket mutathat. Az aktinobaktériumok közül a *Rhodococcus* nemzetség mellett *Streptomyces* törzsek ZEA-bontó tulajdonsága került bizonyításra ezidáig (EL-SHARKAWY – ABUL-HAJJ, 1988A, HARKAI ET AL., 2016; JARD ET AL., 2010), mely kutatásban én is közreműködtem.

Dolgozatom következő részében bizonyítottan toxinbontó képességgel rendelkező mikrobatorzsek **sejtmentes kivonatainak biodegradációs és biodetoxifikációs** hatékonyságát vizsgáltam.

Az **AFB1 sejtmentes kivonatokkal** végzett lebontása során, a bizonyítottan a toxin detoxifikálására képes *Rhodococcus erythropolis* NI1 és *R. rhodochrous* NI2 törzseket (KRIFATON ET AL., 2011) vizsgáltam. Bár az enzimeket nem azonosítottam, az NI1 és NI2 törzsek intracelluláris kivonataival teljes biodetoxifikációt értem el rendkívül gyorsan; egyes kivonatokban azonnal, ám minden esetben 6 órán belül. A kivonatokkal végzett detoxifikáció biztonsága és gyorsasága rendkívül fontos azok gyakorlati felhasználása során. Egy esetleges enzim alapú takarmány-adalékanyag – melynek előállítása egyszerű és költséghatékony – 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 *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). Egy friss tanulmány alapján, melyben AFB1 degradációt hajtottak végre az ATTC 4277 *R. erythropolis* típus-törzsszel feltételezhető, hogy az AFB1 biodegradációja több lépcsőben zajlik az aromás gyűrűt tartalmazó komponensekhez hasonlóan, mely folyamatban megjelennek a glikolízis és zsírsav metabolizmus melléktermékei, a végtermék pedig a C₁₃H₁₆O₄ vegyület (Eshelli et al., 2015).

A **ZEA sejtmentes kivonatokkal** végzett lebontása során ismert degradációs hatékonysággal (KRIFATON ET AL., 2013) rendelkező 11 baktériumtörzs extra- és intracelluláris kivonatait vontam kísérletbe, az enzimek alaptulajdonságainak megismerése céljából. 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 termelődött 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 ismételtlen kiemeli a biotesztek alkalmazásának nélkülözhetetlenségét, ugyanis az anyavegyület biodegradációjának ellenére, a folyamat eredményeként olyan bomlástermékek képződhetnek, melyek ösztrogénhatással rendelkeznek. A ZEA enzimatis lebontásáról 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.

Vizsgálataim során elsőként bizonyítottam *Rhodococcus imtechensis*, *R. tukisamuensis*, *R. rhodnii*, *R. aerolatus*, *R. enclensis*, *R. lactis*, *R. trifolii*, *R. qingshengii*, *R. artemisiae*, *R. baikonurensis*, *R. kroppenstedtii* és *R. corynebacterioides* fajok AFB1 és a *R. percolatus* faj ZEA detoxifikációs képességet, melyeket további vizsgálatok és gyakorlati felhasználás szempontjából szelektáltam. A sejtmentes vizsgálatokkal pedig célom volt, hogy megismerjem a toxinbontás enzimatis háttérét, mely lehetővé teszi a hatékony és biztonságos törzsek gyakorlati felhasználását a jövőben. A takarmányok, ill. élelmiszerek biológiai úton történő toxinmentesítéséhez, több kritériumnak kell megfelelni. A takarmány- és az élelmiszeriparban adalékanyagként, ill. enzimként vagy növényvédőszerként alkalmazható mikroorganizmusokat az EFSA egy minősítési rendszerben értékeli, mely szerint egy biztonságosnak ítélt szervezet ún. QPS-státuszt (Qualified Presumption of Safety) kap. Ennek a státusznak való megfelelés kritériumai az alábbiak:

- Taxonómiailag meg kell határozni
- A meglévő ismeretek alapján kell megítélnünk annak biztonságosságát
- A patogén, azaz megbetegedést okozó tulajdonságát ki kell zárni és azt bizonyítani
- A mikroorganizmus tervezett felhasználását részletesen ismertetni kell

Mindazon baktériumok, élesztőgombák és vírusok, melyek a fenti paraméterek szerint biztonságosnak minősülnek, rákerülnek az EFSA által közzétett QPS-listára. Az értékelési

rendszer 2007-ben hozták létre, ám azóta is folyamatosan újraértékelik és a listát bővítik ([http1](#)). 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 ([http2](#)), mely a fumonizinek lebontására alkalmas. Ezen kívül tisztított formában a *Trametes versicolor* egy törzséből izolált AFB1 bontására képes lakkáz enzimet a Merck (Németország) forgalmazza ([http3](#)).

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. Az egyik lehetséges, bár régi azonosítási módszer az ún. Edman degradáció, mely során az elválasztott peptidek (Western blot, SDS-PAGE) N-terminális aminosav-szekvenciáját határozzák meg. A körkörös reakció során minden ciklusban egy aminosavat hasítanak le a fehérjékről, amit ezután fordított fázisú kromatográfiával azonosítanak. Az Edman degradáció hátránya, hogy az ismeretlen fehérjének rendelkezni kell szabad N-terminális aminosavakkal, valamint a mintának minden zavaró anyagtól mentesnek kell lennie. 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. Az azonosítani kívánt fehérjét szilárd fázisból gáz fázisba juttatják és az ionizálás hatására az ismeretlen fehérjéhez kerülő proton töltésváltozást okoz, mely tömegspektrométerrel mérhető. A tömeg-töltés arány meghatározására szolgál a TOF, ahol az ionok – nagyságuktól függően – eltérő idő alatt kerülnek a detektorba vákuum hatására. Az így kapott tömegspektrum azonosítja a fehérjét. Előfordul, hogy két TOF analizátort használnak a MALDI mögött, mely az azonosításon túl szerkezeti információt is nyújt a fehérjére vonatkozóan. A mérés során kapott peptidtömegre vonatkozó adatokból egy adatbázis alapján kerül megfejtésre az ismeretlen fehérje. Ez a módszer rendkívül hatékony és előremutató, ám a hátránya, hogy a keresett fehérje tömege az adatbázisban megtalálható kell, hogy 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. Az extracelluláris kivonatban található fehérjét SDS-PAGE módszerrel elválasztották, majd MALDI-TOF/TOF/MS módszerrel kilenc fehérjét sikerült azonosítaniuk (YU ET AL., 2011a). Az ESI során az ismeretlen anyag nem szilárd, hanem folyadékfázisból kerül a gáz fázisba, ahol magasfeszültség hatására egy kapillárison át vándorol, majd elpárologtatják, így ionizálódik és a tömegspektrométerbe jut (DEUTZMANN, 2004). Ezzel a 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 állapotát és a 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, majd 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 enzim alapú takarmány-adalékanyag fejleszthető, mely biztonságosan, gyorsan és hatékonyan képes szembeszállni a takarmányok mikotoxin-szennyezettségével.

7 Összefoglalás

A fonalas gombák világszerte súlyos problémát okozó toxinjai, a mikotoxinok már az 1900-as évek közepe óta szerepelnek a köztudatban. Gabonanövényeken megjelenve, az azokból készült takarmányok és élelmiszerek fogyasztása révén a mikotoxinok – rendkívül sokféle hatásuk miatt – súlyos megbetegedéseket okoznak állatokban és emberekben egyaránt. Az élelmiszerbiztonsági kockázat fennállása miatt elterjedtek ún. *pre-* és *post-harvest*, vagyis betakarítás előtti és utáni technológiák, melyeknek a megelőzés vagy a penészes és toxinos takarmány elkülönítése a célja. Ám ezek kevésbé hatékonyak, így szükség volt a takarmányok toxinmentesítésére is módszereket fejleszteni. A kémiai kezelés és a fizikailag történő toxin-megkötés mellett talán a legelőremutatóbb módszer a biológiai mentesítés, melynek során mikroorganizmusok, vagy azok enzimei végzik a toxinok lebontását. Ennek során viszont nem elég csak degradációt elérni, hanem nélkülözhetetlen az átalakítási folyamatokban megjelenő káros hatással rendelkező metabolitokat is eliminálni. Összegezve tehát a takarmányok detoxifikációja a cél.

Doktori munkám során a rákkeltő aflatoxin B1 (AFB1) és az ösztrogénhatású zearalenon (ZEA) toxinokkal foglalkoztam. Célkitűzéseim között szerepelt, hogy az ismerten kiváló katabolikus képességgel rendelkező *Rhodococcus* nemzetség 42 típustörzsének AFB1- és ZEA-degradációs képességét megismerjem, valamint a lebontási folyamat biztonságát értékeljem. A káros hatású metabolitok megjelenését az AFB1 esetében a genotoxicitás mérésére alkalmas SOS-Chromo teszttel, a ZEA esetében pedig az ösztrogénhatást kimutató BLYES teszttel ellenőriztem. A kísérletben a vizsgált 42 törzs közül 18 törzs AFB1-degradációs képességét mutattam ki, melyek közül 15 volt képes a genotoxicitást is megszüntetni. Az eddig ismert szakirodalmi adatok szerint először sikerült bizonyítani a *R. imtechensis*, *R. tukisamuensis*, *R. rhodnii*, *R. aerolatus*, *R. enclensis*, *R. lactis*, *R. trifolii*, *R. qingshengii*, *R. artemisiae*, *R. baikonurensis*, *R. kroyenstedtii* és *R. corynebacterioides* fajokról, hogy képesek az AFB1 detoxifikációjára. Ugyanezek a törzsek ZEA bontás tekintetében kevésbé bizonyultak hatékonyak, hiszen csak egy törzs, a *R. percolatus* JCM 10087^T volt képes a ZEA-t 95%-ban degradálni és ösztrogénhatását 70%-kal csökkenteni. Erről a fajról szintén elsőként sikerült a ZEA-bontó tulajdonságot kimutatni.

További célkitűzéseim között szerepelt, hogy korábban vizsgált és ismert detoxifikációs képességgel rendelkező törzsek sejtmentes kivonataival érjek el AFB1 és ZEA detoxifikációt, valamint megismerjem, hogy a folyamatban résztvevő enzimek konstitutívan, vagy a toxin hatására indukáltan termelődnek, illetve, hogy ezek az intracelluláris térben maradnak, vagy a sejt kiválasztja azokat az extracelluláris térbe. Az AFB1 detoxifikációjának vizsgálatára a

Rhodococcus erythropolis NI1 és a *R. rhodochrous* NI2 törzsek kivonatait alkalmaztam. Vizsgálataimban sem az indukált, sem a konstitutív extracelluláris enzimek nem tudták a genotoxicitást csökkenteni, viszont az intracelluláris kivonatokban minden beállításban detoxifikáció történt. A konstitutív és az indukált enzimek hatékonyságát tekintve nem volt különbség, hiszen a genotoxicitás 6 óra alatt megszűnt. Az analitikai eredmények igazolták az intracelluláris kivonatokban bekövetkező 80% fölötti lebontást, a proteináz K és SDS keverékével végzett kísérlet pedig az enzimátikus detoxifikációt is igazolta. Vizsgálataim kimutatták továbbá, hogy a detoxifikációban résztvevő enzimek stabilak pH=7-8 között.

A ZEA sejtmentes kivonatokkal végzett vizsgálatára nyolc *Rhodococcus*, egy *Pseudomonas*, egy *Streptomyces* és egy *Gordonia* törzset alkalmaztam. Az extracelluláris kivonatok vizsgálata során egy törzs kivonata (*Gordonia paraffinivorans* NZS6) erős (70% fölötti) citotoxicitást mutatott, viszont egyik törzs kivonata sem volt képes az ösztrogénhatást csökkenteni. Az intracelluláris kivonatok esetében három törzs (*Streptomyces cavourensis* K14, *Rhodococcus aetherivorans* AK44, *Pseudomonas pseudoalcalignes* FEH28) termelt valamilyen sejtoxikus anyagot. Biodetoxifikáció tekintetében egy törzs a *Rhodococcus pyridinivorans* K404 kivonata csökkentette az ösztrogénhatást 60%-kal, sőt az említett eredmény csak az indukált kivonatban volt megfigyelhető. Az analitikai mérések igazolták a K404 baktériumtörzs indukált intracelluláris kivonatában enzimátikus úton bekövetkezett 95%-os toxinkoncentráció csökkenést, melyet a proteináz K + 1% SDS keverékével végzett kezelés is megerősített.

Eredményeimmel sikerült átfogó képet kapnom a *Rhodococcus* nemzetség AFB1- és ZEA-detoxifikációs képességéről, és eddig a szakirodalomban még le nem írt detoxifikációs képességről számoltam be egyes fajok tekintetében. A sejtmentes kivonatokkal is sikerült hatékony detoxifikációt elérni, melyek az ismert szakirodalmi adatokkal ellentétben – ahol a toxinok lebontása 24-72 óra között zajlik – rendkívül gyorsan, hat órán belül végzik degradációt és a detoxifikációt. Ezek a törzsek – a toxinok detoxifikációjában szerepet játszó enzimek beazonosítását követően – hatékonyan alkalmazhatóak lehetnek takarmányok toxinmentesítésére. A termékek gyorsan és biztonságosan képesek lehetnek az AFB1 és a ZEA detoxifikációjára, így hozzájárulhatnak az állatok és közvetve az emberek egészségének a megőrzéséhez is.

8 English Summary

Mycotoxins produced by moulds are known since the middle of 1900 and cause huge problems worldwide. They occur in cereals which are commodities of food and feed, thus they can cause serious illnesses in humans and animals due to their hazardous biological effects. Eliminating mycotoxins, pre- and post-harvest technologies are used for preventing mould infection or selecting contaminated grains. Beside these less effective methods, detoxification can be carried out by physical adsorption, chemical reaction, but application of microorganisms or their enzymes for such purpose is the most promising way. During the biological detoxification processes, not only the degradation of mycotoxins is the main target but toxic effects of breakdown products derived from the parent compounds need to be eliminated as well.

In my Ph.D. work, the carcinogenic aflatoxin B1 (AFB1) and estrogen-analogue zearalenone (ZEA) were analysed. Aims of this study were (1) the evaluation of the AFB1 and ZEA-degrading ability of *Rhodococcus* type strains which genus is known to have remarkable catabolic potential, moreover (2) the examination of the safety of the degradation process. The genotoxic effects of metabolites derived from AFB1 were measured by SOS-Chromotest, and the estrogenic products of ZEA were detected by BLYES test. Out of 42 analysed strains, 18 strains degraded AFB1, among which 15 strains were able to eliminate the genotoxic effects of the parent compound and metabolites, respectively. The AFB1-detoxification ability of species *Rhodococcus imtechensis*, *R. tukisamuensis*, *R. rhodnii*, *R. aerolatus*, *R. enclensis*, *R. lactis*, *R. trifolii*, *R. qingshengii*, *R. artemisiae*, *R. baikonurensis*, *R. kroppenstedtii*, and *R. corynebacterioides* has been confirmed in this research first time. These strains were less effective regarding ZEA-degradation, thus only one strain, *R. percolatus* JCM 10087^T, could degrade 95% of the mycotoxin and decrease its estrogenic effect with 70%. Additionally, the ZEA-degradation potential of this species was confirmed in this work first time.

Further aims of this research were AFB1 or ZEA detoxification with cell-free extracts of strains which degradation ability is known by living cells. Besides screening their effectiveness, features of enzymes playing a key role in these processes were analysed; (i) whether enzyme-production occurs constitutively or induced, moreover (ii) whether they act in the intracellular compartment or they are excreted into the extracellular matrix. For the detoxification of AFB1, cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* NI1 and *R. rhodochrous* NI2 strains were used. According to my results, neither the induced extracellular enzymes, nor the constitutively produced extracellular enzymes could cease the genotoxicity, but detoxification occurred in the intracellular extracts. There was no difference between induced and constitutively produced

enzymes since the hazardous effect was ceased in six hours in both cases. Analytical results confirmed >80% degradation of AFB1 in intracellular extracts and the results derived from the proteinase K and SDS treatment proved that the degradation process was managed by enzymes. In this research, the enzymes playing role in the detoxification have been proven to be stable between pH 7 and 8 additionally.

For the biodegradation of ZEA with cell-free extracts, 8 *Rhodococcus*, 1 *Pseudomonas*, 1 *Streptomyces* and 1 *Gordonia* strains proved to have ZEA-degrading ability, were applied. Extracellular extracts of one (*Gordonia paraffinivorans* NZS6) of the analysed strains showed strong (70%) cytotoxic effect furthermore none of the extracellular extracts were able to decrease the estrogenic potential. In the intracellular extracts of three strains (*Streptomyces cavourensis* K14, *Rhodococcus aetherivorans* AK44, *Pseudomonas pseudoalcalignes* FEH28), cytotoxicity was observed. Intracellular extract of only one strain, *R. pyridinivorans* K404, were able to decrease the estrogenic effect with more than 60%, which was observed in the induced extracts, but constitutively produced enzymes were not able to eliminate the hazardous effect. The analytical results confirmed 95% ZEA degradation in the induced intracellular extracts and the enzymatic process was proved by proteinase K and SDS treatment as well.

In the present work, AFB1 and ZEA-degradation potentials of the *Rhodococcus* genus were revealed, furthermore mycotoxin detoxification ability of some species has been proven first. Detoxification of AFB1 and ZEA was revealed by cell-free extracts of *Rhodococcus* strains, additionally, the process was faster compared to results published in the literature until now. These effective strains, after the identification of their enzymes could play a key role in toxin degradation, and would be applicable as enzyme-based feed additives for feed detoxification. These products would be able to cease the hazardous effects of AFB1 or ZEA helping the protection of animals and human health.

9 Mellékletek

M1. Irodalomjegyzék

- ABRAHAM, J., SHANKER, A., SILAMBARASAN, S. (2013): Role of *Gordonia* sp JAAS1 in biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysing metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. *Letters in Applied Microbiology*, 57(6):510-516 p.
- ADEBO, O.A., NJOBEH, P.B., MAVUMENGWANA, V. (2016B): Degradation and detoxification of AFB1 by *Staphylococcus warneri*, *Sporosacina* sp. and *Lysinibacillus fusiformis*, *Food Control*, 68:92-96 p.
- ADEBO, O.A., NJOBEH, P.B., SIDU, S., TLOU, M.G., MAVUMENGWANA, V. (2016A): Aflatoxin B1 degradation by liquid cultures and lysates of three bacterial strains. *International Journal of Food Microbiology*, 133:11-19 p.
- ALBERTS, J.F., ENGELBRECHT, Y., STEYN, P.S., HOLZAPFEL, D.H., VAN ZYL, W.H. (2006): Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International journal of Food Microbiology*, 109:121-126 p.
- ALBERTS, J.F., GELDERBLOM, W.C.A., BOTHA, A., VAN ZYL, W.H. (2009): Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 135:47-52 p.
- ALTALHI, A.D. (2007): Plasmid-mediated detoxification of mycotoxin zearalenone in *Pseudomonas* sp. ZEA-1. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 3(3):150-158 p.
- ALTALHI, A.D., EL-DEEB, B. (2009): Localization of zearalenone detoxification gene(s) in pZEA-1 plasmid of *Pseudomonas putida* ZEA-1 and expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials*, 161:1166-1172 p.
- ALTUG, T., YOUSSEF, A.E., MARTH, E.H. (1990): Degradation of aflatoxin B1 in dried figs by sodium bisulfide with or without heat, ultraviolet energy or hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection*, 53:581-582 p.
- ANTHARAVALLY, B.S., MALLIA, K.A., RANGARAJ, P., HANEY, P., BELL, P.A. (2009): Quantification of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Analytical Biochemistry*, 385(2):342-345 p.
- ARAI, T., ITO, T., KOYAMA, Y. (1967): Antimicrobial activity of aflatoxins. *Journal of Bacteriology*, 93(1): 59-64 p.
- ARENSKÖTTER M., BRÖKER, D., STEINBÜCHEL, A. (2004): Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3195-3204 p.
- BANU, I, LUPUL A., APRODU, I. (2013): Degradation of zearalenone by laccase enzyme. *Scientific Study and Research*, 14(2):079-084 p.
- BATA, Á, RAFAI, P., KOVÁCS, G. (2001): Investigation and a new evaluation method of the resistance of maize hybrids grown in Hungary to *Fusarium* moulds. *Journal of Phytopathology*, 149(2):107-111 p.
- BELHASSEN, H., JIMENEZ-DÍAZ, I., ARREBOLA, J.P., GHALI, R., GHORBEL, H., OLEA, N., HEDILI, A. (2015): Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: A case-control study in Tunisia. *Chemosphere*, 128:1-6 p.
- BELL, K.S., PHILP, J.C., AW, D.W., CHRISTOFI, N. (1998): The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2):195-210 p.
- BENIMELI, C.S., FUENTES, M.S., ABATE, C.M., AMOROSO, M.J. (2008): Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61(3):233-239 p.
- BENNETT, J.W., KLICH, M., (2003): Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16:497-516 p.

- BINAZADEH M., KARIMI I.A., LI Z. (2009): Fast biodegradation of long chain *n*-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449. *Enzyme and Microbial Technology*, 45:195-202 p.
- BRADFORD, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254 p.
- 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.
- BUSK, O.L., NDOSSI, D., VERHAEGEN, S., CONNOLLY, L., ERIKSEN, G., ROPSTAD, E., SORLIE, M. (2011): Relative quantification of the proteomic changes associated with the mycotoxin zearalenone in the H295R steroidogenesis model. *Toxicon*, 58:533-542 p.
- CALOW, P. (SZERK.) (1993): Handbook of Ecotoxicology, Blackwell Science Ltd., 487 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.
- CHATER, K.F., BÍRÓ, S., LEE, K.J., PALMER, T., SCHREMPF, H. (2010): The complex extracellular biology of *Sterptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34:171-198 p.
- CHAUDHARY, P., SHARMA, R., SINGH, S.B., NAIN, L. (2011): Bioremediation of PAH by *Streptomyces* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(3):268-271 p.
- CHELACK, W.S., BORSA, J., MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A. (1991): Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* NRRL 3174. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9):2492-2496 p.
- CHELOUFI, R., MESSAADIA, H., ALAYAT, H. (2017): Biodegradation of herbicides by *Pseudomonas aeruginosa* in two soils types of the Bou Namoussa irrigable perimeter (Algerian Extreme Northeast): Effects on mineral nutrition (P_2O_5 and NO_3^-). *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(7):2513-2521 p.
- CHEN, Y., KONG, Q., CHI, CH, SHAN, S., GUAN, B. (2015): Biotransformation of aflatoxin B1 and aflatoxin G1 in peanut meal by anaerobic solid fermentation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus dlbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *International Journal of Food Microbiology*, 211(15):1-5 p.
- CHERAGHI, S., RAZI, M., MALEKINEJAD, H. (2015): Involvement of cyclin D1 and E2f1 in zearalenone-induced DNA damage in testis of rats. *Toxicon*, 106:108-116 p.
- CHO, K.J., KANG, J.S., CHO, W.T., LEE, C.H., HA, J.K., SONG, K.B. (2010): *In vitro* degradation of zearalenone by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 32:1921-1924 p.
- CHRISTENSEN, C.M., KAUFMANN, H.H. (1969): Grain storage. The role of fungi in quality loss. University of Minnesota Press, Minneapolis, USA, 159 p.
- CIEGLER, A., LILLEHOJ, E.B., PETERSON, R.E., HALL, H.H. (1966): Micorbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology*, 14(6):934-939 p.
- COLE, R.J., BLANKENS, B.R., KIRSKEY, J.W. (1972): Conversion of aflatoxin B1 to isomeric hydroxy compounds by *Rhizopus* spp. *Journal of Agrucultural and Food Chemistry*, 20(6):1100 p.
- COOK, M., HÜTTER, R. (1986): Ring dechlorination pf deethylsimazine by hydrolases from *Rhodococcus corallines*. *FEMS Microbiology Letters*, 34(3): 335-338 p.
- CROWLE, A.J. (1962): *Corynebacterium rubrum* nov. spec. A gram-positive nonacid-fast bacterium of unusually high lipid content. *Antonie Van Leeuwenhoek* 28:183-192 p.
- CSEH S., KOVÁCS M. (2010): Mikotoxin reprodukcióra kifejtett hatásai. In: Kovács M. (2013): Aktualitások a mikotoxin kutatásban. Agroiinform Kiadó, Budapest, 382 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.
- DAS, A., BHATTACHARYA, A., PALANISWAMY, M., ANGAYARKANNI, J. (2015): Aflatoxin By degradation during co-cultivation of *Aspergillus flavus* and *Pleurotus ostreatus* strains on rice straw. *3 Biotech*, 5(3):279-284 p.
- DASTAGER, S.G., MAWLANKAR, R., TANG, S.K., KRISHNAMURTHI, S., VENKATA RAMANA, V., JOSEPH, N., SHOUCHE, Y.S. (2014): *Rhodococcus enclensis* sp. nov., a novel member of the genus *Rhodococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64:2693-2699 p.
- DETROY, R.W., HESSELTINE, C.W. (1969): Transformation of aflatoxin B1 by steroid-hydroxylating fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 15(6):495-500 p.
- DEUTZMANN, R. (2004): Structural characterization of proteins and peptides. *Methods in Molecular Medicine*, 94:269-297 p.
- DIENER, U.L., COLE, R.J., SANDERS, T.H., PAYNE, G.A., LEE, L.S., KLICH, M.A. (1987): Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus Flavus**. *Annual Review of Phytopathology*, 25:249-270 p.
- DIENER, U.L., DAVIS, N.D. (Auburn Univ., A. (USA) A. A. E. S. (1987). Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. International Maize and Wheat Improvement Centre, Library, CIMMYT.
- DING, X., LICHTI, K., STAUDINGER, J.L. (2006): The mycoestrogen zearalenone induces CYP3A through activation of the pregnane X receptor. *Toxicological Sciences*, 91:448-455 p.
- DOERR, J.A., OTTINGER, M.A. (1980): Delayed Reproductive Development Resulting from Aflatoxicosis in Juvenile Japanese Quail. *Poultry Science*, 59(9):1995-2001 p.
- DRZYGA, O., FERNÁNDEZ DE LAS HERAS, L., MORALES, V., NAVARRO LLORENS, J.M., PERERA, J. (2011): Cholesterol degradation by *Gordonia cholesterolivorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14):4802-4810 p.
- EBELING, W., HENNRICH, N., KLOCKOW, M., METZ, H., ORTH, H.D., LANG, H. (1974): Proteinase K from the mold *Tritiachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry*, 47:91-97 p.
- EFSA – BOUDERGUE, C., BUREL, C., DRAGACCI, S., FAVROT, M.C., FREMY, J.M., MASSIMI, C., PRIGENT, P., DEBONGNIE, P., PUSSEMIER, L., BOUDRA, H., MORGAVI, D., OSWALD, I., PEREZ, A., AVANTAGGIATO, G. (2009): Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *EFSA Scientific Report*, 1-192 p.
- EFSA - EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ), A. RICCI, A. ALLENDE, D. BOLTON, M. CHEMALY, R. DAVIES, R. GIRONES, L. HERMAN, K. KOUTSOUMANIS, R. LINDQVIST, B. NØRRUNG, L. ROBERTSON, G. RU, M. SANAA, M. SIMMONS, P. SKANDAMIS, E. SNARY, N. SPEYBROECK, B.T. KUILE, J. THRELFALL, H. WAHLSTRÖOM, P.S. COCCONCELLI, G. KLEIN (DECEASED), M.P. MARADONA, A. QUEROL, L. PEIXE, J.E. SUAREZ, I. SUNDH, J.M. VLAK, M. AGUILERA-GOMEZ, F. BARIZZONE, R. BROZZI, S. CORREIA, L. HENG, F. ISTACE, C. LYTHGO, P.S. F. ESCAMEZ (2017): Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal*, 15(3):4664 p.
- EFSA - EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM) (2016): Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *EFSA Journal*, 14(1):4425 p.
- EFSA – EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM), KNUTSEN, H.K., ALEXANDER, J., BARREGARD, L., BIGNAMI, M., BRÜSCHWEILER, B., CECCATELLI, S., COTTRILL, B., DINOVI, M., EDLER, L., GRASL-KRAUPP, B., HOGSTRAND, C., HOOGENBOOM, L., NEBBIA, C.S., OSWALD, I.P., ROSE, M., ROUDOT, A.C., SCHWEDTLE, T., VLEMINCKX, C., VOLMER, G., WALLACE, H., FÜRST, P., BAERT, K., ABRAHANTES, J.C., DUJARDIN, B., FERRINI, PETERSEN, A. (2018): Effect on public health of a possible increase of the

- maximum level for 'aflatoxin total' from 4 to 10 µg/kg in peanuts and processed products thereof, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuff. *EFSA Journal*, 16(2):5175 p.
- EFSA (2010): Statement on the establishment of guidelines for the assessment of additives from the functional group 'substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins'. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *EFSA Journal*, 8(7):1693 p.
- EFSA (2011): Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone on food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, *EFSA Journal*, 9(6):2197 p.
- EISSA, H.F., HASSANIEN, S.E., RAMADAN, A.M., EL-SHAMY, M.M., SALEH, O.M., SHOKRY, A.M., ABDELSATTAR, M., MORSY, Y.B., EL-MAGHRABY, M.A., ALAMELDIN, H.F., HASSAN, S.M., OSMAN, G.H., MAHFOUZ, H.T., GAD EL-KARIM, G.A., MADKOUR, M.A., BAHIELDIN, A. (2017): Developing transgenic wheat to encounter rusts and powdery mildew by overexpressing barley *chi26* gene for fungal resistance. *Plant Methods*, 13:41 p.
- ELAASSER, M.M., MAGDI, H.M., MOURAD, M.H., AHMED, H.Y. (2017): Fungal detoxification of certain *Fusarium moniliforme* mycotoxins using *Yarrowia lipolytica* with special emphasis on its possible mechanism of action. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12(1):63-73 p.
- ELDRIDGE, M.L., SANSEVERINO, J., LACTON, A.C., EASTER, J.P., SCHULTZ, W., SAYLER, G.S. (2007): *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS, a new bioluminescent bioreporter for detection of androgenic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19):6012-6018 p.
- EL-NEZAMI, H., KANKAANPAA, P.E., SALMINEN, S., AHOKAS, J.T. (1998): Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 36:321-326 p.
- EL-NEZAMI, H.S., POLYCHRONAKI, N., SALMINEN, S., MYKÄNEN, H. (2002): Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7):3545-3549 p.
- EL-SHARKAWY, S.H., ABUL-HAJJ, Y.J. (1987): Microbial transformation of zearalenone, I. formation of zearalenone-4-O- β -glucoside. *Journal of Natural Products*, 50(3):520-521 p.
- EL-SHARKAWY, S.H., ABUL-HAJJ, Y.J. (1988A): Microbial transformation of zearalenone, II. Reduction, hydroxylation and methylation products. *The Journal of Organic Chemistry*, 53:515-519 p.
- EL-SHARKAWY, S.H., ABULL-HAJJ, Y.J. (1988B): Microbial cleavage of zearalenone. *Xenobiotica*, 18(4):365-371 p.
- EL-SHARKAWY, S.H., SELIM, M.I., AFIFI, M.S., HALAWEISH, F.T. (1991): Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2):549-552 p.
- ESHELLI, M., HARVEY, L., EDRADA-EBEL, R., MCNEIL, B. (2015): Metabolomics of the biodegradation process of aflatoxin B1 by *Actinomycetes* at an Initial pH of 6.0. *Toxins*, 7:439-456 p.
- FARZANEH, M., SHIE Z.Q., GHASSEMPOUR, A., SEDAGHAT, N., AHMADZADEH, M., MIRABOLFTHY, M., JAVAN-NIKKHAH, M. (2012): Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food Control*, 23:100-106 p.
- FINNERTY, W.R. (1992): The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annual Review of Microbiology*, 46:193-218.
- FLEMING, S., YOUNGMAN, L., AMES, B. (1994): Intestinal cell proliferation is influenced by intakes of protein and energy, aflatoxin, and whole body radiation. *Nutrition and Cancer*, 22:11-30 p.

- GAO, X., MA, Q., ZHAO, L., LEI, Y., SHAN, Y., JI, C. (2011): Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxin B1, M1, and G1 detoxification. *European Food Research and Technology*, 232:957-962 p.
- GHOSH, A., PAUL, D., PRAKASH, D., MAYILRAJ, S., JAIN, R.K. (2006): *Rhodococcus imtechensis* sp. nov., a nitrophenol-degrading actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:1965-1969 p.
- GOODFELLOW, M. (1984): Reclassification of *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson in the Genus *Rhodococcus*, as *Rhodococcus fascians* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 5:225-229 p.
- GOODFELLOW, M., ALDERSON, G. (1977): The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the “rhodochrous” complex. *Journal of Genetic Microbiology*, 100:99-122 p.
- GOODFELLOW, M., CHUN, J., STACHEBRANDT, E., KROPPESTEDT, R.M. (2002): Transfer of *Tsukamurella wratislaviensis* Goodfellow et al. 1995 to the genus *Rhodococcus* as *Rhodococcus wratislaviensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:749-755 p.
- GOODFELLOW, M., JONES, A.L., MALDONADO, L.A., SALANITRO, J. (2004): *Rhodococcus aetherivorans* sp. nov., a new species that contains methyl t-butyl ether-degrading actinomycetes. *Systematic and Applied Microbiology*, 27:61-65 p.
- GOODFELLOW, M., WEAVER, C.R., MINNIKIN, D.E. (1982): Numerical classification of some *Rhodococci*, *Corynebacteria* and related organisms. *Journal of Genetic Microbiology*, 128:731-45 p.
- GOODFELLOW, M., ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J., THOMAS, E.G., MORDARSKI, M., WARD, A.C., JAMES, A.L. (1995): *Tsukamurella wratislaviensis* sp. nov. in validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 95:418-419p.
- GROMADZKA, K., WASKIEWICZ, A., CHELKOWSKI, J., GOLINSKI, P. (2008): Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal*, 1(2):209-220 p.
- GRUIZ K., HORVÁTH B., MOLNÁR M. (2001): Környezettoxikológia. Műegyetem Kiadó, 171 p.
- GUAN, S., JI, C., ZHOU, T., LI, J., MA, Q., NIU, T. (2008): Aflatoxin B1 degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *International Journal of Molecular Sciences*, 9:1489-1503 p.
- GUO, Q.-Q., MING, H., MENG, X.-L., DUAN, Y.-Y., GAO, R., ZHANG, J.-X., HUANG, J.-R., LI, W.-J., NIE, G.-X. (2015): *Rhodococcus agglutinans* sp. nov., an actinobacterium isolated from a soil sample. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107:1271-1280 p.
- HACKBART, H.C.S., MACHADO, A.R., CHRIST-RIBEIRO, A., PRIETTO, L., BADIALE-FURLONG, E. (2014): Reduction of aflatoxins by *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*. *Mycotoxin Research*, 30(3):141-149 p.
- HAMMER, O., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. (2001): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4:9 p.
- HARKAI P., SZABÓ I., CSERHÁTI M., KRIFATON CS., RISA A., RADÓ J., BALÁZS A., BERTA K., KRISZT B. (2016): Biodegradation of aflatoxin-B1 and zearalenone by *Streptomyces* sp. collection. *International biodeterioration and Biodegradation*, 108:48-56 p.
- HASKARD, C.A., EL-NEZAMI, H.S., KANKAAPAA, P.E., SALMINEN, S., AHOKAS, J.T. (2001): Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7):3086-3091 p.
- HE, M., LI, Y., PI, F., JI, J., HE, X., ZHAN, Y., SUN, X. (2016): A novel detoxifying agent: Using rice husk carriers to immobilize zearalenone-degrading enzyme from *Aspergillus niger* FS10. *Food Control*, 68:271-279 p.
- HE, X., LI, S., LI, Y., GU, W., SUN Y., SUN, X. (2015): Evaluation of reduced toxicity of zearalenone as measured by the Hep G2 cell assay on degradation enzymes. *Food Control*, 57:1616-168 p.

- HENEWEER, M., HOUTMAN, R., POORTMAN, J., GROOT, M., MALIEPAARD, C., PEIJNENBURG, A. (2007): Estrogenic effects in the immature rat uterus after dietary exposure to ethinylestradiol and zearalenone using a systems biology approach. *Toxicological Sciences*, 99(1):303-314 p.
- HERNANDEZ-PEREZ, G., FAYOLLE-GUICHARD, F., VANDECASTEELE, J.P. (2001): Biodegradation of ethyl t-butyl ether (ETBE), methyl t-butyl ether (MTBE) and t-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1):117-121 p.
- HOMKLIN S., ONG S.K., LIMPIYAKORN T. (2012): Degradation of 17 α -methyltestosterone by *Rhodococcus* sp. and *Nocardioideis* sp. isolated from a masculinizing pond of Nile tilapia fry. *Journal of Hazardous Materials*, 221-222:35-44 p.
- HORMISH, D., BROST, I., KOHRING, G.W., GIFFHORN, F., KROPPESTEDT, R.M., STACKEBRANDT, E., FÄRBER, P., HOLZAPFEL., W.H. (2004): *Mycobacterium fluoranthivorans* sp., nov., a flouranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Systematic and Applied Microbiology*, 27:653-660 p.
- HOU, Y.J., ZHU, C.C, XU, Y.X., CUI, X.S., KIM, N.H., SUN, S.C. (2015): Zearalenone exposure affects mouse oocyte meiotic maturation and granulosa cell proliferation. *Environmental Toxicology*, 30(10):1226-1233 p.
- HSIEH, D.P.H. (1987): Mode of action of mycotoxins. In: KROGH, P. (ed.): *Mycotoxins in Food*, Academic Press, Cambridge. 149-176 p.
- HWANG, C.Y., LEE, I., CHO, Y., LEE, Y.M., BAEK, K., JUNG, Y.J., YANG, Y.Y., LEE, T., RHEE, T.S., LEE, H.K. (2015): *Rhodococcus aerolatus* sp. nov., isolated from subarctic rainwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 465-471 p.
- ISHIGURO, T., OHTAKE, Y., NAKAYAMA, S., INAMORI, Y., AMAGAI, T., SOMA, M., MATSUSITA, H. (2010): Biodegradation of dibenzofuran and dioxins by *Pseudomonas aeruginosa* and *Xanthomonas malthophilia*, *Environmental Technology*, 21, 2000(11):1309-1316 p.
- ITO, Y., PETERSON, S.W., WICKLOW, D.T., GOTO, T. (2001): *Aspergillus pseudotamarii* a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research*, 15,233-239 p.
- JACQUES, R.J.S., SANTOS, E.C., BENTO, F.M., PERALBA, M.C.R., SELBACH, P.A., SÁ, E.L.S., Camargo, F.A.O. (2005): Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 56(3):143-150 p.
- JARD, G., LIBOZ, T., MATHIEU, F., GUYONVARC'H, A., ANDRÉ, F., DELAFORGE, M., LEBRIHI, A. (2010): Transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate by *Aspergillus* spp. *World Mycotoxin Journal*, 3(2):183-191 p.
- KAKEYA, H., TAKAHASHI-ANDO, N., KIMURA, M., ONOSE, R., YAMAGUCHI, I., OSADA, H. (2002): Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys* sp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(12):2723-2726 p.
- KÄMPFER, P., DOTT, W., MARTIN, K., GLAESER, S.P. (2014): *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64:755-761 p.
- KÄMPFER, P., WELLNER, S., LOHSE, K., LODDERS, N., MARTIN, K. (2013): *Rhodococcus cerastii* sp. nov. and *Rhodococcus trifolii* sp. nov., two novel species isolated from leaf surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63:1024-1029 p.
- KHANAFARI, A., SOUDI, H., MIRABOULFATHI (2007): Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production in corn. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 4(3):163-168 p.
- KHOSROKHAVAR, R., RAHIMIFARD, N., SHOEIBI, S., HAMEDANI, M.P., HOSSEINI, M.J. (2009): Effects of zearalenone and α -zearalenol in comparison with raloxifene on T47D cells. *Toxicology Mechanism and Methods*, 19(3):246-250 p.

- KIANG, D.T., KENNEDY, B.J., PATHRE, S.V., CHESTER, J.M. (1987): Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. *Cancer Research*, 38:3611-3615 p.
- KIM, S.B., BROWN, R., OLDFIELD, C., GILBERT, S.C., ILIARIONOV, S., GOODFELLOW, M. (2000): *Gordonia amicalis* sp. nov., a novel dibenzothiophene-desulphurizing actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6): 2031-2036 p.
- KISIELA, M., SKARKA, A., EBERT, B., MASER, E. (2012): Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria – A bioinformatic perspective. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 129:31-46 p.
- KLATTE, S., KROPPENSTEDT, R.M., RAINEY, F.A. (1994): *Rhodococcus opacus* sp. nov., an unusual nutritionally versatile *Rhodococcus*-species. *Systematic and Applied Microbiology*, 17:355-360 p.
- KLICH, M., MULLANEY, E., DALY, C.B., CARY, J.W. (2000): Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *A. tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53:605-609 p.
- KO, K.S., KIM, Y., SEONG, C.N., LEE, S.D. (2015): *Rhodococcus antrifimi* sp. nov., isolated from dried bat dung of a cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65:4043-4048 p.
- KONG, Q., ZHAI, C., GUAN, B., LI, C., SHAN, S., YU, J. (2012): Mathematic modeling for optimum conditions on aflatoxin b1 degradation by the aerobic bacterium *Rhodococcus erythropolis*. *Toxins*, 4:1181-1195 p.
- KÖPPEN, R., RIEDEL, J., EMMERLING, F., KOCH, M. (2012): (3S,11Z)-14,16-Dihydroxy-3-methyl-3,4,5,6,9,10-hexahydro-1H-2-benzoxacyclotetradecine-1,7(8H)-dione-(cis-zearalenone): a redetermination. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, 68(Pt3):832 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.
- KRISTÓF J. (SZERK.) (2000): Kémiai analízis II. (Nagyműszeres analízis). Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém, 192 p.
- KURTZMAN, C.P., HORN, B.W., HESSELTINE, C.W. (1987): *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53, 147-158 p.
- KUSUMANINGTYAS, E., WIDIASTUTI, R., MARYAM, R., (2006): Reduction of aflatoxin B1 in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination. *Mythopathologia*, 162(4):607-311 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 thourh the *Actinomycetales*. *Plos ONE*, 7(2):1-9 p.
- LARKIN, M.J, KULAKOV, L.A, ALLEN C.C.R. (2005): Biodegradation and *Rhodococcus* - Masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology*, 16:282-290 p.
- LEGAULT, R., BLAISE, C., TROTTIER, S., WHITE, P.A. (1996): Detecting genotoxic activity in industrial effluents using the SOS Chromotest microplate assay. *Environmental Toxicology*, 11(2):151-165 p.

- LI, B., FURIHATA, K., DING, L.-X., YOKOTA, A. (2007): *Rhodococcus kyotonensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57:1956-9 p.
- LI, J., ZHAO, G.Z., CHEN, H.H., QIN, S., XU, L.H., JIANG, C.L., LI, W.J. (2008): *Rhodococcus cercidiphylli* sp. nov., a new endophytic actinobacterium isolated from a *Cercidiphyllum japonicum* leaf. *Systematic and Applied Microbiology*, 31:108-113 p.
- LI, J., ZHAO, G.Z., LONG, L.J., WANG, F.Z., TIAN, X.P., ZHANG, S., LI, W.J. (2012): *Rhodococcus nanhaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:2517-2521 p.
- LI, S.H., YU, X.Y., PARK, D.J., HOZZEIN, W.N., KIM, C.J., SHU, W.S., WADAAN, M.A.M., DING, L.X., LI, W.J. (2015): *Rhodococcus soli* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil using a resuscitative technique. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107:357-366 p.
- LI, Y., KAWAMURA, Y., FUJIWARA, N., NAKA, T., LUI, H., HUANG, X., KOBAYASHI, K., EZAKI, T. (2004): *Rothia aerea* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter russicus* sp. nov., isolated from air in the Russian space laboratory Mir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:827-835 p.
- LIANG, Z.H., LI, J.X., HE, Y.L., GUAN, S., WANG, N., JI, C., NIU, T.G. (2008): AFB1 biodegradation by a new strain- *Stenotrophomonas* sp. *Agricultural Sciences in China*, 7(12):1433-1437 p.
- LINOS, A., BEREKAA, M.M., REICHELT, R., KELLER, U., SCHMITT, J., FLEMING, H.C., KROPPESTEDT, R.M., STEINBÜCHEL, A. (2000): Biodegradation of cis-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4): 1639-1645 p.
- LIOI, M.B., SANTORO, A., BARBIERI, R., SALZANO, S., URSINI, M.V. (2004): Ochratoxin and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell deaths induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research*, 557:19-27 p.
- LIU C.W., LIANG, M.S., CHEN Y.C., et al (2012): Biodegradation of *n*-alkanes at high concentration and correlation to the accumulation of H⁺ ions in *Rhodococcus erythropolis* NTU-1. *Biochemical Engineering Journal*, 63:124-128 p.
- LIU, D.L., YAO, D.S., LIANG, R., MA, L., CHENG, W.Q., GU, L.Q. (1998): Detoxification of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 563-574 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.
- LOI, M., FANELLI, F., LIUZZI, V.C., LOGRIECO, A.F., MULÉ, G. (2017): Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. *Toxins*, 9(111):1-31 p.
- LOI, M., FANELLI, F., ZUCCA, P., LIUZZI, V.C., QUINTIERI, L., CIMMARUSTI, M.T., MONACI, L., HAIDUKOWSKI, M., LOGRIECO, A.F., SANJUST, E., MULÉ, G. (2016): Aflatoxin B1 and M1 degradation by Lac2 from *Pleurotus pulmonarius* and redox mediators. *Toxins*, 8:1-16 p.
- MAAROUFI, K., CHEKIR, L., CREPPY, E.E., ELLOUZ, F., BACHA, H. (1996): Zearalenone induces modifications in haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicon*, 34:534-540 p.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. (EDS) (2000): Brock biology of microorganisms, 9th ed., Prentice-Hall, Inc. New Jersey, 991 p.
- MAEBA, H., TAKAMOTO, Y., KAMIMURA, M., MIURA, T. (1988): Destruction and detoxification of aflatoxins with ozone. *Journal of Food Sciences*, 53:667-668 p.
- MANN, R., RHEM, H.J. (1976): Degradation products from aflatoxin B1 by *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viridae* and *Mucor ambiguus*. *European Journal of Applied Microbiology*, 2:297-306 p.
- MARTÍNKOVÁ, L., UHNÁKOVÁ, B., PÁTEK, M., et al (2009): Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35:162-177 p.

- MATSUYAMA, H., YUMOTO, I., KUDO, T., SHIDA, O. (2003): *Rhodococcus tukisamuensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53:1333-1337 p.
- MAYILRAJ, S., KRISHNAMURTHI, S., SAHA, P., SAINI, H.S. (2006): *Rhodococcus kroppenstedtii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a cold desert of the Himalayas, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:979-982 p.
- MEGHARAJ, M., GARTHWAITE, I., THIELE, J.H. (1997): Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. *Letters in Applied Microbiology*, 24:329-333 p.
- MEIGHEN, E.A. (1993): Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *The FASEB Journal*, 7:1016-1022 p.
- METHENITOU, G., MARAVELIAS, C., ATHANASELIS, S., DONA, A., KOUTSELINIS, A. (2001): Immunomodulative effects of aflatoxins and selenium on human natural killer cells. *Veterinary and Human Toxicology*, 43:232-4 p.
- MÉZES M. (SZERK.) (2009): Takarmánytoxikológia, Egyetemi Jegyzet, Gödöllő 99 p.
- MÉZES M., BALOGH K. (2010): Mikotoxinok hatása a szervezet lipidperoxidációs folyamataira és antioxidáns rendszerrére. In: Kovács M (szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban. Agrofarm Kiadó, Budapest, 59-71 p.
- MOLNAR, O., SCHATZMAYR, G., FUCHS, E., PRILLINGER, H. (2004): *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology*, 27:661-671 p.
- MOTOMURA, M., TOYOMASU, T., MIZUNO, K., SHINOZAWA, T. (2003): Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Microbiological Research*, 158:237-242 p.
- MOYA, R., HERNÁNDEZ, M., GARCÍA-MARTÍN, A.B., BALL, A.S., ARIAS, M.E. (2010): Contribution to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Bioresource Technology*, 101(7):2224-2229 p.
- NAKAMURA, U., KADOKAWA, H. (2015): The nonsteroidal mycoestrogen zearalenone and its five metabolite suppress LH secretion from the bovine anterior pituitary cells via the estradiol receptor GPR30 *in vitro*. *Theriogenology*, 84(8):1342-1349 p.
- NAKAZATO, M., MOROZUMI, S., SAITO, K., FUJINUMA, K., NISHIMA, T., KASAI, N. (1990): Interconversion of aflatoxin b1 and aflatoxinol by several fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(5):1465-1470 p.
- NATHANAIL, A.V., SYVÄHUOKO, J., MALACHOVÁ, A., JESTOI, M., VARGA, E., MICHLMAYR, H., ADAM, G., SIEVILÄINEN, E., BERTHILLER, F., PELTONEN, K. (2015): Simultaneous determination of major type A and B trichotecenes, zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407(16):4745-4755 p.
- NIMAICHAND, S., SANASAM, S., ZHENG, L.Q., ZHU, W.Y., YANG, L.L., TANG, S.K., NINGTHOUJAM, D.S., LI, W.J. (2013): *Rhodococcus canchipurensis* sp. nov., an actinomycete isolated from a limestone deposit site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63:114-118 p.
- NOGALES, J., GARCÍA, J.L., DÍAZ, E. (2017): Degradation of aromatic compounds in *Pseudomonas*: A systems biology view. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*, 1-49 p.
- NORAZAH, M.N., JAYASREE, N., AHMAD, S.A., SHUKOR, M.Y., ABDUL LATIF, I. (2015): Disrupting *Rhodococcus* sp: a competent method for genomics and proteomics. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 8(2):336-341 p.
- NOUT, M.J.R. (1989): Effect of *Rhizopus* and *Neurospora* spp. on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and accumulation of aflatoxin B1 in groundnut. *Mycological Research*, 93(4):518-523 p.

- PASUMARTHI, R., CHANDRASEKARAN, S., MUTNURI, S. (2013): Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. *Marine Pollution Bulletin*, 15,76(1-2):276-282 p.
- PETCHONGKAEW, A., TAILLANDIER, P., GASALUCK, P., LEBRIHI, A. (2008): Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *Journal of Applied Microbiology*. 104:1495-1502 p.
- PETERSON, S.W., ITO, Y., HORN, B.W., GOTO, T. (2001): *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, 93:689–703 p.
- PETRUSMA, M., HESSELS, G., DIJKHUIZEN, L., VAN DER GEIZE, R. (2011): Multiplicity of 3-ketosteroid-9a-hydroxylase enzymes in *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269 for specific degradation of different classes of steroids. *Journal of Bacteriology*, 193(15):3931-3940 p.
- PETTERSOEN, H., HOLMBERG, T., LARSSON, K., KASPERSSON, A. (1989): Aflatoxins in acid-treated grain in Sweden and occurrence of aflatoxin M1 in milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 48:411-420 p.
- PITTET, A. (2005): Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 96:424-444 p.
- QUILLARDET, P., HOFNUNG, M. (1985): The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subject*, 147(3):65-78 p.
- QUILLARDET, P., HUISMAN, O., D'ARI, R., HOFNUNG, M. (1982): SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 79:5971-5975 p.
- RAISUDDIN, S., SINGH, K.P., ZAIDI, S.I.A., PAUL, B.N., RAY, P.K. (1993): Immunosuppressive effects of aflatoxin in growing rats, *Mycopathologia* 124:189-194 p.
- RAKSHA RAO, K., VIPIN, A.V., HARIPRASAD, P., ANU APPAIAH, K.A. (2017): Biological detoxification of aflatoxin b1 by *Bacillus licheniformis* CFR1. *Food Control*, 71:234-241 p.
- REHFUSS M., URBAN J. (2005): *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. *Systematic and Applied Microbiology*, 28:695–701 p.
- REID, L.M., ZHU, X., MA, B.L. (2001): Crop rotation and nitrogen effects on maize susceptibility to gibberella (*Fusarium graminearum*) ear rot. *Plant and Soil*, 237:1-14 p.
- RILEY, R.T. (1998): Mechanistic interaction of mycotoxins: theoretical considerations. In: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (szerk.): *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, 227-253 p.
- ROSSANO, F., DE LUNA, L.O., BUOMMINO, E., CUSUMANO, V., LOSI, E., CATANIA, M.R. (1999): Secondary metabolites of *Aspergillus* exert immunobiological effects on human monocytes. *Research in Microbiology*, 150:13-19 p.
- ROWBOTHAM, T.J., CROSS, T. (1977): *Rhodococcus coprophilus* sp. nov.: An aerobic nocardioform actinomycete belonging to the “*rhodochrous*” complex. *Journal of Genetic Microbiology*, 100:123-138 p.
- RUZSAS C., BIRO-GOSZTONYI M., WOLLER L., MESS B. (1979): Effect of the fungal toxin (zearalenone) on the reproductive system and fertility of male and female rats. *Acta biologica, Academia Scientia Hungarica*, 30:335-345 p.
- SAMUEL, M.S., SIVARAMAKRISHNA, A., MEHTA, A. (2014): Degradation and detoxification of aflatoxin B1 by *Pseudomonas putida*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 86:202-209 p.
- SANGARE, L., ZHAO, Y., FOLLY, Y.M.E., CHANG, J., LI, J., SELVARAJ, J.N., XING, F., ZHOU, L., WANG, Y., LIU, Y. (2014): Aflatoxin B1 degradation by a *Pseudomonas* strain. *Toxins*, 6:3028-3040 p.
- SANSEVERINO, J., GUPTA, R.K., LAYTON, A.C., PATTERSON, S.S., RIPP, S.A., SAIDAK, L., SIMPSON, M.L., SCHULTZ, T.W., SAYLER, G.S. (2005): Use of *Saccharomyces cerevisiae*

- BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8):4455-4460 p.
- SAVARD, C., NOGUES, P., BOYER, A., CHORFI, Y. (2016): Prevention of deoxynivalenol- and zearalenone-associated stress does not restore MA-10 Leydig cells functions. *Toxicology*, 341-343:17-27 p.
- SCOTT, P.M. (1998): Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue de Medecine Veterinaire*, 49:543-548 p.
- SERRANO, J.A., TABLANTE, R. V., DE SERRANO, A.A., DE SAN BLAS, G.C., IMAEDA, T. (1972): Physiological, chemical and ultrastructural characteristics of *Corynebacterium rubrum*. *Journal of Genetic Microbiology*, 70:339-349 p.
- SHANTHA, T. (1999): Fungal degradation of aflatoxin B1. *Natural Toxins*, 7:175-178 p.
- SHIER, W.T., SHIER, A.C., XIE, W., MIROCHA, C.J. (2001): Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon*, 39:1435-1438. p.
- SINGH, P.K., KUMARI, A., CHAWLA, N., PINNAKA, A.K., KORPOLE, S. (2015): *Rhodococcus lactis* sp. nov., an actinobacterium isolated from sludge of a dairy waste treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65:4215-4220 p.
- SONG X., XU Y., LI G., et al (2011): Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 62:2122–2128 p.
- STOECKER, M.A., HERWIG, R.P., STALEY, J.T. (1994): *Rhodococcus zopfii* sp. nov., a toxicant-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44:106-110 p.
- STROVIK, M., HUUSKONEN, P., KYLLÖNEN, T., LEHTONEN, S., EL-NEZAMI, H., AURIOLA, S., PASANEN, M. (2011): Aflatoxin B1 – a potential endocrine disruptor – up-regulates CYP19A1 in JEG-3 cells. *Toxicology Letters*, 202(3):161-167 p.
- SU, X., LIU, Y., HASHMI, M.Z., HU, J., DING, L., WU, M., SHEN, C. (2015): *Rhodococcus biphenylivorans* sp. nov., a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107:55-63 p.
- SUN, X., HE, X., XUE, K.S., LI, Y., XU, D., QIAN, H. (2014): Biological detoxification of zearalenone by *Aspergillus niger* strain FS10. *Food and Chemical Toxicology*, 72:76-82 p.
- SWENSON, D.H., MILLER, E.C., MILLER, J.A. (1974): Aflatoxin B1-2,3-oxide: Evidence for its formation in rat liver in vivo and by human microsomes in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60:1036-1043 p.
- TAKAHASHI-ANDO, N., KIMURA, M., KAKEYA, H., OSADA, H., YAMAGUCHI, I. (2002): A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Journal of Biochemistry*, 365:1-6 p.
- TAKEUCHI, M., HATANO, KAZUNORI, SEDLACEK, I., PACOVA, Z. (2002): *Rhodococcus jostii* sp. nov., isolated from a medieval grave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:409-413 p.
- TAN, H., HU, Y., HE, J., WU, L., LIAO, F., LUO, B., HE, Y., ZUO, Z., REN, Z., ZHONG, Z., PENG, G., DENG, J. (2014): Zearalenone degradation by two *Pseudomonas* strains from soil. *Mycotocin Research*, 30(4):191-196 p.
- TAN, H., ZHANG, Z., HU, Y., WU, L., LIAO, F., HE, J., LUO, B., HE, Y., ZUO, Z., REN, Z., PENG, G., DENG, J. (2015): Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* TH-N1 capable of degrading zearalenone. *Food Control*, 47:285-290 p.
- TÁNCICS A., BENEDEK T., SZOBOSZLAY S., VERES P.G., FARKAS M., MÁTHÉ I., MÁRIALIGETI K., KUKOLYA J., LÁNYI SZ., KRISZT B. (2015): The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(1):1-7 p.
- TÁNCICS A., MÁTHÉ I., BENEDEK T., TÓTH E.M., ATASAYAR E., SPRÖER C., MÁRIALIGETI K., FELFÖLDI T., KRISZT B. (2017): *Rhodococcus sovatisensis* sp. nov., an actinomycete isolated

- from the hypersaline and heliothermal Lake Ursu. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(2):190-196 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 fluoranthenorans*. *International Journal of Food Microbiology*, 105:111-117 p.
- TILFORD, P.E. (1936): Fasciation of sweet peas caused by *Phytomonas fascians* n. sp. *Journal of Agricultural Research*, 53:383-394 p.
- TINYIRO, S.E., WOKADALA, C., XU, D., YAO, W. (2011): Adsorption and degradation of zearalenone by *Bacillus* strains. *Folia Microbiologica*, 56:321-327 p.
- TSUKAMURA, M. (1974): A further numerical taxonomic study of the *Rhodochrous* group. *Japan Journal of Microbiology*, 18:37-44 p.
- TSUKAMURA, M., YANO, I. (1985): *Rhodococcus sputi* sp. nov., nom. rev., and *Rhodococcus aurantiacus* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35(3):364-368 p.
- UTEMARK, J., KARLOVSKY, P. (2007): Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2):637-642 p.
- VANHOUE, I., AUDENAERT, K., DE GELDER, L. (2016): Biodegradation of mycotoxins: Tales from known and unexplored worlds. *Frontiers in Microbiology*, 7:1-20 p.
- VARGA, J., PÉTERI, ZS., TÁBORI, K., TÉREN, J., VÁGVÖLGYI, CS. (2005): Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 99:321-328 p.
- VEKIRU, E., FRUHAUF, S., RODRIGUES, I., OTTINER, F., KRSKA, R., SCHATZMAYR, G., LEDOUX, D.R., ROTTINGHAUS, G.E., BERMUDEZ A.J. (2015): *In vitro* binding assessment and *in vivo* efficacy of several adsorbents against aflatoxin B1. *World Mycotoxin Journal*, 8(4):477-488 p.
- VERHEECKE, C., LIBOZ, T., DARRIET, M., SABAOU, N., MATHIEU, F. (2014): *In vitro* interaction of actinomycetes isolates with *Aspergillus flavus*: impact on aflatoxins B1 and B2 production. *Letters in Applied Microbiology*, 58(6):597-603 p.
- WANG, G., YU, M., DONG, F., SHI, J., XU, J. (2017): Esterase activity inspired selection and characterization of zearalenone degrading bacteria *Bacillus pumilus* ES-21. *Food Control*, 77:57-64 p.
- WANG, J., OGATA, M., HIRAI, H., KAWAGISHI, H. (2011): Detoxification of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *FEMS Microbiology Letters*, 314:164-169 p.
- WANG, Y.X., WANG, H. BIN, ZHANG, Y.Q., XU, L.H., JIANG, C.L., LI, W.J. (2008): *Rhodococcus kunmingensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from a rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58:1467-1471 p.
- WANGIKAR, P.B., DWIEDI, P., SINHA, N. (2004): Effect in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1. I. Maternal Toxicity and Fetal Malformations. *Birth Defects Research (Part B)*, 71:343-351 p.
- WANGIKAR, P.B., DWIEDI, P., SINHA, N., SHARMA, A.K., TELANG, A.G. (2005): Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, 43:607-615 p.

- Westlake K., Mackie, R.I., Dutton, M.F. (1987): Effects of several mycotoxins on soecific growth rate of *Butyvibrio Fibrisolvens* and toxin degradation *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(3):613-614 p.
- WHO – IARC (2012): Aflatoxins. IARC Monograph – 100F. 225-248 p.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (1979): Mycotoxins. Environmental Health criteria 11, Geneva
- WOGAN, G.N., NEWBERNE, P.M., EDWARDS, G.S. (1971): Structure-activity relationship in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analoges. *Cancer Research*, 31:1936-1942 p.
- WONG J.J., HSIEH, D.P.H. (1976): Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential, *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 73(7):2241-2244 p.
- WU, Y.Z., LU, F.P., TAN, C.P., YAO, D.S., CHU, M.Q., XIE, C.F., LIU, D.L. (2015): The furofuran-ring selectivity, hydrogen peroxide-production and low Km value are the three elements for highly effective detoxification of aflatoxin oxidase. *Food and Vhemical Toxicology*, 76:125-131 p.
- XU, J.L., HE, J., WANG, Z.C., WANG, K., LI, W.J., TANG, S.K., LI, S.P. (2007): *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57:2754-2757 p.
- YANG, R., WANG, Y.M., ZHANG, L., ZHAO, Z.M., ZHAO, J., PENG, S.Q. (2016): Prepubertal exposure to an oestrogenic mycotoxin zearalenone induces central precocious puberty in immature female rats through the mechanism of premature activation of hypothalamic kisspeptin-GPR54 signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 437:62-74 p.
- YASSIN, A.F. (2005): *Rhodococcus triatoma* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:1575-1579 p.
- YASSIN, A.F., SCHAAL, K.P. (2005): Reclassification of *Nocardia corynebacterioides* Serrano et al. 1972 (approved lists 1980) as *Rhodococcus corynebacterioides* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:1345-1348 p.
- YEHIA, R.S. (2014): Aflatoxin detoxification by manganase peroxidase purifies from *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1): 127-133 p.
- YEKKOUR, A., SABAOU, N., ZITOUNI, A., ERRAKHI, R., MATHIEU, F., LEBRIHI, A. (2012): Characterization and antagonistic properties of *Streptomyces* strains isolated from Saharan soils, and avaluation of their ability to control seeding blight of barley caused by *Fusarium culmorum*. *Letters in Applied Microbiology*, 55(6):427-435 p.
- YI, P.J., PAI, C.K., LIU, J.R. (2011): Isolation and characterization of a *Bacillus licheniformis* strains capable of degrading zearalenone. *World Journal of Mycrobiology and Biotechnology*, 27:1035-1043 p.
- YOON, J., CHO, Y., KANG, S., KIM, S.B., LEE, S.T., PARK, Y. (2000a): *Rhodococcus koreensis* sp. nov., a 2,4-dinitrophenol-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1193-1201 p.
- YOON, J., KANG, S., CHO, Y., LEE, S.T., KHO, Y.H., KIM, C., PARK, Y. (2000b): *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:2173-2180 p.
- YOUSEF, M., ABDULRAZZA, Q., OSMAN, N., IBRAHIM, A. (2002): Fetal exposure to aflatoxins in the United Arab Emirates, *Annals of Tropical Paediatrics*, 22:3–9 p.
- YU, Y., QIU, L., WU, H., TANG, Y., LAI, F., YU, Y. (2011b): Oxidation of zearalenone by extracellular enzymes from *Acinetobacter* sp. SM04 into smaller estrogenic products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27:2675-2681 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.
- ZEINVAND-LORESTANI, H., SABZEVARI, O., SETAYESH, N., AMINI, M., NILI-AHMADABADI, A., FARAMARZI, M.A. (2015): Comparative study of *in vitro* prooxidative properties and

- genotoxicity induced by aflatoxin B1 and its laccase-mediated detoxification products. *Chemosphere*, 135:1-6 p.
- ZHANG, H., DONG, M., YANG, Q., APALIYA, M.T., LI, J., ZHANG, X. (2016): Biodegradation of zearalenone by *Saccharomyces cerevisiae*: Possible involvement of ZEN responsive proteins of the yeast. *Journal of Proteomics*, 143:416-423 p.
- ZHANG, J., ZHANG, Y., XIAO, C., LIU, Z., GOODFELLOW, M. (2002): *Rhodococcus maanshanensis* sp. nov., a novel actinomycete from soil. *Int. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:2121-2126 p.
- ZHANG, Y., JIA, Z., YIN, S., SHAN, A., GAO, R., QU, Z., LIU, M., NIE, S. (2014): Toxic effects of maternal zearalenone exposure on uterine capacity and fetal development in gestation rats. *Reproductive Sciences*, 21(6):743-753 p.
- ZHANG, Y.Q., LI, W.J., KROPPESTEDT, R.M., KIM, C.J., CHEN, G.Z., PARK, D.J., XU, L.H., JIANG, C.L. (2005): *Rhodococcus yunnanensis* sp. nov., a mesophilic actinobacterium isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:1133-1137 p.
- ZHAO, G.Z., LI, J., ZHU, W.Y., TIAN, S.Z., ZHAO, L.X., YANG, L.L., XU, L.H., LI, W.J. (2012): *Rhodococcus artemisiae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the pharmaceutical plant *Artemisia annua* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:900-905 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.
- ZHENG, W.L., PAN, S.Y., WANG, G., WANG, Y.J., LIU, Q., GU, J.H., YUAN, Y., LIU, X.Z., LIU, Z.P., BIAN, J.C. (2016): Zearalenone impairs the male reproductive system functions via inducing structural and functional alterations of sertoli cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42:146-155 p.
- ZINEDINE, A., SORIANO, J.M., MOLTÓ, J.C., MANES, J. (2007): Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An estrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1):1-18 p.
- ZOPF, W. (1891): Ueber Ausscheidung von Fettfarbstoffen (Lipochromen) seitens gewisser Spaltpilze. *Plant Biology*, 9:22-28 p.

Felhasznált jogszabályok:

- 178/2002 EK – „Az élelmiszerjog általános elveiről és követelményeiről, az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság létrehozásáról és az élelmiszerbiztonságra vonatkozó eljárások megállapításáról”
- 165/2010 EU – „Az élelmiszerekben előforduló egyes szennyezőanyagok felső határértékeinek meghatározásáról szóló 1881/2006/EK rendeletnek az aflatoxinok tekintetében történő módosításáról”
- 1126/2007 EK – „Az élelmiszerekben előforduló egyes szennyezőanyagok felső határértékeinek meghatározásáról szóló 1881/2006/EK rendeletnek a kukoricában és kukoricakészítményekben előforduló *Fusarium*-toxinek tekintetében történő módosításáról”
- 2002/32 EK – „A takarmányban előforduló nemkívánatos anyagokról”
- 2006/576 EK – „A deoxinivalenol, a zearalenon, az ochratoxin-A, a T-2, a HT-2 és a fumonizinek állati takarmányozásra szánt termékekben való előfordulásáról”
- 44/2003. (IV.26.) FVM rendelet – „a Magyar Takarmánykódex kötelező előírásairól”

386/2009 EK – „831/2003/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletnek a takarmányozási célra felhasznált adalékanyagok új funkcionális csoportjának létrehozása tekintetében történő módosításáról”

Internetes források:

http1: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps>
(2018.09.21.)

http2: <https://www.biomin.net/hu/termek/mycofix/> (2018.09.24.)

http3: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/38429> (2018.09.24.)

M2. Az élelmiszerekben és takarmányokban maximálisan megengedhető határértékek az AFB1 és a ZEA tekintetében

Az élelmiszerekben megengedhető maximális aflatoxin határértékek a 165/2010 EU rendelet szerint a következők:

Élelmiszer	Maximális érték (µg/kg)		
	AFB1	Össz aflatoxin (B1, B2, G1, G2)	AFM1
Földimogyoró és más olajos magvak, melyeket válogatással vagy más fizikai eljárással emberi fogyasztásra szánnak (azok kivételével, amelyekből préssel növényi olajat állítanak elő)	8,0	15,0	-
Mandula, pisztácia és sárgabarack magok, melyeket válogatással vagy más fizikai eljárással emberi fogyasztásra szánnak	12,0	15,0	-
Török- és brazil mogyoró, melyeket válogatással vagy más fizikai eljárással emberi fogyasztásra szánnak	8,0	15,0	-
Diófélék és egyéb magvak (a fentiek kivételével)	5,0	10,0	-
Földimogyoró és egyéb olajos magvak és azok termékei, melyeket közvetlen emberi fogyasztásra szánnak (azok kivételével, amelyekből préssel növényi olajat állítanak elő)	2,0	4,0	-
Mandula, pisztácia és sárgabarack magok, melyeket közvetlen emberi fogyasztásra szánnak	8,0	10,0	-
Török- és brazil mogyoró, melyeket közvetlen emberi fogyasztásra szánnak	5,0	10,0	-
Diófélék és egyéb magvak (a fentiek kivételével), melyeket közvetlen emberi fogyasztásra szánnak	2,0	4,0	-
Száritott gyümölcsök, melyeket válogatással vagy más fizikai eljárással emberi fogyasztásra szánnak	5,0	10,0	-
Száritott gyümölcsök és azok termékei, melyeket közvetlen emberi fogyasztásra szánnak	2,0	4,0	-
Gabonafélék és azok termékei (kivéve az alábbiakat)	2,0	4,0	-
Kukorica és rizs, melyeket válogatással vagy más fizikai eljárással emberi fogyasztásra szánnak	5,0	10,0	-
Nyers és hőkezelt tej, valamint ezekből készült tejtermékek	-	-	0,050
Fűszerek (paprika, bors, szerecsendió, gyömbér, kurkuma) és fűszerkeverékek, melyek az említettek egyikét tartalmazzák	5,0	10,0	-
Feldolgozott gabonaalapú ételek, valamint csecsemőknek és kis gyerekeknek szánt ételek	0,10	-	-
Tejből készült csecsemő-tápszerek	-	-	0,025
Csecsemőknek szánt gyógyászati céllal adott tápszerek	0,10	-	0,025

A takarmányokban megengedhető maximális AFB1 határértékek a 2002/32 EK rendelet és a szigorúbb Magyar Takarmánykódex (44/2003. IV.26. FVM rendelet) szerint a következők:

Takarmány	Maximális érték (mg/kg), 12 %-os nedvességtartalmú takarmányra vonatkozóan	
	AFB1	
	2002/32 EK rendelet	Magyar takarmánykódex
Takarmány-alapanyagok (kivéve az alábbiak)	0,05	0,02
Földimogyoró, kopra, pálmamag, gyapotmag, babaszumag, kukorica valamint ezek termékei	0,02	-
Teljes értékű marha- juh- és kecsketakarmányok (az alábbiak kivételével)	0,05	0,02
Tejelő teheneknek szánt takarmányok	0,005	0,005
Borjú- és báránytakarmányok	0,01	0,005
Teljes értékű sertés- és baromfitakarmányok (kivéve a növendékeknek szánt takarmányok)	0,02	0,02
Malacoknak és növendék baromfiknak szánt takarmányok	-	0,005
Egyéb teljes értékű takarmányok	0,01	0,01
Kiegészítő marha-, juh- és kecsketakarmányok (kivéve a tejelő állatoknak, borjaknak és bárányoknak szánt takarmányok)	0,05	0,02
Kiegészítő tejelő teheneknek szánt takarmányok	-	0,005
Kiegészítő borjú- és báránytakarmányok	-	0,005
Kiegészítő sertés- és baromfitakarmányok (kivéve a növendékeknek szánt takarmányok)	0,03	0,02
Malacoknak és növendék baromfiknak szánt kiegészítő takarmányok	-	0,005
Egyéb kiegészítő takarmány	0,005	0,01

Az élelmiszerekben megengedhető maximális ZEA határértékek a 1126/2007 EK rendelet szerint a következők:

Élelmiszer	Maximális érték (µg/kg) ZEA
Feldolgozatlan gabonafélék (kivéve kukorica)	100
Feldolgozatlan kukorica (kivéve, amit nedves őrléssel kívánnak feldolgozni)	350
Közvetlen emberi fogyasztásra szánt gabonafélék	75
Finomított kukoricaolaj	400
Kenyér, tésztafélék, gabonából készült kekszek, gabonapelyhek (kivéve kukorica alapú pelyhek)	50
Közvetlen emberi fogyasztásra szánt kukorica és kukoricaalapú szeletek, kukoricapehely	100
Csecsemőknek és kisgyerekeknek szánt, feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek, tápszerek (kivéve kukoricaalapúak)	20
Csecsemőknek és kis gyerekeknek szánt feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek	20
Kukorica őrléses során visszamaradt, >500 µm frakció (CN 1103 13, CN 103 20 40, CN 1904 10 10)	200
Kukorica őrléses során visszamaradt, ≤ 500 µm frakció (CN 1102 20, CN 1904 10 10)	300

A takarmányokban megengedhető maximális zearalenon határértékek a 2006/576 EK rendelet szerint a következők:

Takarmány	Maximális érték (mg/kg), 12 %-os nedvességtartalmú takarmányra vonatkozóan ZEA
Gabonafélék- és készítmények (kivéve a kukorica melléktermékek)	2
Kukorica melléktermékek	3
Malacoknak és kocasüldőknek szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	0,1
Tenyézkocáknak és hízósertéseknek szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	0,25
Borjaknak, tejelő marháknak, juhoknak, bárányoknak, kecskéknek, kecskegidáknak szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok	0,5

M3. Toxikológiai/ökotoxikológiai teszteknel alkalmazott mérési végpontok

(CALOW, 1993)

Akut teszteknel alkalmazott mérési végpontok

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

Krónikus teszteknel alkalmazott mérési végpontok

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

M4. Alkalmazott tápoldatok

Luria-Bertani (LB) médium:

1 liter desztillált vízre vonatkoztatva	• Tripton	10 g
	• Élesztőkivonat	5 g
	• NaCl	10 g
	• (Bakteriológiai agar)	(18 g)

Casiton broth:

1 liter desztillált vízre vonatkoztatva	• Kazein pepton	2,5 g
	• Élesztőkivonat	2,5 g
	• NaCl	8,5 g
	• (Bakteriológiai agar)	(18 g)

Yeast Minimal Medium (YMM_{leu-, ura-}): leucén- és uracil szelektív alapmédium

1 liter desztillált vízre vonatkoztatva	• KH ₂ PO ₄	13,61 g
	• (NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
	• KOH (lemezés)	4,2 g
	• MgSO ₄	0,2 g
	• Fe ₂ SO ₄ oldat (40 mg/50 ml víz)	1 ml
	• L-hisztidin	50 mg
	• Adenin	50 mg
	• L-arginin-HCl	20 mg
	• L-metionin	20 mg
	• L-tirozin	30 mg
	• L-izoleucin	30 mg
	• L-lizin-HCl	30 mg
	• L-fenilalanin	25 mg
	• L-glutánsav	100 mg
	• L-valin	150 mg
	• L-szerin	375 mg

Growth Medium

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

Összetevők:

1. Vitamin oldat: 20 mg Tiamin, 20 mg Piridoxin, 20 mg Pantoténsav, 100 mg Inozitol, 50 ml Biotin oldat (2mg/100ml). 500 ml desztillált vízben oldottuk fel, majd 0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn átszűrve sterilizáltuk. 4°C-on tároltuk.
2. D-glükóz oldat: 20%-os glükóz oldatot készítettünk, majd autoklávban 10 percig sterilizáltuk. Szobahőmérsékleten tároltuk.
3. L-aszparaginsav oldat: 4 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk desztillált vízben oldva. Sterilizálás után szobahőmérsékleten tároltuk.
4. L-treonin oldat: Desztillált vízben oldva 24 mg/ml-es oldatot állítottunk össze. Sterilizálás után, szintén szobahőmérsékleten tároltuk.
5. Réz-szulfát oldat: 20 mM-os oldatot készítettünk desztillált vízben oldva. 0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn átszűrtük, és szobahőmérsékleten tároltuk.

M5. A *Rhodococcus* típus törzsek első leírásuk és nemzetközi törzsgyűjteményben megtalálható jelölésük

Faj	Törzs jelölések	Első publikáció
<i>R. aerolatus</i>	JCM 19485 ^T = KCTC 29240 ^T = PAMC 27367 ^T	Hwang et al., 2015
<i>R. aetherivorans</i>	JCM 14343 ^T = DSM 44752 ^T = NCIMB 13964 ^T	Goodfellow et al., 2004
<i>R. agglutinans</i>	KCTC 39118 ^T = CFH S0262 ^T = CCTCC AB2014297 ^T	Guo et al., 2015
<i>R. antrifimi</i>	KCTC 29469 ^T = DSM 46727 ^T	Ko et al., 2015
<i>R. artemisiae</i>	DSM 45380 ^T = YIM 65754 ^T = CCTCCAA 209042 ^T	Zhao et al., 2012
<i>R. baikonurensis</i>	DSM 44587 ^T = JCM 11411 ^T = GTC 1041 ^T = NBRC 100611 ^T = A1-22 ^T	Li et al., 2004
<i>R. biphenylivorans</i>	KCTC 29673 ^T = CGMCC 1.12975 ^T = MCCC 1K00286 ^T	Su et al., 2015
<i>R. canchipurensis</i>	JCM 17578 ^T = KCTC 19851 ^T = MBRL 353 ^T	Nimaichand et al., 2013
<i>R. cerastii</i>	DSM 45579 ^T = CCM 7906 ^T = LMG 26203 ^T	Kämpfer et al., 2013
<i>R. cercidiphylli</i>	DSM 45141 ^T = YIM 65003 ^T = CCTCC AB 207160 ^T	Li et al., 2008
<i>R. coprophilus</i>	JCM 3200 ^T = DSM 43347 ^T = CUB 687 ^T = ATCC 29080 ^T = CIP 104178 ^T = IEGM 600 ^T = LMG 5357 ^T = NBRC 100603 ^T = NCIMB 11211 ^T = NCTC 10994 ^T = NRRL B-16537 ^T = VKM Ac-571 ^T	Rowbotham – Cross, 1977
<i>R. corynebacterioides</i>	JCM 3376 ^T = JCM 3391 ^T = DSM 20151 ^T = ATCC 14898 ^T = CCUG 37877 ^T = CIP 104510 ^T = NBRC 14404 ^T = NRRL B-24037 ^T	Crowle, 1962, Serrano et al., 1972, Yassin-Schaal, 2005
<i>R. defluvii</i>	DSM 45893 ^T = LMG 27563 ^T	Kämpfer et al., 2014
<i>R. enclensis</i>	DSM 45688 ^T = NIO-1009 ^T = NCIM 5452 ^T	Dastager et al., 2014
<i>R. erythropolis</i>	JCM 3201 ^T = JCM 20419 ^T = DSM 43066 ^T = ATCC 4277 ^T = CIP 104179 ^T = HAMBI 1953 ^T = IEGM 7 ^T = NBRC 15567 ^T = LMG 5359 ^T = NCIMB 9158 ^T = NCTC 13021 ^T = NRRL B-16025 ^T = VKM Ac-858 ^T	Goodfellow-Alderson, 1977
<i>R. fascians</i>	JCM 10002 ^T = DSM 20669 ^T = ATCC 12974 ^T = CFBP 2401 ^T = CIP 104713 ^T = ICMP 5833 ^T = NBRC 12155 ^T = LMG 3623 ^T = NCPPB 3067 ^T = NRRL B-16937 ^T = VKM Ac-1462 ^T	Tilford, 1936; Goodfellow, 1984
<i>R. globerulus</i>	JCM 7472 ^T = DSM 43954 ^T = ATCC 25714 ^T = CIP 104174 ^T = DSM 43956 ^T = IEGM 591 ^T = NBRC 14531 ^T = NRRL B-16938 ^T	Goodfellow et al., 1982
<i>R. imtechensis</i>	JCM 13270 ^T = RKJ300 ^T = MTCC 7085 ^T	Ghosh et al., 2006
<i>R. jostii</i>	JCM 11615 ^T = NBRC 16295 ^T = CCM 4760 ^T	Takeuchi et al., 2002
<i>R. koreensis</i>	JCM 10743 ^T = DSM 44498 ^T = KCTC 0569BP ^T = DNP505 ^T = CIP 106721 ^T = DSM 44498 ^T = NBRC 100607 ^T	Yoon et al., 2000a
<i>R. kroppenstedtii</i>	JCM 13011 ^T = DSM 44908 ^T = K07-23 ^T = NBRC 103113 ^T = MTCC 6634 ^T	Mayilraj et al., 2006
<i>R. kunmingensis</i>	JCM 15626 ^T = DSM 45001 ^T = KCTC 19149 ^T = YIM 45607 ^T	Wang et al., 2008

<i>R. kyotonensis</i>	JCM 23211 ^T = DS472 ^T = CCTCC AB206088 ^T = IAM 15415 ^T	Li et al., 2007
<i>R. lactis</i>	DSM 45625 ^T	Singh et al., 2015
<i>R. maanshanensis</i>	JCM 11374 ^T = DSM 44675 ^T = M712 ^T = AS 4.1720 ^T = NBRC 100610 ^T	Zhang et al., 2002
<i>R. nanhaiensis</i>	DSM 45608 ^T = SCSIO 10187 ^T = CCTCC AB 2011024 ^T	Li et al., 2012
<i>R. opacus</i>	JCM 9703 ^T = DSM 43205 ^T = ATCC 51881 ^T = CIP 104549 ^T = NBRC 16217 ^T = NBRC 100624 ^T	Klatte et al., 1994
<i>R. percolatus</i>	JCM 10087 ^T = DSM 44240 ^T = MBS1 ^T = LMAU.R292 ^T = CIP 104964 ^T = HAMBI 1752 ^T = NBRC 16218 ^T = NBRC 100626 ^T	Briglia et al., 1996
<i>R. phenolicus</i>	JCM 14914 ^T = G2P ^T = DSM 44812 ^T = NRRL B-24323 ^T	Reh fuss-Urban, 2005
<i>R. pyridinivorans</i>	JCM 10940 ^T = PDB9 ^T = DSM 44555 ^T = KCTC 0647BP ^T = KCCM 80005 ^T = NBRC 100608 ^T	Yoon et al., 2000b
<i>R. qingshengii</i>	DSM 45222 ^T = JCM 15477 ^T = KCTC 19205 ^T = CGMCC 1.6580 ^T	Xu et al., 2007
<i>R. rhodnii</i>	JCM 3203 ^T = DSM 43336 ^T = N445 ^T = ATCC 35071 ^T = CIP 104181 ^T = IEGM 555 ^T = KCC A-0203 ^T = LMG 5363 ^T = NBRC 100604 ^T = NCIMB 11279 ^T = NRRL B-16535 ^T = VKM Ac-1187 ^T	Goodfellow-Alderson, 1977.
<i>R. rhodochrous</i>	JCM 3202 ^T = DSM 43241 ^T = ATCC 13808 ^T = CCUG 47165 ^T = CIP 104376 ^T = HAMBI 1959 ^T = IEGM 62 ^T = NBRC 16069 ^T = LMG 5365 ^T = NCTC 10210 ^T = NRRL B-2149 ^T = NRRL B-16536 ^T	Zopf, 1891., Tsukamura, 1974, Goodfellow-Alderson, 1977
<i>R. ruber</i>	JCM 3205 ^T = DSM 43338 ^T = CIP 104180 ^T = IEGM 70 ^T = NBRC 15591 ^T = LMG 5366 ^T = KCC A-0205 ^T = VKM Ac-1021 ^T	Goodfellow-Alderson, 1977
<i>R. soli</i>	JCM 19627 ^T = DSM 46662 ^T = KCTC 29259 ^T = DSD51W ^T = KACC 17838 ^T	Li et al., 2015
<i>R. sovatensis</i>	H004 ^T = DSM 102881 ^T = NCAIM B.02632 ^T	Táncsics et al. 2016
<i>R. triatoma</i>	JCM 13396 ^T = DSM 44892 ^T = CCUG 50202 ^T = IMMIB RIV-085 ^T = NBRC 103116 ^T	Yassin, 2005
<i>R. trifolii</i>	DSM 45580 ^T = T8 ^T = CCM 7905 ^T = LMG 26204 ^T	Kämpfer et al., 2013
<i>R. tukisamuensis</i>	JCM 11308 ^T = Mb8 ^T = NBRC 100609 ^T = NCIMB 13903 ^T	Matsuyama et al., 2003
<i>R. wratislaviensis</i>	JCM 9689 ^T = DSM 44107 ^T = N805 ^T = ATCC 51786 ^T = CCUG 38518 ^T = CIP 105033 ^T = NBRC 100605 ^T = NCIMB 13082 ^T = VKM Ac-1986 ^T	Goodfellow et al., 1995 Goodfellow et al., 2002
<i>R. yunnanensis</i>	JCM 13366 ^T = DSM 44837 ^T = KCTC 19021 ^T = YIM 70056 ^T = CCTCC AA 204007 ^T = NBRC 103083 ^T = NBRC 103115 ^T	Zhang et al., 2005
<i>R. zopfii</i>	JCM 9919 ^T = DSM 44108 ^T = ATCC 51349 ^T = CIP 104275 ^T = NBRC 100606 ^T = NRRL B-16942 ^T	Stoecker et al., 1994

Félkövé A dolgozatban használt törzsjelölés

10 Köszönetnyilvánítás

Először is köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Kriszt Baláznak és Dr. Krifaton Csillának, amiért lehetőséget adtak PhD munkám elvégzéséhez, és a témába való betekintéshez valamint köszönöm, hogy munkámhoz segítséget nyújtottak.

Köszönöm a Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék volt és jelenlegi munkatársainak a baráti támogatását és gyakorlati segítségnyújtását. Köztük is köszönettel tartozom Dr. Háhn Juditnak, hogy szakmai tanácsokkal látott el, valamint Benséné Fekete Ildikónak, hogy alázatos munkájával az én munkámat is megkönnyítette.

Köszönet illeti a Tennessee Egyetem munkatársait, Dr. Melanie Eldridge-t és Dr. Gary Saylor-t, hogy rendelkezésünkre bocsátották a BLYES és BLYR tesztszervezeteket.

Köszönöm Barátimnak, hogy támogatásukkal mindvégig lelkesítettek.

Végül, de nem utolsó sorban legnagyobb hálával Szüleimnek és Páromnak tartozom, hogy szeretetükkel erőt adtak. Köszönöm Páromnak, hogy mindvégig velem volt ezen az úton és a legnehezebb időszakokban pozitivitásával támogatott. Köszönöm Szüleimnek, hogy lehetővé tették, hogy ezen az úton elinduljak és tudom, hogy büszkék rám. Munkámat Édesapám emlékének ajánlom.

Doktori munkámat az alábbi pályázat támogatta:

NVKP_16-1-2016-0009: A takarmány és élelmiszerbiztonság erősítése a takarmányok mikotoxinmentesítésére alkalmas innovatív technológiák kifejlesztésével