

DEBRECENI EGYETEM
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM
MEZOGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉS- ÉS TAKARMÁNYOZÁSTANI TANSZÉK

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető: Dr. Kovács András MTA doktora

Témavezető:

Dr. Gundel János
egyetemi magántanár

Szakmai konzulens:

Dr. Mátrai Tibor

**Hazai szénák penészfertőzöttségének vizsgálata és a vizsgálati
módszerek fejlesztése**

Készítette:

Sipiczki Bojana Nóra
doktorjelölt

Debrecen
2006

HAZAI SZÉNÁK PENÉSZFERTOZÓTTSÉGÉNEK VIZSGÁLATA ÉS A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE

*Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Állattenyésztési Tudományok tudományágban*

Írta: Sipiczki Bojána Nóra okleveles állatorvos

Készült a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskolája keretében

A doktori iskola vezetője: Dr Kovács András MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

	Név	Tud. fokozat
Elnök:
Tagok:

A doktori szigorlat időpontja: 200..... hó nap

Az értekezés bírálói:

Név	Tud. fokozat	Aláírás
.....
.....
.....

A bíráló bizottság:

	Név	Tud. fokozat	Aláírás
Elnök:
Titkár:
Tagok:

Az értekezés védésének időpontja: 200.....

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	6
1.1. A téma elméleti és gyakorlati jelentősége	6
1.2. Vizsgálatok célkitűzései	11
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
2.1. Hazai szénák penészflórájának kvalitatív és kvantitatív reprezentatív vizsgálatával kapcsolatos irodalmi elozmények	13
2.1.1. Hazai adatok a szénák minőségét befolyásoló tényezokről	15
2.1.2. Penészgombákkal kapcsolatos biológiai alapfogalmak	18
2.2. A szénán előforduló penészek toxikológiai kockázati szerepének értékelése	19
2.2.1. A szénákon élő penészgombák és toxinjaik	19
2.2.2. A nagyobb gyakorlati jelentőséggel bíró penészgomba genusok, fajok, toxinjaik és hatásuk a kérődző állatokra	22
2.3. A penészek tömeges felszaporodásáért (gradációjáért) felelős tényezők és hatásaik	37
2.3.1. A penészgombák életfeltételei	37
2.3.1.1. A vízaktivitás	38
2.3.1.2. A pH	40
2.3.1.3. A hőmérséklet	41
2.3.1.4. Az atmoszféra (oxigén, széndioxid)	41
2.3.1.5. Tápanyagok, energiaforrás	42
2.3.1.6. Struktúra	42
2.4. A széna sajátosságaihoz igazodó penészvizsgálati módszerek adaptációja	42
2.4.1. Direkt mikroszkópos módszerek	43
2.4.2. Tenyésztéses módszerek	46
2.4.3. A metabolitok kimutatásán alapuló módszerek	51
2.4.4. Molekuláris biológiai módszerek	54
2.4.4.1. A PCR-módszer	54
Saját vizsgálatok	56

3. ANYAG ÉS MÓDSZER	56
3.1. Szénák terméktipikus csíraszámának megállapítására	56
3.2. A szénák terméktipikus flóraelmeinek és a toxinogén penészek előfordulásának vizsgálata	57
3.3. A penészek tömeges felszaporodásáért felelos fizikai tényezok vizsgálata szénákon	57
3.4. A szénák, és kukoricamag terméktipikus penészflórájának valamint az <i>Aspergillus parasiticus-nak</i> az érzékenysége az erjedési savak (laktát, acetát) jelenlétére	59
3.5. Kísérletek a szénák mikológiai vizsgálatára alkalmas táptalajreceptúra összeállítására	62
3.6. Kísérletek szelektív propagulum-festési technika kidolgozására	65
3.7. Kísérletek az invertáz-teszt alkalmazhatóságára néhány, a szénákra jellemzo genus esetében	67
3.8. DNS RT-PCR-rel az ALLFun-Taq penész-specifikus primer segítségével kapott kópiaszám és a tenyésztéses (szabvány) módszerrel meghatározott TKE összefüggésének vizsgálata	70
4. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	73
4.1. A szénák terméktipikus csíraszámának megállapítása	73
4.1.1. Statisztikai tényezok a szénák mikológiai minosítésében	75
4.2. A szénák terméktipikus flóraelmeinek és a toxinogén penészek előfordulása	80
4.3. A penészek tömeges felszaporodásáért felelos fizikai tényezok hatása szénákon	82
4.4. A szénák, és kukoricamag terméktipikus penészflórájának valamint az <i>Aspergillus parasiticus-nak</i> az érzékenysége az erjedési savak (laktát, acetát) jelenlétére	85
4.5. A szénák mikológiai vizsgálatára alkalmas táptalajreceptúra kialakításának eredményei	91
4.6. Szelektív propagulum-festési technika kidolgozásának eredménye	99
4.7. Kísérletek az invertáz-teszt alkalmazhatóságára néhány szénákra jellemzo genus esetében	101
4.8. DNS RT-PCR-rel az ALLFun-Taq penész-specifikus primer segítségével kapott kópiaszám és a tenyésztéses (szabvány) módszerrel meghatározott TKE összefüggésének vizsgálata	102
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	108
6. ÖSSZEFOGLALÁS, SUMMARY	110
7. MELLÉKLET	116

7.1. Fogalom meghatározások	116
7.2. Kiegészítő táblázatok, leírások	117
8. IRODALOMJEGYZÉK	120
Köszönetnyilvánítás	138

1. BEVEZETÉS

1.1. A téma elméleti és gyakorlati jelentősége

Szénák készítése és használata a gazdasági állatfajok háziasításával egyidos. Eurázsia északi területein a nyáron megjelenő futermés feleslegének levágása, szárítása és tárolása tette lehetővé a kérodzó szarvasmarha és a juh átteleltetését, valamint a ló takarmányozását.

A szénák a gazdasági állatok takarmányozásában, napjainkban is nélkülözhetetlenek a következők miatt:

- 1) Magyarország éghajlati viszonyai nem tesznek lehetővé legeltetést egész éven át. A tömegtakarmányt (rostot) igénylő állatok (szarvasmarha, juh, kecske, ló) a téli időszakban tartósított (szárított, erjesztett) takarmányt fogyasztanak, ezen felül az egészséges bendumködés érdekében a széna nélkülözhetetlen.
- 2) a szénák magas rosttartalmával a kérodzó állatok rostigényét a legtermészetesebb formában lehet kielégíteni
- 3) a széna többi táplálóanyagai közül, a fehérje, a karotin, az ásványianyagok és a magas D-vitamin tartalom tekinthető az állat szükségleteinek kielégítéséhez hozzájáruló faktornak

Az elmúlt ötven évben, a korábbi gazdálkodási szerkezethez képest, a széna szerepe háttérbe szorult. Ez a következő okokra vezethető vissza:

- 1) A nagyüzemekben, hektáronként nagyobb táplálóanyag hozamot biztosító silózott takarmányok jelentek meg, amelyek az átteleltetést jól biztosították.
- 2) A juhtartás gazdaságosságának romlása miatt, a szénát igénylő juhtartás csökkent.
- 3) A gyeptelepítés, és a nagyvolumenű második kaszálás lassan kimaradt a gyakorlatból.
- 4) A magasabb minőségi igényeket kielégítő lucernaszéna (renden fonnyasztott, vagy hideglevegős rendszerekben szárított) készítés gyakorlata maradt fenn, minthogy az energia költség növekedés miatt a forrólevegős zöldlisztek előállítása a minimumra csökkent.

Az elmúlt évek szénakészítésének mennyiségi adatait, a Központi Statisztikai Hivatal illetékes (mezőgazdasági) főosztályától kapott felvilágosítás alapján, az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Különböző szénák termésmennyisége 2002-2004-ben (KSH)

év	összes termés / tonna		
	lucernaszéna	vörösherezéna	fuszéna
2002.	780 400	20 176	577 280
2003.	548 159	13 240	533 903
2004.	941 617	21 194	815 094

A gazdasági állatok elvárható termelési szintjeinek biztosítása érdekében szükséges, hogy az ember által nyújtott takarmány táplálóanyag-tartalma, jó mikrobiológiai állapotban, romlás, károsodás nélkül jusson el az állatokhoz.

A szénaminóság jelentősége a juhágazatban a legnagyobb, mert a juh téli takarmányadagjában, a széna a szárazanyag-bevitel (0,5-3,0 kg) 50-70%-át is kiteheti (HEROLD, 1994). Emiatt minden táplálóanyag-tartalmi és minőségi hiányosság maximálisan érvényesülhet, mert más takarmánykomponens a hatást nem mérsékli.

A szarvasmarha esetében a szénák a táplálóanyag-igény viszonylag kisebb hányadát fedezik. (10-25 kg napi szárazanyag-bevitel 10-40%-a) (HEROLD, 1994), ezért a minőségi hibák hatása itt csekélyebb.

A szénaminóság jelentősége, a szarvasmarha ágazaton belül, a tejelő tehenészetekben a legnagyobb. Állat- és humánegészségügyi szempontból egyaránt attól tartunk, hogy a rossz minőségű, baktériumokkal és penészekkel fertőzött, toxinokat tartalmazó széna etetése termelőkiesést, a szervezet legyengülő védekezőképességét, és betegségeket okozhat. A mikotoxinok közül, az aflatoxin M1 állati termékbe, vagyis a tejbe kerülve, az ember egészségét is veszélyezteti, mert erosen rákkeltő hatású. A fusariotoxinok közül az ösztrogén hatású zearalenon a placentán is átjut, így a károsító hatás már a méhen belüli élet során, a magzatban is érvényesülhet. Sajnos az üszomagzatokban kialakult elváltozások, később, az élet során is megmaradhatnak, így okozva tömeges szapor-

dásbiológiai problémákat. A zearalenon zearalenol formában megjelenhet tejben, így közegészségügyi jelentősége is lehet.

A jelenlegi gazdálkodási körülmények között a szénák minőségének fontossága ismét fokozódik:

- 1) Az extenzív juh és kecske ágazat fellendüloben van
- 2) A szénák kereskedelme fellendüloben van, és minőségi viták merülhetnek fel.

A szénákkal szemben különleges igényeket a ló tartás támaszt. A ló számára szenzorikusan kitűnő minőségű (többnyire 1. osztályú takarmányfűvekből álló) és penészedéstől mentes széna szükséges. A ló kiemelten érzékeny a mikotoxinokra, így a szénán előforduló penészek specifikus vagy általános depresszív, vagy éppen toxikus hatása különös figyelmet érdemel.

A takarmány-alapanyagok minosítése általánosságban a következő tulajdonság-csoportokra terjed ki:

- 1) táplálóanyag-tartalom (kémiai vizsgálattal meghatározott nyersösszetétel és ezek segítségével számítható emészthető táplálóanyag-tartalom, valamint a hasznosítható fehérje és nettó energiatartalom), makro- és mikrokomponensek.
- 2) nem kívánatos anyagok (tiltott anyagok), toxikumok (környezeti, feldolgozásból származó), nehézfémek, toxikus vegyi anyagok, mikotoxinok
- 3) minőségromlást okozó tényezők (mikrobiológiai állapot, mikotoxinok, zsíroxidáció)

A hivatalos magyar mikrobiológiai takarmányminosítés során a vizsgálandó paramétereket és a jellemző értékeket, valamint határértékeket (a disszertáció fogalmazásának időpontjában) a 44/2003. (IV. 26) FVM rendelet 2. számú melléklete szabályozza. Ennek nagy fogyatéka, hogy a penész- és élesztőszám vizsgálatát nem irányozza elő, továbbá határértéket sem állít. Ugyanígy a szála- és tömegtakarmányok minosítését is figyelmen kívül hagyja.

A szénák osztályba sorolása az eddigi magyar gyakorlatban kizárólag a beltartalmi mutatók alapján történt (II. Takarmány Kódex táblázatos adatai.). A széna organoleptikus tulajdonságaira (szín, szag, szálhossz, állag), de főleg a mikrobiológiai romlás szemmel

látható jeleire nézve, objektív minősítő módszert és ennek megfelelően, osztályba sorolást sem találunk.

Európa és Észak-Amerika országaiban, a szénák mikológiai minősítése az abraktakarmányokra vonatkozó előírások mellett másodlagos jelentőségű, jóllehet a penészfertőzöttség felmérésére és jellemzésére lényegesen több adat áll rendelkezésre.

HIETANEN (1985) szerint, a bálázáskori víztartalom alapján, a szénákat 3 minőségi osztályba lehet sorolni: a „jó szénát” 15% körüli víztartalommal bálázták, amelyben „kevés” mezofil mikroba található. A „penészes széna” bálázáskori víztartalma 25% körüli, sok mezofil gombát, főleg *Aspergillusok*at tartalmaz. A harmadik a „nagyon penészes széna” kategória. Ebben az esetben a szénát több mint 35% víztartalommal bálázták, amely sok termofil mikróbával, pl.: *Aspergillus fumigatus*-szal, *Microspolyspora faeni*-vel és *Thermopolyspora vulgaris* actinomycetákkal fertőzött.

LESTER (2000) szerint, a szénák minősítésekor, a következő faktorokat kell figyelembe venni: a növény betakarításkori érettségi foka (vegetációs stádium), levelezettség, szín, idegen anyagok, szag és állapot. Mindezeket szubjektív megítélés alapján pontrendszerrel jellemzi.

A német VDLUFA (Mezőgazdasági Vizsgáló- és Kísérleti Állomások Hálózata) a szénaminosítás során mikrobiológiai paramétereket is figyelembe vesz. A mikrobiológiai vizsgálatokban terméktipikus és romlásjelző mikróbacsoportokat differenciál és számol, mind a baktériumok, mind a penészek és élesztők vonatkozásában. Ezekre nézve nem egyszerűen tájékoztató értékeket, hanem fertőzöttségi intervallumot rögzítenek, amely alatt a tételt mikrobiológiailag „gyengén terhelt”-nek, míg a felső korlát felett „erősen terhelt”-nek minősíti. Az intervallumok szélessége a log 2-t is eléri. A potenciális toxinogének előfordulását figyelmen kívül hagyják.

A hazai szénaminosítás mai gyakorlatában, a laboratóriumi vizsgálat alapvetően a beltartalmi értékekre irányul, mert ez nélkülözhetetlen az optimális takarmányadag összeállításához. Ezen kívül, vizsgálati kritérium még a mérgező növényekkel, gyomokkal való szennyezettség is.

Az MSz 17671-1988 szabvány, ami a szénákat beltartalmi értékek alapján minősíti, csupán egy mondatot tartalmaz a mikrobiológiai követelményekre vonatkozóan: „a széna nem lehet mikrobiológiailag és toxikológiailag kifogásolható”. Így a penészedés mértéke vagy annak hiánya objektíve nem kvantifikálható, így nem írható elő és főleg nem kérhető számon.

Ugyanakkor a szénák, penészek inváziójának minden más takarmány-alapanyagnál fokozottabban vannak kitéve készítésük közben. Ennek okai:

- a) aratás idején jelentős a talajról, a romló növényi részekről származó spórafertőzöttség (terméktipikus gombafertőzöttség);
- b) innen kiindulva - a technológiától függően - a learatott $a(w) = 0,75$ feletti vízaktivitásnak lehet kitéve, ami, az elhalóban lévő növény biológiai hőtermelése, a gyorsan gradációnak induló élesztők és aerob spórás baktériumok mellett, a penészek hirtelen felszaporodásának is optimális feltételeket biztosíthat;
- c) ezen kívül a penészek olyan, viszonylag alacsonyabb vízaktivitáson is szaporodnak, amely mellett a baktériumok (aerob spórások) és az élesztők gradációja nem indulhat meg.

A szabványerejű előírások jelenleg is fennálló hiányossága, hogy nem állít fel határértékeket, irányszámokat, pedig ezek nélkül a szénák objektív mikrobiológiai minősítése lehetetlen. Ha a szénákat csak beltartalom alapján minősítjük, és nem vesszük figyelembe a mikrobiológiai jellemzőket, a tényleges használati értéket tekintve félrevezető eredményhez juthatunk.

A fentiekben vázolt helyzet határozta meg munkám kiinduló helyzetét és célkitűzéseit:

- a hazai szénák penészflóráját jellemezni, a penészedés számszerű mértékét a szokásos szenzorikus bírálattal összevetve értékelni,
- a szénán előforduló penészek toxikológiai kockázati szerepét mérlegelni,
- a penészek felszaporodását befolyásoló egyes feldolgozási tényezők hatását vizsgálni, és
- vizsgálati módszereket adaptálni, illetve fejleszteni, amelyek a széna sajátosságaihoz igazodnak.

1.2. Vizsgálatok célkitűzései

1) **A hazai szénák penészflórájának kvalitatív és kvantitatív reprezentatív vizsgálata a szenzorikus bírálattal összefüggésben.** A vizsgálat célja a leggyakoribb terméktipikus flóraelemek és az átlagos minőségre jellemző terméktipikus penészszám (TKE) megállapítása, az átlagos (tipikus) minőség mikrobiológiai leírása.

2) **A szénán előforduló penészek toxikológiai kockázati szerepének értékelése.** A vizsgálati anyag alapján toxinogén flóraelemek előfordulásának értékelése, kiemelt esetekben kísérletek mikotoxin szennyezettség kimutatására, irodalmi tájékozódás a szénák toxin-szennyezettségének hivatalos szabályozására és a kazuisztikai adatokra nézve.

3) **A penészek tömeges felszaporodásáért (gradációjáért) felelős feldolgozási tényezők hatásának kísérletes vizsgálata.** Kísérletek alapján határozzuk meg, hogy a széna betakarításakor az egyes tényezők közül melyik felelős leginkább a penészedésért, vagyis a terméktipikus mikoflóra gradációjáért. Tekintettel a szenázs gyakorlati jelentőségére, és a kitárolás utáni másodlagos penészedés előfordulására, vizsgáljuk az erjedés során keletkező savak, és pH hatását a terméktipikus penészflóra másodlagos aerob felszaporodására.

4) **A széna sajátosságaihoz igazodó penészvizsgálati módszerek adaptációja.**

Az 1) célkitűzés vizsgálatának megkezdésekor nyilvánvalóvá vált, hogy az abrakarmányok vizsgálatára előírt tenyésztési módszerek a szénák esetében nem válnak be, mert néhány a szénán honos expanzív faj befutja a tenyészeteket és megakadályozza a többi flóraelem értékelését. Ezért inhibitorral kiegészített, a telepek alaktani elbírálására alkalmasabb talajösszetételt kell kikísérletezni. Emellett a korábbi munkák kapcsán abrakarmányok *Aspergillus* fertőzöttségének kimutatására kifejlesztett *Aspergillus*-invertáz teszt (MÁTRAI és mtsai, 2000) alkalmasságát vizsgáltuk szénák penészfertőzöttségének jelzésére. Ugyancsak a penészkimutatás vizsgálati idejének lerövidítésének reményében vizsgáltuk azt, hogy penész-DNS kinyerése és RT-PCR vizsgálata az AllFunTaq gombaspecifikus primerrel, mennyiben szolgáltat együttfutó eredményt a takarmányvizsgálatban mindeddig autentikusnak elfogadott élocsira-tenyésztési TKE meghatározással. A szénák penészszenyezettségének gyors, tájékoztató elbírálására

felmerülhet a szénamintákból készített alapszuspenzió mikroszkópos vizsgálata. Ennek kapcsán kísérleteket végeztünk olyan szelektív festési módszer kidolgozására, amivel könnyen megkülönböztethetők a penész eredetű képletek a szuszpenzióban előforduló más növényi és állati eredetű mikroképletektől, és számlálhatók is.

A penészes tömegtakarmányokról ezidáig nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. A mikológia, a takarmányhigiénia, és a laboratóriumi gyakorlat területéről kell olyan publikációkat gyűjteni, amelyek segítik a „szénamikológia” problémájának megértését. Céлом volt a szénákon élő penészgombákkal, azok kimutatásával, életfeltételeivel kapcsolatos irodalom összegyűjtése is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Hazai szénák penészflórájának kvalitatív és kvantitatív reprezentatív vizsgálatával kapcsolatos irodalmi elozmények

A penészes takarmányok ártalmas mivolta régi tapasztalat. Káros hatásuk a következőképpen osztályozható:

- A penészes és toxinokkal fertőzött takarmány, a gombaszaporodás és a toxintermelés mértékének függvényében, csökkenti az állatok takarmányfelvételét és termelését.
- Hajlamosító tényező a multifaktoriális vagy mikrobiális oktanú betegségek fellépéséhez. Bizonyos esetekben jellegzetes tüneteket, illetve kórtani elváltozásokat okoznak (pl. szaprobiózis az élőlények szervein, szervi mikózisok, szaporodási zavarok, anémia, nefropatia, stb.)
- Hatással vannak a szubsztrátra (takarmányokra) amelyen nonek: azt tönkreteszik és elértéktelenítik.
- A penészgombák által termelt toxinok állati termékben is megjelenhetnek, ezért a takarmányok révén, az élelmiszerbiztonság is közvetetten érintett, mert az állati termékekben kimutatható toxinok az emberi fogyasztásra szánt élelmiszerekből is kimutathatók (a megkívánt minőségét befolyásolhatják).

A takarmány mikológiai állapota a takarmányból kimutatható penészszámmal, pontosabban a tenyésztési vizsgálattal kimutatott telepkepző egységek (TKE) számával, ezen belül, a toxinogén nemzetségek és fajok arányával jellemezhető. Korábbi jelentős, de tenyésztéssel már ki nem mutatható (elhalt) penészsaporodás maradványainak (reliktumainak) kimutatása, a mikotoxintartalom valószínűsítése miatt lehet jelentős.

Tapasztalataink szerint a szénafélék mikológiai jellemzői eltérnek a szemesekétől és az egyéb takarmányokétól, mind a flóra összetételében, mind a penészsám értékek nagyságrendjében. A szénákra általában jellemző az egészséges abrakfélék terméktípusú értékénél több nagyságrenddel nagyobb penészsám, amelynek megítélése erősen függ a flóra összetételétől, a potenciális toxinképző genusok arányától. Az abraktakarmányokra nézve hivatalos mikrobiológiai határértékek és gombatoxin határértékek vannak érvényben. Ilyen határértékeket szénákra nézve még nem állítottak fel, a szénákat eddig

csak beltartalom alapján minosítotték. A szénák gombás romlottságát ma még csak organoleptikus minosítés alapján állapítják meg (dohos, poros, stb). A szálatakarmányokon élő, természetes penészflóra mennyiségi és minoségi leírására, a szakirodalomban alig van adat.

PÁLFY és KUPAI (1986) felhívták a figyelmet a mikrobiológiai szénaminosítés hiányára. Az akkori szénaminosítési szabvány (MSZ 17 671-78) ezirányú hiányosságának korrigálására, a szakszolgálati állomások szakmai bizottsága - a minosítési tömegmunka megkönnyítése céljából - értékszámrendszert dolgozott ki, ideiglenes jelleggel. Ebben 20 ezer penészsám/g alatt első osztályúnak, 30 ezer penészsám/g alatt másodosztályúnak, és 30 ezer penészsám/g felett III. osztályúnak minosíti a szénák mikrobiológiai állapotát. Ugyanitt „... toxikus fajok esetén...” a határértéket 10 ezerrel leszállítja, míg „... közömbös, piknidiumos fajok esetén...” ugyanennyi engedményt ad. Az ajánlás nem foglal állást abban, hogy a III. osztályú határértéknél is magasabb penészsám tartalmú szénák mennyiben csökkent használati értékűek, vagy az állatok egészségére nézve kockázatosak-e. Mindezideig, a szénák mikrobiológiai minosítésére nézve, újabb, hivatalos szabályozás nem látott napvilágot.

A szénák toxinogén gombafajokkal történt fertozottságára és az ebből eredő mikotoxikózisokra nézve is kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Hazai szénákban a *Stachybotrys atra* elofordulását ill. kártételét szarvasmarha állományokban, DANKÓ (1972) írta le. Többek közt megállapította, hogy a fertozott alomszalmát az állatok még akkor is megeszik, ha közben jó minoségű szálatakarmányt is kapnak.

A hazai kazuisztikában, fusariotoxikózis elofordulását kérodzokban leírták ugyan, azonban ez inkább az abraktakarmányok fertozottságára volt visszavezethető. VÁNYI és mtsai (1980) az F2 fusariotoxin (zearalenon) hatását vizsgálták kosok és bikák spermioenezisére. A takarmányadagok gabonahányadában és a szálatakarmányban eros (10 000 – 70 000/g) *F. culmorum* fertozottságot találtak, de csak a szemesekből sikerült kimutatniuk toxint, a szaporítószerveken kifejtett károsító hatások mellett.

2.1.1. Hazai adatok a szénák minőségét befolyásoló tényezokről

A kaszálás idopontja és a betakarítás-szárítás technológiája: A növények kaszálásának gépesítéséről és a szénaszárítási módszerekről számos irodalmi adat áll rendelkezésre.

A kaszálási idopont megfelelő megválasztását, a betakarítás módját és az esetleges károsodásokat, veszteségeket többen is vizsgálták. A betakarítással kapcsolatban a legnagyobb hangsúlyt a széna beltartalmi értékeinek változásaira helyezték. A fiatalon kaszált növények jó minőségű, viszont kis tömegű szénát szolgáltatnak. Bár a vágási idő késleltetésével vastagabb rendeket, több szénát nyerhetünk, a mind jobban elfásodó növények táplálékanyag-tartalma és emészthetősége azonban nagymértékben csökken. A széna mennyisége és minősége közötti helyes arány biztosításáért, a legtöbb szálatakarmány-növényt, leghelyesebb virágzása kezdetén betakarítani. Ilyenkor még jó minőségű, egyben kellő mennyiségű szénához jutunk (BAINTNER, 1963).

SZUCSNÉ (2000) szerint a gyepes esetében ajánlatos az első kaszálást a virágzás kezdetekor elvégezni, mert ekkor a táplálékanyag-tartalom és az évi fuhozam egyaránt kedvező. A pillangósok első kaszálásának ideális ideje a zöldbimbós állapot. Vegyes növényállományú gyepeseken a vezérnövény állapota a mérvadó (KAKUK és SCHMIDT, 1988)

Az elkésett kaszálás, közvetetten, a takarmány ízletességét is csökkenti. Ez azzal magyarázható, hogy a száraz mindinkább elfásodnak és a levélarány is kisebb lesz, a nyersrost-tartalom megnövekszik, a nyersfehérje emészthetősége pedig csökken (VÁMOSI, 1971).

BAINTNER (1967) szerint a zöldtakarmány összetétele és táplálékanyag-tartalma a késő délutáni vagy esti órákban kedvezőbb, mint reggel, mivel a táplálékanyagok egy része az éjszakai légzés alkalmával felhasználódik, vagy pedig a gyökerekben raktározódik. Vizsgálatokat végeztek ezért arra vonatkozóan is, hogy a késő délutáni vagy esti kaszálás esetén nem javul-e a széna minősége, de nem tapasztaltak gyakorlatilag számbevehető különbséget.

A növények előregedésével a nyersfehérje tartalom folyamatosan csökken. Ezt még fokozza a nyersrost tartalom növekedése, ami csökkenti a nyersfehérje emészthetőségét. Ugyanakkor az előregedett takarmány kevésbé ízletes, mivel a szárok mindinkább elfáradnak és a levélhányad kisebb lesz. DÖRNER (1955) a különböző eljárásokkal készült lucernaszénák száradás közben fellépő változásait és beltartalmi értékeit vizsgálta. Vizsgálataiban megállapította, hogy a leggyorsabban renden (nagy vízvesztés az első 6 órában), leglassabban sodratban szárad a lucerna. A renden szárított lucernában azonban nagyobb a levélpergési veszteség, nyersrosttartalma valamivel nagyobb, mint a sodratban vagy állványon szárított szénáké. A vizsgált eljárások között legnagyobb volt a karotinvészteség renden, legkisebb a háromlábos szárított szénában. Emészthető fehérje- és energia-tartalom (akkor: keményítőérték) szempontjából leggyengébb a renden szárított széna.

Botanikai összetétel: A jó és gyenge minőségű széna tápláléértéke között általában nagyobb a különbség, mint a különböző növényfajok szénája között. Azonban a pillangós szénák, így a lucerna- és lóhereszéna, több fehérjét, meszet és vitamint tartalmaznak, mint a hasonló minőségű fuszénák.

A mérgező és a kellemetlen ízű gyomok, a savanyúfüvek, a sás, a nád erosen ronthatják a szénák értékét. Jó minőségűnek csak azt a szénát tekinthetjük, amelyik 10%-nál kevesebb savanyúfüvet tartalmaz. A közepes minőségű szénában sem lehet belőlük több 30%-nál.

Kémiai összetétel: Sajnos a szénák kémiai összetételével foglalkozó nagy, átfogó vizsgálatok meglehetősen régiiek, így például KURELEC (1956) rétiszenák emészthető fehérjetartalmát vizsgálta. 148 saját gyűjtésű és 11 egyéb magyar réti szénával elvégzett kihasználási kísérlet eredménye alapján, keményítő érték tartalom szerint, 7 minőségi osztályba sorolta a szénákat. A kituno 39 és nagyobb (1 minta), az igen jó 35-38 (5), a jó 31-34 (22), a jó közepes 27-30 (52), a gyenge közepes 24-26 (35), a gyenge 21-23 (18), és az igen gyenge osztályba a 21-nél kisebb keményítőértékű szénát (26) sorolta. Rétiszéna-vizsgálatai szerint a szénák átlagos víztartalma 16%.

A 60-70-es években elterjedt volt, ma már kevésbé, az ún. 3 részes és 2 részes szénabírálat. Német séma szerint, a szénák értékelésére pontozásos eljárást alkalmaztak. A szé-

nabírálati lap három részből áll, amely tartalmazza: az érzékszervi, a botanikai és a kémiai vizsgálat eredményeit. Az elért pontszámot összegzik, és ennek alapján állapítják meg a széna minőségét, ami lehet: „kituno”, „nagyon jó”, „jó”, „kevésbé jó”, „gyenge” és „egészségre ártalmas vagy értéktelen”.

A 2 részes bírálat, a 3 részes bírálat idotakarékos változata. Ebben az érzékszervi bírálat azonos az elobbival, viszont a kémiai vizsgálat helyébe a botanikai vizsgálat lép, nagyobb pontszámmal (BAINTNER, 1967).

A takarmányok **mikrobiológiai károsodása** részben a termelés, részben a tárolás időszakában következik be. Nem ritka azonban a felhasználás, a feltakarmányozás közben bekövetkező fertőződés, romlás sem.

A természetes, a betakarítás időszakában bekövetkező gombaszaporodás elsődleges meghatározója az időjárás, de nem hanyagolható el a termesztett fajta ellenállóképessége, az agrotechnika és a növényvédelem szerepe sem.

Azt, hogy a tárolás során milyen károsodások érik a takarmányokat, a tárolási körülmények határozzák meg, de mindenekelőtt a nedvesség, a levegőzöttség, a tárolóhely minősége, valamint a tétel betároláskori állapota (fertőzöttsége) (PÁLFY és KUPAI, 1986).

Az áttekintés alapján megállapítható, hogy a szénák penészedésének vizsgálata és minősítése a hazai vizsgálatok elhanyagolt területe volt, csak PÁLFY és KUPAI (1986) idézett adatai állnak rendelkezésünkre.

A penész-szaporodást befolyásoló környezeti tényezők (a növény nedvességtartalma, a vízkaktivitás, a hőmérséklet) szerepének kísérletes vizsgálatára nézve, irodalmi háttér csak a növény nedvességtartalmára vonatkozóan áll rendelkezésre, a penészszaporodás kinetikájának mérése nélkül.

2.1.2. Penészgombákkal kapcsolatos biológiai alapfogalmak

A gombák egy csoportját penészgombáknak nevezzük. A mikrobiológiai gyakorlatban használt „penészgomba” fogalom nem pontosan definiált, és nem egyetlen szisztematikailag körülhatárolható gombacsoportot foglal magába. Valójában ez egy olyan ökológiai kategória, amely bizonyos mértékben hasonló ökológiai és morfológiai tulajdonságokkal bír, de rendszertanilag különböző organizmusokat foglal magába.

A penészgomba gyujtonévre jellemző ismertetőjegyek összefoglalására DELITSCH (1943) vállalkozott elsoként. Leírása szerint, a penészgombák, tipikus, micéliumot képező, többnyire ivartalan úton szaporodó élőlények, melyek természetes élőhelye a talaj, de amelyek olyan koncentrált táptalajokon is szaporodni képesek, mint pl. az élelmiszerek. KRIESEL (1988) ezt a definíciót azzal egészítette ki, hogy a penészgombák nagyszámú, általában extracellulárisan kiválasztódó – elsodleges és másodlagos – anyagcsereterméket termelnek. A csoportosításba való besorolás azonban igen nehéz, és nem minden esetben egyértelmű. Az átmenet például a szaprobionták és a paraziták között képlékeny, mivel egyes penészgombák a helyzetüktől, körülményeiktől függően hol így, hol úgy viselkednek. A tipikus micéliumképzés sem világosan körülhatárolt fogalom. A dimorf penészgombák a környezeti feltételektől függően micéliumosan, vagy élesztőszerűen is szaporodhatnak. A fonalgombákra jellemző, a polarizált, egy irányba történő növekedés. Ez eredményezi azt a jelenséget, hogy szilárd táptalaj felületén, a fonalgombatelep, egy meghatározott tenyészedon belül, lineáris növekedést mutat, vagyis időegységenként, és hossz méretben, azonos mértékű a gombatelep átmérojének növekedése.

A gombaegyed szervezete általában több sejtől álló elágazó fonál, de egyes genusokban ez lehet egyetlen sejt is. Az alapfonál a *hypha*, és ezek sokasága, az egyetlen egyedhez tartozó elágazó fonalszövet, a *mycelium*. A szubsztrát felületén szemmel már észlelhető, többnyire több egyed micéliumainak összességéből álló fonalszövet, a telep (*thallus*) (SZIGETI, 1997).

A fonalgombák hifái eltérő szerveződést mutatnak a különböző gombacsoportok esetében. Az alacsonyabbrendűekre jellemző a cönocitikus micélium, harántfal (septum) nélküli hifák. Az egyetlen konídiumból, spórából kiinduló tenyészedon egyetlen sokmagvú óriás sejtként fogható fel. Ilyenek a *Zygomycota* törzs tagjai, pl. *Rhizopus*, *Mucor* fajok.

A másik típus, a szeptált hifa, ami jellemzi a valódi gombák micéliális sejtjeit. A két típus között foglal helyet az átmeneti forma, ahol a szeptumok, azaz harántfalak kezdeményei megvannak, de valódi válaszfal nem alakul ki. Ilyen micélium típus található az *Oomycota* törzsbe tartozó *Pythium* és *Phytophthora* fajok esetében (MARÁZ, 2001).

2.2. A szénán előforduló penészek toxikológiai kockázati szerepének értékelése

2.2.1. A szénákon élő penészgombák és toxinjaik

A szálastakarmányok mikroflórájának legjelentősebb csoportja a penészgombáké.

Mint ahogy a gombák klorofillt nem tartalmaznak, autotrof anyagcserére nem képesek, ezért a testük felépítéséhez szükséges tápanyagokat a környezetükből veszik fel. Szokásos megkülönböztetni szaprofita (elhalt növényi vagy állati szerves anyagokon élő) és parazita (é debates, főleg növényi szervezeteken vagy szervezetekben élő epifita, ill. endofita) fajokat. Olyan csoportokat is ismerünk, amelyekre mindkét életforma jellemző (pl. *Fusariumok*). Takarmányozás szempontból a szaprofita gombáknak van nagyobb jelentőségük, amelyek szántóföldi vagy raktári eredetűek.

PÁLFY és KUPAI (1986) összefoglaló könyve alapján, a szénák penészflóráját általában a *Cladosporium*, *Mucor*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Nigrospora*, *Phoma* és a toxintermelő *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* nemzetségbe tartozó fajok alkotják. Ritkán a *Stachybotris* fajtái is előfordulnak.

A toxint nem képező nemzetségek káros hatása kevésbé határozott, de nem elhanyagolható. Károsak lehetnek a takarmányra és az állatok egészségére, ha csíraszámuk egy bizonyos szint fölé emelkedik. Ez a káros hatás többféle módon is megnyilvánulhat.

A takarmányra nézve káros hatásuk abban nyilvánul meg, hogy elbontják a táplálékanyagok egy részét, metabolizálják az esszenciális aminosavakat, aminek következtében a takarmány tápláléértéke jelentősen csökken. A táplálékanyagok lebomlása során képződött melléktermékek (savak, aminok, ketonok, peroxidok) rontják a takarmány minőségét, esetenként mérgezőek lehetnek az állati szervezetre (gyomor és bélgyulladások).

Ezen felül a beszáradt biomassza, de különösen a szálló spórák az állatban, de még a gondozókban is allergiás bántalmakat okozhatnak.

A penészek az emésztorendszerbe kerülve megváltoztatják a bélflóra összetételét és normális működését, vagyis rendellenes bomlási folyamatokat indítanak el. A keletkezett bomlástermékek (propionsav, oxálsav, aceton, aldehidek, stb.) a bélcsatornában nyálkahártyagyulladást, élénk perisztaltikát, hasmenést, súlyosabb esetben máj és vese-elfajulást válthatnak ki (habár ez utóbbiak ismereteink szerint inkább a toxikus másodlagos metabolitok rovására írhatók) (PÁLFY és KUPAI, 1986).

A takarmányokon élő penészgombák másik csoportjának (toxinogén fajok) különleges jelentőségét az adja, hogy a vegetatív anyagcsere-fázist követően, másodlagos anyagcsere-termékeket, ezen belül, az állati szervezetre mérgező ún. mikotoxinokat termelnek. A mikotoxinok többnyire stabil, nem fehérje jellegű, gyakran gyűrűs szerkezetű szerves vegyületek. Négy évtizedes kutatás és gyakorlati tapasztalatok alapján, a napjainkig leírt mikotoxinok száma már ezer feletti, azonban egyre újabb és újabb mikotoxinok felfedezése valószínűsíthető. Jelenlegi ismereteink szerint mintegy 15-20 toxikus gomba-metabolitnak van kiemelkedően fontos állat- és humán-egészségügyi jelentősége.

A legújabb Magyar Takarmánykódex tartalmazza a 44/2003. (IV.26) FVM rendeletének mellékletébe foglalt előírásokat. Ez az Európai Közösség joganyagának átvételével közli a káros anyagokra (köztük a mikotoxinokra) vonatkozó kötelező érvényű határértékeket. Ebben az egyetlen mikotoxin, amelyre részletezett határértékeket adnak meg, az aflatoxin. A többi fontos toxinra, mint az ochratoxin A, F-2 és T-2, DON és fumonizinek, sem az EU, sem a fenti hazai rendeletben még állásfoglalás sincs, és a rendeletek, a korábban érvényben volt és bevált szabályozásra sem utalnak.

A tarthatatlan helyzetre való tekintettel, többéves szakbizottsági munka alapján, az MTA Állatorvostudományi Bizottsága, 2003-ban, állásfoglalást adott ki, amelyben egyrészt az Állategészségügyi Intézetek kazuisztikai adataira, másrészt a hazai mikotoxin-kutatásra támaszkodó, állatcsoportokra specifikált, depresszív és toxikus mikotoxin-határérték táblázatot közölnek, amit az MTA ajánlásként fogadott el (MÁTRAI és

mtsai, 2003). Ez a magyar ajánlás a kérődző állatcsoportokra nézve viszonylag kevésbé specifikált, éppen az elmúlt négy évtizedben értékelhető csekély hazai esetszám miatt.

Mikotoxikózisoknak nevezik általában a mikotoxinok által okozott megbetegedéseket. SCHIEFER (1990) szerint ezek a következőkkel jellemezhetők:

- Valószínűleg gyakran fellépnek, azonban legtöbbször nem toxikóziként ismerik fel (hiányoznak a kialakult toxikózisokra jellemző tünetek, nem specifikus teljesítménycsökkenés tapasztalható).
- A toxikózisokkal kapcsolatos egészségügyi zavarok állatról állatra, állományról állományra nem vihetők át, vagyis nem fertőzések (udvarok, telepek közötti terjedés nincs).
- Az állományok antibiotikum vagy egyéb kezelésre nem reagálnak.
- A zavarok rendszerint szezonálisan lépnek fel, de emellett egyes mikotoxinok képződését elősegítő extrém időjárástípusok során, tömegesebb fellépés is jelentkezik.
- Amennyiben a takarmány eredete követhető, a betegség egy bizonyos, fertőzött tétel fogyasztására vezethető vissza.
- A takarmányokban nagy mennyiségű csíráképes toxinogén penészgomba kimutatása nem szükségszerűen jelenti a megnövekedett mikotoxin-tartalmat, és megfordítva

Hazai megfigyelések (az állategészségügyi intézetek tapasztalata) szerint a gyakorlatban előforduló depresszív toxinhatás mindig erősebb, mint az ugyanolyan mennyiségű szintetikus toxinnal előidézett kísérletes toxikózis (SZIGETI, 1997). Ez a következő tényezőkre vezethető vissza: a.) természetes körülmények között nem egy és nem is egyféle toxin keletkezik, b.) a penészek olyan nem specifikus anyagokat is termelnek, amelyek depresszív hatásúak, c.) a penészes tételek, a szag- és ízhibák miatt, csökkentik a takarmányfelvételt, ami eleve a teljesítménymutatók (növekedés, tej és tojástermelés, stb.) romlásával jár.

2.2.2. A nagyobb gyakorlati jelentőséggel bíró penészgomba genusok, fajok, toxinjaik és hatásuk a kérődző állatokra

Kérődzők vonatkozásában sokáig az a nézet uralkodott, hogy a bendo mikrobiális aktivitása a mikotoxinokat elbontja, de hatásukat legalábbis jelentősen csökkenti. Hogy ez nem így van, arra elsősorban az aflatoxin tejben való megjelenése hívta fel a figyelmet.

Az *Aspergillus* genus

A gabonafélék raktári penészeinek egyik legfontosabb képviselője, több mint 150 faj ismert, és 45 fajról már bebizonyosodott, hogy mikotoxinokat termelnek (FRISVAD és SAMSON, 1991). Toxintermelésük mellett szervi mikózist is okozhatnak. Az *Aspergillus* fajok telepeinek színe nagyon változatos. Egyaránt jellemző lehet a fehér (*A. candidus*), a sárga (*A. flavus*), a kékes (*A. glaucus*), a fekete (*A. niger*), a zöld, a szürke, stb., valamint e színek árnyalatai. Konídiumtartó képleteik színe jellegzetes, gömböcskéhez illeszkedő spóratartók. Általában xerotoleránsak, szaporodnak és metabolizálnak $a(w)=0,84$ alatt is.

A takarmányozás szempontjából két nagy csoport veszélyes: a flavus és az ochraceus csoport. A hazai viszonylatban legelterjedtebb toxintermelők az *A. parasiticus*, *A. flavus* és *A. fumigatus*. Már 1966-ban, NYIREDI és BODNÁR 118 *Aspergillus* törzset vizsgált meg, és ezek közül 32-ről bizonyosodott be, hogy aflatoxintermelésre képes. Természetes körülmények között azonban e törzsek egyike sem termel toxint. Ennek magyarázata az, hogy a klímánk nyújtotta környezeti feltételek közül hiányzik a magas páratartalom. Vannak azonban olyan körülmények, ahol a feltételek maximálisan megvannak, pl. egy 30 °C fölé felmelegedett, erósen fertőzött gabonasiló. Az *aspergillusok* jellemző toxinjainak (az aflatoxinoknak) több változata ismert: a B1, B2, G1, G2, valamint a tejben megjelenő forma, az aflatoxin-M. Közülük leggyakoribb, és legmérgezőbb, a B1 változat. A B1, G1 és M1 kémiai szerkezetét tekintve 7,8-dihidrofurano(2,3-b)furán (DHFF) és erósen toxikus, míg a B2, G2 és M2 2,3,7,8-tetrahidrofurano(2,3-b)furán (THFF) gyakorlatilag nem mérgező. Az aflatoxin bioszintézise többé-kevésbé ismert, amelyet a vegyület szintézisekor az izotóppal jelölt acetát beépüléséből határoztak meg. A központi vegyület a legnagyobb toxicitású aflatoxin B1, és a ciklopentanon gyűrű oxidáció-

jával keletkező G1. A hidroxil származékok (M'; B2a; aszpertoxin) szintén B1-ből származtathatók. Ezt a metabolikus kapcsolatot támasztja alá az a tény is, hogy a környezetből izolált toxinogén törzsek aflatoxinogén B1 mellett G1-et is termelnek, G1 termelés azonban B1 nélkül nem fordul elő.

Az aflatoxinra jellemző a májkárosító és rákkeltő hatás. Az aflatoxikózisnak heveny és idült formája ismert. A heveny megbetegedés többnyire elhullással jár. Idült formája, ha klinikai tüneteket okoz, a májat károsítja. A szubklinikai forma szervi elváltozással nem jár, termelés-csökkentő hatása azonban jelentős.

A kérődző állatok fiatal és felnőtt korban egyaránt érzékenyek az aflatoxin hatására. A szájon át felvett aflatoxin, a monogasztrikus állatokhoz hasonlóan, a gyomor- illetve bendoemésztésen változatlanul jut keresztül, és csak a májban, vagy valamelyik másik célszervben metabolizálódik. Jellemző az aflatoxin metabolizmusára az is, hogy sejten belül zajlik és a folyamat reverzibilis (pl. az aflatoxikol ismét visszaalakulhat aflatoxinná). (BATA és mtsai, 1990)

Mint ahogy az aflatoxin a táplálékláncan keresztül az embert is veszélyezteti, veszélyessége a takarmányban kiemelt elbírálás alá esik, előfordulásának tolerálható értéke a jelenlegi szabályozás szerint nulla.

A *Penicillium* genus

Fajai az ecsetszerűen elágazó konídiumtartóikról „ecsetpenész” néven ismertek. Telepeik színe változatos, többnyire kékes, zöldes, fehéres, felületük gyakran redőzött. Napjainkban a nemzetségnek mintegy 150 faja ismert. Számos faj toxintermelésre és/vagy szervi mikózis előidézésére képes. A *penicilliumok* között kevés a valóban xerotoleráns faj, általában $a(w) = 0,9$ körül növekednek. A nemzetség több mint 10 féle toxikus metabolitot és ezek különböző variánsait termelheti (FRISVAD és FILTENBORG, 1989). *penicilliumok* által termelt legjelentősebb toxinok: az ochratoxin, rubratoxin, citrinin, patulin és a penicilinsav.

Az ochratoxin vegyületcsoport A, B, C toxinváltozatokat és azok észtereit foglalja magába. Az ochratoxin súlyos nefropátiát idéz elő, mivel károsítja a vesecsatornák hámszövetét.

(KROGH és mtsai, 1977). A *Penicillium verrucosum* és a *Penicillium nordicum* képes jelentős ochratoxin A képzésre takarmányon, jöllehet az *Aspergillus ochraceus* volt az első kimutatott toxinképző faj. Észak Európában a magas nedvességtartalommal betakarított árpa a leggyakoribb ochratoxin-hordozó, amely sertések nefropátiájáért felelős.

A kérodzok ochratoxikóziisa gyakorlati körülmények között legfeljebb a borjak között fordulhat elő. A szájon át felvett ochratoxin ugyanis a mikrobiológiailag aktív bendoben átalakul és belöle biológiailag inaktív ochratoxin-a és izokumarinsav keletkezik. Egészséges, felnőtt (általában fél évesnél idosebb) szarvasmarhában 1 kg bendotartalom 12 mg ochratoxin A-t képes 48 óra alatt hidrolizálni. Ezt a kapacitást, valamint a szarvasmarha által fogyasztható takarmányadagot figyelembe véve egy felnőtt, egészséges szarvasmarha 10-12 mg/kg toxinkoncentrációjú takarmányt vehet fel anélkül, hogy a káros hatás érvényesülne. Félévesnél fiatalabb borjakban, vagy abban az esetben, ha valamilyen oknál fogva a bendoemésztés károsodott és a detoxikáló mechanizmus nem működik (pl. bendoacidózis), elvileg ennél kisebb terhelés is megbetegedést okozhat.

RIBELIN és mtsai (1978) az ochratoxin A, szájon át adott, letális mennyiségét szarvasmarhában 13 mg/kg-, kecskében 3 mg/kg-ban határozták meg. Tehéntejben és vizeletben kimutatták az ochratoxint. Abortusz és magzatelhalás azonban nem valószínűsíthető. Kérodzok, az ochratoxin hatásának, feltehetően elsősorban az abraktakarmányon keresztül lehetnek kitéve. A toxintartalmú táp etetésekör a borjak étvágytalanságát, hasmenését és gyenge testtömeggyarapodását lehet megállapítani. A szennyezett takarmány cseréje után a probléma rövid idő alatt (2-3 hét) rendeződik (BATA és mtsai, 1990).

A rubratoxint a *Penicillium rubrum* termeli, jellemzően nem csak idos telepekben, hanem már a gomba növekedésének kezdetén is képződik. Magyarországon jelenlétét először az Országos Állategészségügyi Intézetben mutatták ki. A és B változata van. Májelfajulást okoz, de nem karcinogén. A gyomorban, a vastag és a vékonybélben haemorrhagia fejlődik ki, és toxikus májdisztrófia alakul ki. Károsítja az agyszövetet és a központi idegrendszert is (SELLYEY, 1978).

A citrinint (más néven vesetoxint) a *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum*, *P. notatum*, valamint az *Aspergillus terreus* és az *A. candidus* termeli. Kis koncentrációban antibiotikum, nagyobb koncentrációban toxin. Hasonlóan az ochratoxinhoz, a májat és a vesét

károsítja, nem karcinogén. A vese megnagyobbodik, szürkés-sárga színu lesz, a kéregben cysták képződnek, a vizeletkiválasztás fokozódik.

A patulin antibiotikus hatású anyag, amelyet több *Penicillium* és *Aspergillus* gombafaj is képes termelni. Valamennyi mikroorganizmusra toxikus és állatra, emberre is meglehetősen mérgező. Jelentőségét elsősorban az adja, hogy teratogén és rákkelto hatása egyértelműen bizonyított. Megbontja a vér alkotórészei közötti normális arányt, és növeli az erek permeabilitását. (DAILEY és mtsai, 1977b)

A patulin takarmányokban ritkán fordul elő, ha igen akkor elsősorban a nagy nedvességtartalmú takarmányokban és élelmiszerekben kell számolni jelenlétével (gyümölcsök, gyümölcslevek).

Patulin okozta betegségekről állatban nem sok adat áll rendelkezésre. Azonban a juhokban gennyes orrfolyás, csökkent étvágy és bandomotorika, valamint súlyvesztés figyelhető meg (CAMGUILHEM és mtsai, 1976).

A penicillinsav önmagában gyenge toxin, de rendszerint citrininnel és ochratoxinnal együtt fordul elő. Gátolja a tejsav- és alkoholdehidrogenáz, izomaldoláz enzimek működését. (ASHOOR és CHU, 1973a, b)

A *Stachybotrys* genus

JARVIS és mtsai (1980) szerint a *Stachybotrys atra* a takarmányok közül elsősorban a széna- és szalmaféleken – különösen az árpa és zabszalmán – tenyészik, de megtelepszik a szemestakarmányokon is. Sötét színu pigmentet termel, ezért a gomba jelenléte világos színu szalmaszárakon szabad szemmel is jól észrevehető, rendszerint a nodusok közelében. A gombával erosen fertőzött szalma vagy széna mozgatása közben a levegőbe került fekete citrom alakú spórák fekete porfelhőt képeznek. Toxinjai a makrociklikus trichotecén szerkezetű metabolitok közé tartoznak, amelyek legfontosabb képviselői a satratoxin G, F, H, (ezen felül a *Myrothecium* által képzett roridin E és verrucarín J is) (JARVIS és mtsai, 1980). Toxintermelését serkenti, ha a fertőzött (megfeketedett) széna vagy takarmányszalma többször megázik. A *Stachybotrys* gomba feltehetőleg valamilyen kellemes ízanyagot termelhet, mert az állatok nemhogy visszautasítják, hanem a penészes részeket válogatják eloszeretettel.

BATA és mtsai (1988) a juhok stachybotryotoxikózisát Magyarországon egy igen gyakori megbetegedésnek ítélték.

A kérodzoket a stachybotryotoxinokkal szemben hosszú ideig rezisztensnek tartották. VÁNYI (1990) szerint ennek oka, hogy a toxin savanyú közegben a legaktívabb. A kérodzok emésztotraktusában ebből a szempontból a mikotoxikózis kialakulásához meg lehetesen kedvezotlen körülmények vannak. Már a szájüregben hat a toxinra a nyál, amelynek pH-ja 8 felett van. A bendoben a toxinok hosszabb időn keresztül ki vannak téve a bendomikroorganizmusok által termelt enzimek detoxikáló hatásának. Habár ezt a mechanizmust a stachybotryotoxinok vonatkozásában konkrétan még nem tanulmányozták, de a makrociklikus részt nem tartalmazó trichotecénekre vonatkozóan ismert, hogy az átalakításban mind a bendobaktériumok, mind a protozoonok részt vesznek, tehát feltételezhető, hogy így van ez a makrociklikus trichotecéneknél is. A kérodzékör a bendotartalom visszajut a szájba, ahol a nyállal újra összekeveredik. Csak ezután jut ismét a gyomorba, majd a bélcsatornába. Ezen idő alatt a különböző stachybotryotoxinok verrucarollá hidrolizálhatnak, ami gyakorlatilag atoxikus. Ez a magyarázata annak, hogy megfelelő takarmányozás esetén, amikor a bendoemésztés zavartalan, és a bendo pH-ja a normális értéken marad, a szájon keresztül felvett stachybotryotoxin megbetegedést nem okoz. Ha azonban nagymennyiségű szénhidrát-dús takarmány etetése következtében a bendotartalom pH-ja lecsökken, a szervezetbe jutott toxin akadálytalanul kifejti hatását.

A *Stachybotrys atra* (*alternans*) toxinjainak hatását szarvasmarhában és juhban, DANKÓ (1976) kísérletesen is vizsgálta. Kísérleti eredményei szerint a borjak, szájon át adott toxikus árpa hatására, elhullottak. A *Stachybotrys alterans* gomba konídiumainak iv. adásával a kísérleti borjút nem lehetett megbetegíteni (a gomba a borjú szervezetében nem telepszik meg). Juhok esetében toxin hatására leukopenia, thrombocytopenia, vérzéses diathesis, gyapjúhullás, valamint a gyomor-bélcsatorna nyálkahártyáján fekélyek alakultak ki. A betegekben gyakori volt valamilyen másodlagos fertőzés. A toxinadagolás beszüntetése után a károsodott lymphoid rendszer regenerációja hosszadalmas volt, a gombatoxikózisban megbetegedett állatok csak hosszú idő múlva gyógyultak meg teljesen. A makrociklikus trichothecenek jellemző közös ha-

tása a lymphoid rendszerre irányul, és klinikailag immunoszuppresszióban nyilvánul meg.

A toxikózis elleni védekezésben legnagyobb jelentősége a megelőzésnek lehet, amely a *Stachybotrysszal* fertőzött tétel felismerése. Még almozásra is csak gombamentes szalmát szabad felhasználni, mert valamennyi állatfaj alom felvétele jelentős.

A *Fusarium* genus

A *Fusarium* gombák a szántóföldi penészek csoportjába sorolhatók, tehát a kedvező élet- és szaporodási feltételeiket (magas nedvességtartalom) elsősorban a termohelyen találják meg. Szántóföldjeink a monokultúrás gabonatermesztés gyakorlata miatt nagymértékben fertőzöttek. A *fusariumok*, elsősorban mint növényparaziták váltak ismerté, nagy számban találhatóak mind a gabonák, mind a szénák epifita penészflórájában is. A kukorica szárát, de leggyakrabban az érésben lévő csövek csuhélevelekkel fedett végét, a szemeken és közöttük jellegzetes rózsaszín hífásodás alakjában betegítik meg.

Rendszerint laza szerkezetű, fehér, világos- vagy sötétrózsaszínű telepeket alkotnak. Konídiumaik lehetnek makrokonídiumok (2-3 vagy több sejtűek, kifli alakúak, többnyire talp és csúcssejttel) és mikrokonídiumok (1-2 sejtűek, tojás, citrom vagy csepp alakúak). A nemzetségbe tartozó fajok rendszere a mai napig sem egységes.

A *Fusarium* gombák jelentős része képes toxintermelésre. Ugyanazon gombafaj néha többféle toxint is képes termelni, a takarmányon pedig gyakran egyidejűleg több faj is jelen van.

A *fusariumok* többféle toxikus vegyületcsoportot képesek szintetizálni, amelyek biológiai hatásukban, és kémiai szerkezetükben is, nagymértékben eltérnek egymástól.

Az egyik típusú a rezolcilsav szerkezetű toxinok képviselik, ösztrogén hormonhatással. Közülük a zearalenon (F-2 toxin) a legjelentősebb. Az állati szervezet vitális szervrendszereire gyakorolt toxikus hatásuk jelentéktelen, azonban a szexuáliszteroidokat (különösen az ösztrogéneket) kötőszervi receptorokhoz kötődik, és ezáltal, a szaporodás endokrín szabályozását megzavarják. A fusariotoxinok másik csoportját a trichotécén

vázzal rendelkező metabolitok alkotják. Legjelentősebb képviselőik: T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol, nivalenol és fusarenon-X. Toxinhatásuk sejtszinten érvényesül. Sokoldalú hatásuk közül legjellemzőbb a viszonylag alacsony toxinszinteken is jelentkező immunoszuppresszív hatás.

Zearalenon (F-2 toxin, ZON)

Az irodalomból hozzáférhető adatok a ZON kérodzore, különösen tejelő tehenre gyakorolt hatására nézve nem egyértelműek. Ez főleg arra a ZON határértékre vonatkozik, amely felett a teljesítmény, a szaporaság, és az egészségi állapot károsodása léphet fel. A probléma itt is ugyanaz, mint más gazdasági állatok esetében: nem mindegy, hogy a kísérletekben kémiai tisztán ZON-t vagy ismert szintű, természetesen fertőzött, ZON tartalmú takarmányt használtak. A gyakorlatban szokásosan a ZON-t mint „vezértoint” mutatják ki, és a megfigyelt hatás több toxin „koktél”-jének eredménye, ami az egész növény fusariumos károsodásának terméke.

Szénákra vonatkozóan, MIROCHA és mtsai (1968) közöltek esettanulmányt, amelyben 150 tehen termékenyítési indexe 1,2-ről 1,4-re emelkedett miután rossz minőségű szénát etettek. Az analízis 14 mg/kg ZON-t mutatott ki. A széna megvonásakor a termékenyítési index helyreállt. ROINE és mtsai (1971) a hyperösztrogenizmus tüneteként nyálkás kifolyást és egy-két hétig tartó álivarzást írtak le. A koncentrátumból *Fusarium graminearumot* és *Fusarium culmorumot* izoláltak, amelyek *in vitro* körülmények között ZON-t szintetizáltak.

VÁNYI és mtsai, (1974) vulvaduzzanatot, a tejtermelés visszaesését és étvágycsökkenést írtak le, amikor tehenekkel 5-75 mg/kg ZON koncentrációjú takarmányt etettek. MIROCHA és mtsai, (1974) már 1 mg/kg ZON-koncentrációt a tehenek takarmányvisszautasításával, letargiájával és anémiájával tudták összefüggésbe hozni. 12 mg/kg ZON-t tartalmazó cirok vetéléseket okozott. BLOOMQUIST és mtsai (1982) 20 üsző közül kettőben, 8-12 hónapos korban hyperösztrogenizmus tüneteit észlelték. A togyek megnagyobbodtak, holott az üszők még nem ivarzottak és nem lehettek vemhesek. A togyból soványtejszerű váladék volt fejhető. Az etetett kukorica, szemmel láthatólag, gombával fertőzött volt és belőle ZON-t lehetett kimutatni (koncentrációt nem

adnak meg). A kukoricatétel elfogyása után egy héttel a tünetek visszafejlesztettek, és a további szaporaságra nézve nem lehetett hatást kimutatni. WEAVER és mtsai (1986a), holstein üszöknek, 3 ivari cikluson keresztül, naponta 250 mg kristályos ZON-t adagoltak. A fogamzási százalék a kísérleti csoportban 62%, míg a kontroll csoportban 82% volt. Egy másik kísérletben (WEAVER és mtsai, 1986b) két cikluson keresztül 500 mg ZON-t adagoltak, azonban sem a progeszteron koncentrációban, sem a genitáliákban nem találtak eltérést.

Lényegesen alacsonyabb ZON koncentrációjú búza (1,25 mg/kg) tejelő állományban petefészek cystásodást és az üszök uterusának konzisztencia változását okozta (SCHUH, 1981, 1983). DROCHNER (1990) szerint is a hyperösztrogenizmust kiváltó ZON koncentráció 0,5 mg/kg szárazanyag körül van. Ugyancsak hangsúlyozza, hogy a kiváltó koncentráció az állat korától, a bendomikrobák aktivitásától és a felszívódás körülményeitől függ.

Korábban azt feltételezték, hogy a ZON, a bendo mikrobiális hatására bomlik, és ezért a toxinhatás mérséklődik. Ebben a vonatkozásban számos kísérlet látott napvilágot.

KALLELA és VASSENIUS (1982) a ZON lebomlását bendomikrobákkal *in vitro* vizsgálta, a ZON koncentrációjának, a takarmányozási állapot és a takarmány minőségének függvényében. A ZON koncentráció csökkenése alacsonyabb koncentrációk esetében a bevitel után vett bendofolyadékban intenzívebb volt. A takarmányozás típusától (koncentrátum ill. széna) függő különbségek csekélyek és következtelenek voltak. Ezek szerint a leépülés a ZON koncentrációtól és a takarmányozási szerkezettől függ. MIETTINEN és ORANEN (1994) *in vitro* kísérletei is azt bizonyítják, hogy a ZON bomlása annál gyorsabb, minél alacsonyabb a kiinduló koncentráció. VALENTA és VEMMER (1996) sem tudtak egyértelmű összefüggést találni a takarmányozás típusa és az *in vitro* ZON bomlás között. Ezekben a kísérletekben a ZON α -zearalenollá és β -zearalenollá (2:1 ill. 3:1) bomlott, az átalakulások pedig 24 óra alatt a ZON-nak csak 50%-át érintették. Ezen felül megállapították, hogy az α és β -zearalenol (α , β ZOL) 2-6 óra inkubálás után ismét ZON-t képez. A szerzők arra következtetnek, hogy a ZON és a nevezett metabolitok között egy redox-egyensúly van, és emiatt a ZON kvantitatív átalakulása a bendo-ban kérdéses.

KIESSLING és mtsai (1984) a ZON bomlást bendofolyadékkal, izolált bendoprotozoákkal vagy baktériumokkal vizsgálták. Ezek közül a ZON-t a protozoák bontották jobban. A ZON, döntően α -zearalenollá és csekélyebb mértékben β -zearalenollá alakul. MIROCHA és mtsai (1981) a vizeletben vizsgálták a ZON lebomlás metabolitjait, az α és β ZOL-t konjugátlan vagy glukuronát vagy szulfát konjugátum alakban. Az adagolt ZON 50%-a β -ZOL-ként ürült. Ezekben a kísérletekben a bendobeli bomlás mellett az intermediér anyagcsere hatását is mérték. Az α -ZOL a májban is bomlik, amint azt OLSEN és KIESSLING (1983, cit. OLSEN, 1989) májhomogenizátumban kimutatták. Tehénben, ezek szerint a ZON 10-73%-a a májban α ZOL-lá alakult.

A ZON metabolizmusa kapcsán említeni kell az EU 88/146 sz., a hormonális hatású hozamfokozókat tiltó direktíváját. Ez a tilalom a „Zeranol” (α -ZOL), amelyet ZON-ból állítanak elő, is érinti. Az ellenőrzéskor problémát okoz az, hogy ZOL –vagyis zeraanol– természetes úton ZON-ból is keletkezhet (ERASMUSON és mtsai, 1994; KENNEDY és mtsai, 1998). Megállapították azt is, hogy zeraanol-pozitív epe mintákban az α és β -ZOL koncentráció 9-12-szer magasabb volt, mint a zeraanol-negatív mintákban. Az α és β -ZOL aránya legalább 5:1 volt. A szerzők ennek az aránynak a vizsgálatát a zeraanol adagolás kimutatására javasolják.

Deoxynivalenol (DON)

A DON sejtszintje és organikus toxicitása kisebb, mint a többi trichotecéné. Sertésben jellegzetesen emetikus hatású („vomitoxin”), már kisebb koncentrációban takarmányvisszautasítást okoz („feed refusal factor”). Már szubtoxikus koncentrációban is a limfoid rendszerre nézve depresszív, immunosuppresszív hatású.

NOLLER és mtsai (1979) *Giberella zeae*-vel (*Fusarium graminearum*) fertőzött kukoricát etettek tejelő tehénnel. A takarmányfelvétel visszaesett, de a tej- és tejszírtelés nem változott. A súlynövekedés viszont csökkent. DON-ra ugyan nem vizsgáltak, de ugyanezt a kukoricát sertések visszautasították, így a szerzők a DON jelenlétét joggal feltételezték.

Nagyon magas (66 mg/kg) DON-koncentráció adagolása 5 napon keresztül tejelő tehen takarmányfelvételét és tejtermelését nem csökkentette (COTE és mtsai, 1986). 6 vagy 12 mg/kg-os DON tartalmú tejetáp 10 hetes etetése sem csökkentette a tömeg- és ab-raktakarmány felvételt. (CHARMLEY és mtsai, 1993). A tejtermelés sem csökkent. A tejsír és tej mennyiség csökkenése a DON-nal nem volt kapcsolatba hozható, mert 12 mg/kg-nál viszont nem volt csökkenés. INGALLS (1996) 14,6 mg/kg koncentráció 3 hetes etetésekor nem tudott hatást kimutatni. Megjegyezzük, hogy az etetett koncentrációk a sertésre nézve hatékony adagnál (4-6 mg/kg) jelentősen magasabbak.

A DON sorsára a bendoben néhány kísérlet alapján következtethetünk.

KING és mtsai (1984) DON-t, emelkedő koncentrációban bendolével inkubáltak és a lebontást idő függvényében mérték. A DON koncentráció csökkenésével párhuzamosan a bomlástermék, a de-epoxy-DON koncentrációja nőtt. Ez volt a DON egyetlen bomlásterméke. 10 mg/kg DON koncentrációnak megfelelő szintig az átalakulás 24 órán belül tökéletesen végbemegy. E felett 3-acetyl-DON és de-epoxy-DON bomlástípust sikerült azonosítani. 3-acetyl-DON nem volt kimutatható. A szerzők arra következtettek, hogy a bendobaktériumoknak a DON-t de-epoxydáló képessége a kérdőzök DON-nal szembeni védekezésének első lépése.

SWANSON és mtsai (1988), HE és mtsai (1992) és HEDMAN és PETTERSSON (1997) is, a bendolé anaerob inkubálása után a DON és a nivalenol de-epoxydált metabolitjait vizsgálták. KIESSLING és mtsaival (1984) ellentétben, a DON lebontását a bendolében nem tudták kimutatni.

COTE és mtsai (1986), valamint YOSHIZAWA és mtsai (1986) tehenekben *in vivo* metabolizmust vizsgáltak 66 mg/kg DON-t tartalmazó takarmány 5 napos etetése után. A vizeletből DON-t, de főleg annak de-epoxydált alakját azonosították. A vizeletminták enzimes (glukuronidáz, szulfatáz) kezelésének hatására a DON és de-epoxy-DON kimutatható mennyisége nőtt, amelyből a szerzők arra következtettek, hogy a kiválasztódás konjugált alakban történik. PRELUSKY és mtsai (1987b), jelzett DON-t i.v. adagoltak juhoknak és 24 órán belül a rádióaktivitás 91 %-a a vizelettel, 6 %-a pedig az epével ürült. 67 % a DON és a de-epoxy-DON glukuronát-konjugátumában volt mérhető, míg 11 % radioaktivitás, a vesén keresztül, bontatlan formában ürült.

Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a bendolével folytatott *in vitro* kísérleteket, az *in vivo* viszonyokra nézve csak fenntartással szabad fogadni, mert ezek az intermedier anyagcserét, különösen a máj konjugáló funkcióját figyelmen kívül hagyják.

T-2 toxin és származékai DAS, HT-2, nivalenol

HSU és mtsai (1972) esettanulmányt közöltek tejelő holstein tehénekről, amelyek penészes kukoricát kaptak. Az 5 hónapos etetés alatt 35 tehénből 7 elhullott. A kukoricában 7 mg/kg T-2 toxin volt. Boncoláskor a serozákon bovéruség és vérzések voltak. A kukoricából készített kivonatok orális adagolása dóziszfüggő mortalitást, borre dörzsölve erős bor-irritációt okoztak.

PIER és mtsai (1980) borjakkal 21 napig tartó 0,64 mg T-2/kg takarmány etetése után, a súlyfelvétel 20%-os visszaesését közölték.

YOSHIZAWA és mtsai (1981) egy 375 kg élő súlyú jersey tejelő tehénben vizsgálták a T-2 toxin metabolizmusát. 3 napon át napi 180 mg kristályos toxint orálisan adagoltak. A negyedik napon 157 mg jelzett toxint vittek be. Ezt követően a plazmában, a bélsárban, a vizeletben és a tejben a radioaktivitás maximumát 4 napon keresztül mérték. 72 órán belül a teljes radioaktivitás kiürült a bélsárban és vizeletben, és csak 0,2 % a tejben keresztül. További kromatográfiás analízisek azt mutatták, hogy a kiinduló toxin jelentős része a legkülönbözőbb metabolitok alakjában ürült. CHATTERJEE és mtsai (1986) a metabolitokat részletesen tanulmányozták. Egy holstein tehénnek, egyszeri orális adagban 200 mg T-2 toxint adtak, ez után vér és vizelet mintákban a toxint és metabolitjait 48 órán keresztül analizálták. A 24. óra után a vérből csak csekély mennyiségű T-2 toxint és metabolitjait, HT-2, T-2 Tetraol, TC-3 (3'-hydroxy-HT-2) formájában tudták kimutatni, a dőntő mennyiség metabolizálódott és a vesén keresztül kiürült. A vizeletben nem lehetett T-2 toxint találni, míg metabolitok, HT-2, TC-1 (3'-hydroxy-T-2 toxin), TC-3, iso-TC-1 (3'-hydroxy-iso-T-2 toxin) és T-2 Tetraol ürültek. Ezen felül a TC-3 és a T-2 Tetraol de-epoxydált formája is megjelent a vizeletben. Kísérleti vágást követően a szervanalízisek (tüdő, szív, máj, vesék) nem mutattak T-2 felhalmozódást.

MUNGER és mtsai (1987) jelölt T-2 toxint bendofolyadékkal inkubáltak. HT-2 mellett acetyl-T-2 és acetyl-HT-2 toxinokat találtak. A szerzők a T-2 toxin és a három metabolit egymásba történő kölcsönös átalakulására következtetnek. A C-8 vagy C-15 helyeken észter-hidrolízisre vagy de-epoxydálódásra nem tudtak következtetni. Mint hogy az acetylált metabolitok a kiinduló vegyületeknél polárosabbak, a szerzők szerint ezek könnyebben szívódnak fel.

WESTLAKE és mtsai, (1987a,b) a trichotecének bomlását izolált bendobaktériumok közegében vizsgálták. Az acetyl-T-2 toxin *Butyrivibrio fibrosolvens* CE51 hatására T-2 és HT-2 toxinokra bomlik. A T-2-ből HT-2, T-2-triol és neosolaniol képződik. Azt, hogy az acetyl-T-2 toxin bomlásakor T-2 triolt és neosolaniolt nem lehetett kimutatni, az analitikai technika érzéketlenségének tulajdonítják. SWANSON és mtsai, (1987) a T-2 bendolével történő inkubálása során a HT-2, T-2-triol és ezek de-epoxydált alakjait is kimutatták.

Diacetoxyscirpenol (DAS)

SWANSON és mtsai, (1988) bendolével történő inkubálás során mono-acetoxyscirpenolt (MAS) és scirpentriolt (SCT) és ezek de-epoxydált metabolitjait mutatták ki. Hasonló eredményeket adott, amikor DAS-t marha bélsárral inkubáltak. Arra következtettek, hogy a bendoflóra és a vastagbélflóra egyforma módon bont.

A hazai kazuisztikai adatok azt mutatják, hogy a T-2 toxin és származékai, mint kockázati tényező a kórokozókban alárendelt. (MÁTRAI és mtsai, 2003)

Fumonizinek

A fumonizinek hízómarhákra (15-148 mg FB1+FB2+FB3, 31 napig, OSWEILER és mtsai, 1993) és angóra kecskékre (95 mg FB1/kg, GURUNG és mtsai, 1998) a súlygyarapodás tekintetében hatástalanok. A táplálóanyag emészthetőség kecskében változatlan. Mindkét kísérletben májkárosodás mutatkozott (nekrózist jelző enzimek a szérumban).

Fumonizinek hazai előfordulását és toxicitását FAZEKAS (1998) kiterjedten vizsgálta. Megállapította, hogy a penészes kukoricaminták 70 %-a tartalmaz fumonizin-B1 toxint, többségben azonban a toxikus mérték alatt. Modellkísérletben bizonyította, hogy a sertések hízlalási tüdőviznyojét fumonizin-B1 okozza. Leírta, a legérzékenyebb állatfaj, a ló, fumonizin-B1 okozta agylágyulását is.

Az *Alternaria* genus

A közönséges szántóföldi penészflóra gyakori képviselője, és az egészséges széna terméktipikus penészflórájának szinte legjelentősebb eleme az *Alternaria* nemzetség. Hífái sötétbarna micéliumot képeznek, gyorsan és dúsan növekednek. Konídiumaik többsejtűek, összetettek, jellegzetes formájúak. Több mint 30 különböző szerkezetű alternariatoxint ismerünk. Legjelentősebb az alternariol, alternariol-monometiléter, altenuen és a tenuazonsav. Legerősebb akut toxicitást a tenuazonsav (Phoma fajok is termelik) mutatja. Gátolja a fehérjeszintézist, a fehérje riboszómáról történő leválásának gátlásán keresztül, ezen kívül antitumorális, antivirális és antibakteriális hatása is van. Másrészt viszont egérben, a magzati fejlődést befolyásoló teratogén hatást is kimutatták (ANTONY és mtsai 2002).

Mint hogy *Alternaria* jelenléte a takarmányon jóformán mindig kimutatható, a kutatókat érthetően, az izolálható törzsek toxintermelő képessége és a toxintermelést indukáló környezeti feltételek foglalkoztatták.

CCM-ból és szénából izolált *Alternaria* törzsek toxintermelését MULLER (1992) vizsgálta. 87 izolátum alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), altenuen (ALT) termelését és 50 izolátum tenuazonsav (TeA) termelését mérte. Optimális tenyésztési körülmények között a törzsek 100%-a termelt AME-t és TeA-t, 77%-a termelt AOH-t, és 18%-a termelt ALT-t. A toxinkoncentrációk AME esetében 0,08-482 (162) ppm, AOH esetében 0,05-1862 (121) ppm, ALT esetében 0,1-34 (9,1) ppm és TeA esetében 0,02-42 (11,3) ppm/ 100ml folyékony tenyészgözege volt.

MAGAN és LACEY (1984) különböző vízáktivitás és hőmérséklet hatását vizsgálta az *Alternaria* toxintermelésére. Búzaagaron és búzaszemeken tenyésztett telepek altenuen (AE), alternariol (AOH) és alternariol monomethyl ether (AME) termelését vizsgálta. 25°C fokon és 0,98 $a_{(w)}$ esetében AOH 807, AME 603 és AE 169 mikrogramm/ml mennyiségben termelődött 30 nap alatt. 0,95 $a_{(w)}$ közegében az elobbi értékek csupán 40%-a volt detektálható. 0,90 $a_{(w)}$ -nál nagyon kevés toxin képződött. 15°C hőmérsékleten és magas vízáktiváción (0,98) az AOH 52, AME 25 mg/ml mennyiségben volt ki-mutatható 30 nap alatt, Az AE csak a 40. nap után volt detektálható 57 mg/ml mennyi-ségben. Ezen a hőmérsékleten de 0,95 $a_{(w)}$ -on AOH 62, AME 10 és AE pedig csak 5 mg/ml mennyiséget ért el 40 nap után. 30 és 5°C-on különböző vízáktiváción is mér-tek alacsonyabb toxintermelést.

SODERHALL és mtsai 1978-ban vizsgálták a fehér fény (180 W/m²) hatását az *Alternaria alternata* toxintermelésére. Eredményeik szerint már 12 óra fényhatás ele-gendo a toxintermelés szignifikáns csökkenéséhez.

A *Trichothecium* genus

A széna terméktipikus flórájában *Trichothecium* nemzetségből csupán néhány faj fordul elo, viszont néha jelentos számban. Világos rózsaszínu, narancsszínu vagy krémszínu pelyhes telepeket képeznek. Konídiumaik jellegzetes körte alakúak, kétsejtűek.

Az irodalmi adatok szerint toxintermelésük jelentos lehet, toxinjaik a trichotecén szer-kezetűek: trichodermin, trichodermol, trichotekolon, trichotecin és krotocin (cefalote-cin) (BATA és mtsai, 1990). Eloffordulásukkal a takarmányban és a kártételükkel kap-csolatos kliniko-patológiai és kazuisztikai adatok nem állnak rendelkezésre.

A *Phoma* genus

A *Phoma* genust már 18.-19. században izolálták vöröskáposztáról. Fómás levélfoltos-ság néven a zöldségnövények (karfiol, kelbimbó, kelkáposzta) kórokozójaként vált is-merté (WILLIAMS, 1992).

Takarmánynövények közül főleg a repcén, a csillagfürtön, és a szénákon fordul elő.

Betakarítás után a gomba gyorsan átterjed a még nem fertőzött szár és gyökérmaradványokra, és akár 10 évig is képes fennmaradni (PRIESTLEY és KNIGHT, 1985). A tárolón a fertőzött és egészséges szármaradványok jól elkülöníthetők. A fómás száraz kivilágosodnak, fakós szürkék, szárazak, piknidiumok figyelhetők meg rajtuk (LORINCZNÉ, 1998).

A *Phoma* genus által termelt toxinok a protofomin, proxifomin, deoxafomin, fomin (citokalazin B), dehidrofomin (citokalazin A) amelyeket a citokalazánok csoportba soroljuk továbbá a fomeon, a szekalonsav E és a tenuazonsav, amely endémiás hematológiai megbetegedésekért felelős (BATA és mtsai, 1990).

A *Cladosporium* genus

A learatott gabonát, ha megázik, fekete, koromszerű foltok szokták belepni. A kormoságot a *Cladosporium herbarum* nevű gomba okozza.

A kültéri levegő gombaspóra tartalmáért legnagyobb mértékben a *Cladosporium* genus felelős, amely a Földön szinte mindenütt megtalálható, és az egész éves gombaspóraminták 40-60 %-át adja. A genus legelterjedtebb képviselői a *Cladosporium herbarum*, a *Cl. cladosporoides*, a *Cl. sphaerospermum* és a *Cl. elatum* amelyek közül a *Cl. Herbarum* a leggyakrabban kimutatható faj. Ez a penészgomba főként fűszálakon található, és spórái kaszálás után, júliusban kerülnek legnagyobb mennyiségbe a levegőbe. A gomba toxintermelésére (pl. emodin) nem fordítanak nagy figyelmet, de bizonyítottan részt vesz különböző betegségek kialakulásában, mint pl. keratitis, sinusitis, allergiák, fertőzések (PITCHARD és MUIR, 1987). Barna hifái megfigyelhetőek a megfertőzött szövetmintákban.

A *Cladosporium* fajok vizsgálataink szerint a terméktipikus szénáflóra domináns képviselői, ezért esetleges toxikológiai szerepük figyelmet érdemelhet.

A *Mucor* genus

A járomspórás gombák (aszeptált hifák) legfontosabb képviselői a *Mucor*-félék, amelyek állat-egészségügyi, élelmiszer- és takarmánymikrobiológiai szempontból is jelentősek.

Elofordulnak szinte mindenhol, a talajban, a növényeken, a gyümölcsökön és akár az állati termékeken, húson is. Kimutatásukat megkönnyíti, hogy eroteljes, gyors növekedéssel vastag légmicélium-tömeget képeznek a hagyományos penészvizsgálati táptalajokon.

A *Mucor*-félék által eloidézott mycosisok ritkák az állatok között. Tipikus esetben a bántalmak granulómás megbetegedések, amelyek a nasalis régiót, vagy a végtagokat érintik. Esetenként baromfifélék tüdő- és légzőszármikózisát idézhetik elő és a szarvasmarhák vetélésében játszott szerepük is igazolt (SZIGETI, 1997).

2.3. A penészek tömeges felszaporodásáért (gradáció) felelős tényezők és hatásai

2.3.1. A penészgombák életfeltételei

Életfeltételeiket tekintve a penészgombák, a környezeti feltételek (atmoszféra, aeráció, hőmérséklet, kémhatás, vízaktivitás, tápanyagok, stb.) tág határai között életképesek (szaporodnak, folytatnak anyagcserét, vagy éppen csak túlélnek). E feltételeknek azonban szelektáló szerepük van a biotópba (termohelyre) betelepülő fajok minősége, valamint kifejtett anyagcsere típusa szempontjából. Tápanyagfogyasztásukkal ill. lebontó tevékenységükkel és anyagcseretermékeikkel pedig maguk is hozzájárulnak a biotópbeli feltételek folytonos változásaihoz (BATA és mtsai, 1990).

A gombák növekedését befolyásoló legfontosabb tényezők:

- vízaktivitás;
- pH;
- homérséklet;
- atmoszféra (oxigén és széndioxid);
- struktúra;
- tápanyagok.

2.3.1.1. A vízaktivitás

Természetes körülmények között, adott takarmányféleségben (szubsztrát) a mikroorganizmusok szaporodását leginkább annak nedvességtartalma ($w_{(s)}$, %) határozza meg. Eltérő nedvességtartalmú különböző szubsztrátokon hasonló mikroorganizmuspopuláció képes fejlődni, de ilyenkor a szubsztrátok eltérő víztartalmuk ellenére zárt környezetükben felettük azonos relatív légnedvességet állítanak be. Mindez arra utal, hogy nem a szubsztrát abszolút nedvességtartalma, hanem annak egy adott homérsékletre vonatkozó relatív nedvessége (RP, RH) az a tényező, amely a mikroorganizmusok növekedésével szoros korrelációt mutat. Számszerűen, a szubsztrátban uralkodó relatív nedvesség a következő összefüggéssel definiálható:

$$RH \% = \frac{w_{(s)}}{w_{(st)}} \times 100$$

ahol $w_{(s)}$ = a szubsztrát aktuális nedvességtartalma, %

$w_{(st)}$ = a szubsztrát telítéséhez szükséges nedvességtartalom, %

A szubsztrát nedvességtartalma és a környező légtér relatív nedvessége adott homérsékleten (és zárt térben) egyensúlyra vezet. Egyensúly esetén zárt légtér relatív nedvessége azonos a szubsztrát relatív nedvességével (egyensúlyi RH), amelyet %-ban fejezünk ki.

A tárolt termékek nedvességviszonyait a szubsztrát abszolút (súlyszerinti) nedvességtartalmánál a vízaktivitási érték pontosabban jellemzi. A vízaktivitás ($a_{(w)}$) egy viszony-

szám, amely a termék nedvességtartalmából képzodo parciális goznyomás, valamint a tiszta víz goznyomásának aránya egy adott homérsékleten:

$$a_{(w)} = \frac{\text{a termék goznyomása}}{\text{a víz goznyomása}}$$

Így a tiszta víz $a_{(w)}$ értéke 1,0. Az egyensúlyi RH% és a vízaktivitás parciális goznyomásuk arányán alapuló definícióit összevetve belátható, hogy a termék által zárt térben és adott homérsékleten egyensúlyt tartó RH % 1/100-része az $a_{(w)}$ értékével azonos.

A különféle szubsztrátokon az egyes mikroorganizmus csoportok fejlődésének megindulása döntően a vízaktivitás mértékétől függ (2. táblázat), amelyet azonban egyéb környezeti tényezok jelentosen befolyásolhatnak. (SZIGETI, 1997)

2. táblázat. Mikroorganizmusok fejlődéséhez szükséges minimális $a_{(w)}$ -érték
(SZIGETI, 1997)

Mikroorganizmus	$a_{(w)}$ -érték
Gram-negatív baktérium	1,00-0,95
<i>Bacillaceae</i> -család	0,95-0,91
Élesztogombák	0,91-0,88
Penészgombák	0,88-0,80
<i>Staph. Aureus</i> , halof. Bakt.	0,86-0,75
Xerofil penészek	0,75-0,65
Ozmofil élesztok	0,65-0,60

Az optimális növekedéshez szükséges egyensúlyi RH-értékek nyomán xerofil, mezofil és higrofil gombákat különböztetünk meg. (3. táblázat)

3. táblázat. Penészgombák csoportosítása nedvességigényük alapján (SZIGETI, 1997 nyomán)

	Nedvességigény, RH	Fajok
Xerofil gombák	75-95 %	<i>Aspergillus glaucus</i> <i>Asp. restrictus</i> <i>Asp. versicolor</i>
Mezofil gombák	95-100 %	<i>Cladosporium</i> <i>Alternaria</i> az <i>Aspergillus</i> és <i>Penicillium</i> fajok többsége
Higrofil gombák	98-100 %	<i>Fusarium</i> <i>Epicoccus</i> <i>Mucorales</i>

A szárazabb körülmények között is növekvő gombák megjelölésére helyesebb a xerotoleráns vagy az ozmotoleráns megjelölést használni, mert életük magas vízaktivitáson is zavartalan, de az alacsony vízaktivitást is elviselik.

2.3.1.2. A pH

A penészgombák pH igénye és tűrése a baktériumokkal ellentétben elég tág. Növekedésükre a pH 3 és 8 közötti értékeken csak kis hatással van. PITT és HOCKING (1997) szerint némely faj akár pH 2-n is képes életben maradni. Anyagcseréjük során savtermészetű anyagokat termelnek, így kis pufferkapacitású közegben környezetük pH-ját csökkentik. Ez, többek közt, a baktériumflóra növekedésének visszaszorításával is jár.

2.3.1.3. A hőmérséklet

A gombák között az alacsony hőmérsékletet kedvelőktől (pszichrofilektől) a termofilekig minden változat fellelhető. Legnagyobb részük azonban mezofil, hőmérséklet optimumuk 25 °C (MAGAN és LACEY, 1984; GOTO és mtsai, 1989; GRANT és mtsai, 1989; NIKULIN és mtsai, 1994).

Az igen gyakori *Aspergillus flavus* és *Asp. niger* például 8 és 45 °C között erőteljesen szaporodik (PANASENKO, 1967). Néhány faj kismértékben, de növekszik –7 és 0 °C között is. Ilyen például a *Fusarium* (JOFFE, 1962), a *Cladosporium* (PANASENKO, 1967; GILL és LOWRY, 1982), és a *Penicillium* (MISLIVEC és TUIE, 1970).

COONEY és EMERSON (1964) két csoportba sorolta a penészgombákat. A termotoleráns gombák 20 °C alatt és akár 50 °C közelében is életképesek. Ezzel szemben a termofil csoport már nem él meg 20 °C alatt.

2.3.1.4. Az atmoszféra (oxigén és széndioxid)

A penészgombák aerob légzése számára abszolút követelmény az oxigén (FOSTER, 1949; HAWKER, 1950). A szubsztrát oldott oxigéntartalma azonban nagyobb hatással van a gombák növekedésére, mint a légköri oxigén. Például a *Penicillium expansum*, gyakorlatilag teljes növekedést mutat a levegő 2,1 %-os oxigéntartalma esetén (GOLDING, 1945). HOCKING (1989) különlegesen alacsony – 1,0 %-os – oxigéntartalom hatását vizsgálta, ami a penészek többségének növekedését csak kis mértékben csökkentette. HALL és DENNING (1994) 24 különböző *Aspergillus* faj növekedését vizsgálta különböző (0; 0,025; 0,1; 0,5; 2,5) oxigéntartalom, 5% CO₂ mellett. Oxigénmentes és extrém alacsony, tehát 0,025% oxigéntartalmú közegben, a penészek nem fejlődtek ki, de 0,1%-os oxigéntartalomnál és a fölött, már 88%-os növekedést mutattak.

A penészek széndioxid érzékenysége nagyon változó. Számos *Aspergillus* és *Penicillium* faj növekedését serkenti a széndioxid mennyiségének növekedése 15%-ig. Ennél magasabb szint azonban már negatív hatással van (GOLDING, 1945). A

Penicillium roqueforti az atmoszféra 80 %-os széndioxid tartalmakor is mutat kismértéku növekedést (GOLDING, 1945).

A fenti kísérletek alapján arra lehet következtetni, hogy a zöldszakarmányok zárt térben történő erjesztése során a penészek szaporodását nem annyira az oxigén elfogyása, mint a széndioxid felszaporodása szorítja vissza.

2.3.1.5. Tápanyagok, energiaforrás

A takarmányok romlását előidéző penészfajok elsődleges tápanyagai szénhidrátok, amelyeket szén és energiaforrásként hasznosítanak. Ezek mellett más szerves anyagokon, köztük fehérjéken is megélnek. Nitrogénforrásként szerves vegyületek (ammónium-sók, nitrátok stb.), és nitrogéntartalmú szerves vegyületek egyaránt hasznosíthatók.

A gombák a tápanyagok egy részének (cellulóz, szacharóz, fehérjék) lebontását a környezetükbe kiválasztott enzimekkel kezdik meg, ezáltal hozzáférhetővé teszik más mikroorganizmusok számára is (meghatározott mikroba-asszociációk és mikrobaszukceszziók egyik oka). Számunkra káros az, hogy anyagcseretermékei között számos olyan vegyület szerepel, ami élőlényeket, sokszor más gombákat is károsít (pl. oxálsav, antibakteriális és antifungális antibiotikumok, mikotoxinok) (SZIGETI, 1997). Metabolit-szuppresszió, a penészgombák szaporodásakor, ritka.

2.3.1.6. Struktúra

A penészgombák a szilárd szubsztrátokat részesítik előnyben (szemes és szálas anyagok, gyümölcsök). Azonban számos faj (pl. *Mucor*, *Fusarium*) a folyékony-félfolyékony halmazállapotú szubsztrátokon történő életmódhoz is alkalmazkodott (melasz, cukrozott szörpök). Megfigyelhető a folyadék/atmoszféra határfelületeken történő szaporodás során a szárazabb közegbe irányuló konidió-taxis.

2.4. A széna sajátosságaihoz igazodó penészvizsgálati módszerek adaptációja

A mikrobiológiai vizsgálat a minták baktériumos és mikrogombás fertőzöttségét, és annak mértékét állapítja meg.

A takarmánymintákat a laboratórium mindenképp nyilvántartásba veszi, majd ezt követi a küllemi leírás és érzékszervi minősítés. A minta laboratóriumi vizsgálatra való előkészítése – a szálások és szilázsok kivételével – lisztfinomságúra orlést jelent. A szénák és szalmák előkészítése csupán durva szecskázásból áll. A szilázsok előkészítést nem igényelnek.

A penészfertőzöttség meghatározására irányuló módszerek több csoportba oszthatók:

- 1) Direkt mikroszkópia, a penészből származó elemek, propagulumok (micélium és spórák) azonosításával és kvantifikálásával,
- 2) Tenyésztéses módszerek a penésznövekedést megindítani képes propagulumok telepkező egységeinek (TKE) meghatározásával, a jelenleg érvényes autentikus horizontális szabványmódszer, vagy azzal analóg eljárások szerint,
- 3) Kémiai módszerek (pl. kitin, ergoszterin meghatározás) a penészekre jellemző biomassza elemek vagy metabolitok kimutatása alapján,
- 4) Immunológiai módszerek (pl. ELISA, latex agglutinációs teszt),
- 5) Fizikai módszerek (pl. közeli infravörös technika, elektronikus orr),
- 6) Metabolikus módszerek (enzimtermelés, invertáz), a közeg vezetőképességének a mikrobametabolitok hatására beálló vezetőképesség-változás mérése (impedimetria),
- 7) Molekuláris biológiai módszerek.

Munkám során a direkt mikroszkópia, a lemezöntéses technika, metabolit (β -fruktofurazonidáz enzim) kimutatásán és molekuláris biológiai módszerekkel végeztünk kísérleteket, amelyek célja a szénák penészflórájának jobb, zavartalan megítélése, a vizsgálati idő rövidítése és a korszerű molekuláris biológiai módszerek kipróbálása volt.

2.4.1. Direkt mikroszkópos módszerek

A mikroszkópos vizsgálatok a takarmányok penésztartalmának gyors becslését teszik lehetővé, bár csak relatíve magas szennyeződési szintek detektálására alkalmasak. Te-

kintettel a szénák eleve magasabb terméktipikus penészszáma, a mikroszkópos vizsgálat mégis szóba jöhet.

Az élelmiszerek penészszenyezettségének ellenőrzésére használt és ajánlott mikroszkópos módszer a történeti, Howard módszer (HMC: Howard Mould Count), amit HOWARD (1911) eredetileg paradicsom-készítmények nyersanyag-penészedésének és a gyártásközi higiénia utólagos ellenőrzésére dolgozott ki. A módszer standardizált mikroszkóp-látómező kiértékelésén alapszik, ami a penészszenyeződés mértékének becslésére szolgál. Pozitív a látómező, ha 3-nál nem több penészfonal darab egyesített hossza, a látótér átmérojének 1/6 részét meghaladja. A termék osztályozására a pozitív mezok arányát használják.

A Howard módszer jelentős szubjektív hibával terhelt. Nagy gyakorlattal rendelkező, morfológiában jártas szakembert igényel, a vizsgálat a szemet erosen igénybe veszi, és a vizsgáló fáradása a kimutatás bizonytalanságát növelheti, a módszer variációs koefficiense 15% (DAKIN, 1974; JARVIS, 1977; PETTIPHER és mtsai, 1985).

Hangsúlyozandó, hogy a Howard módszer és annak továbbfejlesztett változatai, vizes közegben felszaporodott penészek micéliumainak megfigyeléséből és kvantifikálásából áll. A takarmányokon és így a szénán szaporodó penészek propagulum-képleteiben ugyanakkor a rendkívül nagy spóratömeg dominál. A szénák penészfertőzöttségének megállapítására kialakított mikroszkópos módszernek elsősorban a spórák kimutatását, megkülönböztetését és számolását kell lehetővé tennie.

A Howard módszer fejlesztésével az elmúlt 20 évben már többen foglalkoztak. Ilyen törekvés a szűrővel összekötött epifluoreszcens mikroszkópos technika (Direct Epifluorescent Filter Technique, DEFT) kidolgozása volt (PETTIPHER és RODRIGUES, 1982). A módszer a minta elokezelését követően membránszűrősen alapszik, amely fel fogja a propagulumokat. Ez után a membránt fluoreszkáló festékkel megfestik, majd öblítés után fluoreszcens mikroszkópiát végeznek. A mikrobák a membrán felszínén jól láthatók és könnyen számolhatók.

KISKÓ és mtsai (1997) fűszerek mikrobiológiai vizsgálatára használták a DEFT technikát. A penésztartalom meghatározására azonban a micéliumok élelmiszertől való szeparálásában fellépő problémák és a megbízhatatlan festedések miatt ezt a módszert ke-

vésbé alkalmasnak találták. Problémát a növényi eredetű fonalszerű képletek, szorók, rostok és a propagulumok biztos megkülönböztetése jelent.

A Howard módszer továbbfejlesztésének másik útja, a mikroszkópiát segítő, új festési technikák kialakítása. A penészgombák preparátumkészítése, ill. szelektív festése nagyban különbözik a baktériumokétól, mert mind a hifa, mind a konídium felületének kémiai szerkezete eltér a Gram-pozitív vagy Gram-negatív baktériumokétól. A festett elemek mikroszkópos értékelése áteső fényben, vagy dia- ill. epifluoreszcens megvilágításban egyaránt szokásos.

MATSUOKA és mtsai (1995) kongóvörös festéket ajánlotta a hifa fluoreszcens festésére. A kongóvörös a β -poliszaccharidokkal lép kapcsolatba, így kötődik a kitin lánchoz is. A minták fluoreszcens intenzitását a szaporodási görbe összefüggésében vizsgálva azt tapasztalták, hogy a kongóvörös alkalmas a nem növekedő, és a növekedésben lévő hifák megkülönböztetésére.

SÖDERSTRÖM (1977), új módszert dolgozott ki a talaj gombamassza tartalmának mérésére, ami fluorescein-diacetátos (FDA) festésből és epifluoreszcens mikroszkóp használatából áll. Annak ellenére, hogy csak a FDA hidrolízisére képes aktív mikroorganizmusok fluoreszkálnak, a módszer jól reprodukálható eredményeket nyújtott a talajminták kvantitatív vizsgálata esetén.

BLASER (1978) nem fluoreszkáló festési technikát és direkt mikroszkópi módszereket hasonlított össze különböző élelmiszerminták penész tartalmának kvantitatív meghatározására. Az eredmények azt mutatták, hogy csekély fehérjetartalmú termékek esetén (pl. fuzerek, dió) a Pianese-eljárás (festés malachitzöld, fukszín, valamint martius-sárga keverékével) volt a legkedvezőbb. A kis poliszaccharid tartalmú élelmiszerek esetében (pl. tej, hús) a perjód-sav-Shiff reakció (festés perjód-savval és pararozanilinnel) adott jó eredményeket. Pianese festéskor a hifák és vékonyfalú spórák, a vékonyfalú nem fásodott növényi sejtek, valamint a fehérjék vörösre, a fásodott, vastag falú növényi sejtek és a keményítő szemcsék zöldre színeződtek.

A „Calcofluor White” (CW) fluoreszkáló tulajdonságú festék a kongóvöröshöz hasonlóan specifikusan kötődik a β -konfigurációjú poliszaccharidokhoz, így a gombasejtek

falában található kitinhez is, a gombasejtek pedig kékeszölden világítanak. A módszer rendkívül megbízhatónak bizonyult a gombás borbetegségek diagnosztizálására (KISS és mtsai, 1995).

FREUDENBERG és mtsai (1996) akriddinranacs festéket használtak különböző táptalajon tenyésztett *Aspergillus awamori* növekedésének vizsgálatára. JUHÁSZ (2000) *Aspergillus nidulans*-t festett akriddinranaccsal és a megfestett micéliumot epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgálta. Megfigyelte, hogy a csírázó spórák előbb vörösen, majd egyre nagyobb számban zölden fluoreszkáltak, jelezve metabolikus aktivitásuk fokozódását. A növekedés leálltával visszatért a vörös szín, de újból növekedést serkentve (glükóz hozzáadása) a fluoreszcencia ismét zöldre változott.

A mikroszkópos penészmeghatározás egyik változata a tárgylemeztenyészet készítése, amely a növekedésnek induló propagulumok közvetlen mikroszkópos vizsgálatát teszi lehetővé, a tenyészet megbontása nélkül. Az egyszerű morfológiai illetve festés útján történő meghatározással szemben ez a módszer csak az életképes propagulumokat mutatja ki. A módszert VASS KÁROLY dolgozta ki, és részleteit KISS (1978) írta le:

Egy tárgylemezen, paraffinnal vagy fogászati viasszal – a fedolemez méretének megfelelően – 1-2 mm magas „gátakat” képezve, egy négyzet 3 oldalát alakítjuk ki. Ezután egy megmelegített fedolemezt nyomunk óvatosan rá. Az így képzett, egyik oldalán nyitott tárgylemezkamrába cseppentjük a megolvasztott, és 50 °C-ra lehűtött tápaggarral kevert penészinokulumot úgy, hogy az a tárgylemezkamrát kétharmad/háromnegyed részéig töltse ki. Ezután a lemezt, megnedvesített szuropapírt tartalmazó steril Petri csészébe tesszük. 24-72 órás inkubáció után, a tárgylemezkamra mikroszkóppal közvetlenül vizsgálható.

2.4.2. Tenyésztési módszerek

A penészsám, a fertőzöttség meghatározásának hivatalos módszere jelenleg, a telepkepző egység szám (TKE) meghatározása szilárd táptalajon.

A TKE az életképes spórák, és eltöredezett, de továbbnövekedésre képes hifa részek (propagulum) meghatározására alkalmas, de időigényes, és a minta előéletéről számot

adó holt penészsám meghatározására alkalmatlan módszer. A kapott TKE szám értelmezése nem egyszerű feladat, hiszen ha penésznövekedés figyelhető meg egy mintán, a magas élő penészsámot nem csak a nagy számú ivartalan szaporító képlet, hanem a micélium szövetek is okozza. A micélium szétterjedésének mértéke pedig függ a körülményektől, a minta előéletétől, összeállításától, a minta preparálásától, a homogenizálás típusától és körülményeitől (BLASER, 1978a).

Ezen túl, a különböző penész fajok spórázása is különböző fokú, ami szintén nehezíti a meghatározást. Gyakran figyelhető meg az is, hogy a penésztartalmú minta hígítási tagjai nem követik a decimális hígítást (KISKÓ, 1998). Ennek magyarázata lehet a micéliumok darabolódása és az összetapadt spórák, konídiumok csomóinak szétesése a hígítás alatt. A felhasznált tápközeg minősége is befolyásolja az élő penészsámot (BLASER, 1978b).

Abraktakarmányok, de különösen szénák esetében a propagulumok összetételében a hífetöredékek száma elenyésző a spórákéhoz képest.

Szelektív és differenciáló táptalajok

Az utóbbi 15-20 évben megindult törekvés az egyes penészgomba csoportok specifikus kimutatására és számolására alkalmas táptalajok fejlesztése. Az ilyen táptalajok használata egyszerűbbé, és gyorsabbá teheti a különböző penész nemzetségek és törzsek élelmiszerből való izolálását és meghatározását. További nagy előny a mikotoxinogének kimutatásának lehetővé tétele, ami gyakran könnyebb és gazdaságosabb feladat, mint a toxin kimutatása.

A szelektív táptalajok nemcsak a baktériumok növekedését, hanem a táptalajt gyorsan befutó, gyorsan növekedő penészek szaporodását (*Rhizopus* spp., *Mucor* spp.) is szuppresszálják, valamint csökkentik a talajon növekvő penésztelepek méretét, és ezzel megkönnyítik a telepek számolását.

A mikológiai táptalajokban, a baktériumok visszaszorítására, számos antibiotikumot használnak: kloramfenikol, klórtetraciklin, oxytetraciklin, gentamicin és sztreptomycin,

illetve ezek kombinációi. Az élelmiszerek mikológiai minosítésére használt módszerek standardizálásáról tartott fórumon (Second International Workshop on the Standardization of Methods for the Mycological Examination of Foods, 1990), a táptalajjal együtt sterilizálható kloramfenikol használatát javasolták 100 ppm koncentrációban.

Sok gondot okoznak a táptalajt hamar befutó gyorsan növekedő penészgomba fajok, amelyek a kiértékelést nehezítik, gyakran lehetetlenné teszik. Rose Bengal hozzáadásával, a *Mucor* és *Rhizopus* spp. telep mérete korlátozható, ugyanígy az élesztős invázió is (JARVIS, 1973). KING és mtsai (1979) fejlesztése a dichloran-Rose Bengal-chlortetracyclin (DRBC) táptalaj, amely nagyban csökkenti a telepek szétterjedését, a spórák csírázásra azonban nem hat.

Aspergillus spp. kimutatására alkalmas szelektív táptalajok: BOTHAST és FENNEL (1974) fejlesztették ki az *Aspergillus* differenciáló táptalajt (ADM), ahol a differenciáló alkotórész a vas(III)-citrát (0,05%) volt. A vas(III)-citrát koji-savval reagálva, jól látható, nem vízoldható, stabil narancssárga pigmentet képez a telepek hátsó oldalán. Kojisavat csak az *Aspergillus flavus*, és közeli rokonai termelnek. HAMSA és AYRES (1977) sztreptomomicinnel, és dikloránnal egészítette ki az ADM táptalajt. PITT és mtsai (1983), az ADM táptalajt tovább fejlesztve hozták létre, az *Aspergillus flavus* és *A. parasiticus* kimutatására alkalmas AFPA táptalajt. Ezen, 30 °C-os 42-48 órás inkubálás után már jól látható a narancssárga pigment képződés. Az *A. ochraceus* és az *A. niger* is termel sárga pigmentet, de spóráik színe alapján ezek a törzsek könnyen megkülönböztethetőek az *A. flavus* sp.-tol.

A kókuszdió agart (CFA) alkalmasnak találták az aflatoxin termelés meghatározására. Aflatoxinogén penész izolátumok ezen az agaron sárgán és kéken fluoreszkálnak (PITT, 1990).

Fusarium spp. kimutatására alkalmas szelektív táptalajok: MOLARD (1984) 8-hidroxi-kinolin szubsztráttal és klóramfenikollal kiegészített maláta agarról számol be, ami alkalmas a *Fusarium* spp. szelektív kimutatására. BULLERMAN és WEST (1990) a Nash-Snyder (NS) és a módosított Czapek-Dox (MCz) táptalajt ajánlja a *Fusarium* spp. kimutatására, és az egyéb penész törzsek szupresszállására. Az NS táptalaj hátránya,

hogy a *fusariumok* növekedése lassú, és a szelektáló komponens a karcinogén pentaklórnitrobenzol.

A kristályibolyával kiegészített dikloran klóramfenikol pepton agar (DCPACV) hatásos a *Fusarium* spp. meghatározására és visszazorítja az *Aspergillus* spp. és *Penicillium* spp. növekedését (CONNER, 1990). THRANE és mtsai (1990) fungicid szelektív ágensként iprodionnal és dichlorannal kiegészített Czapek Dox agart és burgonya dextróz agart javasol *Fusarium* spp. kimutatására. CASTELLA és mtsai (1997) *Fusarium moniliforme* kimutatására alkalmas szelektív táptalajt fejlesztett ki. A továbbfejlesztett Nash-Snyder médium 2,5 ppm malachitzöldet tartalmaz és szerintük, ezen a táptalajon, csak a *Fusarium moniliforme* törzsek növekednek.

Penicillium spp. kimutatására alkalmas szelektív táptalajok: FRISVAD (1983) arról számolt be, hogy pentaklór-nitrobenzol Rose Bengal kiegészítés az élesztőkivonat – szacharóz agarban (PRYES) lehetővé teszi az ochratoxin A, és a citrinin termelő *Penicillium viridicatum* szelektív kimutatását, tipikus barnás lila telep hátsó szín képződésével. A *Penicillium viridicatum* I csoport, és a *P. aurantiogriseum* (xantomegnin, és viomellein termelők) színe ezen a táptalajon sárga.

Egyéb szelektív táptalajok: Dikloran klóramfenikol maláta agar (DCMA), jó differenciáló táptalaj az *Alternaria alternata* kimutatására. Az elválasztás alapja, a telep morfológia és a konídiospórák mérete ill. alakja volt (GOURAMA és BULLERMAN, 1995).

Hidrofób rács-membrán technika (HGMF)

A HGMF eredetileg baktériumok kimutatására kifejlesztett módszer. A rendszer hidrofób rácsokkal részekre osztott membrán alkalmazásán alapszik, ahol a HGMF számot a legvalószínűbb élőcsíra meghatározás (MPN) módszerével állapítják meg. A számolást automata számoló egység végzi. BRODSKY és mtsai (1982) a HGMF technika segítségével egyenértékű vagy magasabb penészszámot határoztak meg 48 órás inkubálás után, mint a hagyományos agar táptalajos tenyésztéssel.

Spirál-lemez módszer

ZIPKES és mtsai (1981) alkalmazták a spirál lemez módszert penész és élesztő számok meghatározására, és úgy találták, hogy ezzel a módszerrel sokkal nagyobb arányban kimutathatóak a sérült, károsodott sejtek is, mint a hagyományos agar táptalajos vizsgálattal. Eredményeik szerint a penésztelepek eloszlása is sokkal egyenletesebb, mint más módszerek esetében, ezért a vizuális vizsgálat és a telepek izolálása is sokkal egyszerűbb.

Petrifilm módszer

Az élesztő- és penészszám meghatározására alkalmas Petrifilm (PYM; 3M Company, Medical Products Division, St. Paul, Minn. USA), a számlálást elősegítő 1 x 1 cm-es rácsozott filmre felvitt, a tápanyagok mellett antibiotikummal, a vizualizációt elősegítő festékkel, valamint hideg vízben oldódó gélesítő komponenssel kiegészített száraz táptalaj. A beoltás 1 ml folyékony élelmiszerrel, vagy szilárd élelmiszer hígítási sorának tagjaival történik. A minta a felületen szétterjedve a gélképző komponenst nedvesíti. 5 napos, 20-25 °C-os inkubálás után, a penész- és élesztőtelepek számlálhatók. Az élesztő és penésztelepek növekedési karakterisztikájuk alapján különböztethetők meg. KNIGHT és mtsai (1997) a Petrifilm módszert hasonlította össze a hagyományos agar médiumos tenyésztéssel ketchup, joghurt, narancslé és kukoricaliszt esetében. A két módszer eredményei között szignifikáns eltérést nem találtak. Ugyanerre az eredményre jutott SPANGENBERG és INGHAM (2000) a hagyományos agar talajos tenyésztés, a hidrofób rács-membrán, és a Petrifilm módszerek által kapott élesztő és penészszámok összehasonlításakor, Mozzarella sajt esetében.

A penészgomba TKE, azaz az életképes propagulumszám nem ad reális információt a növekedésre, és főleg a mikotoxinképzés kockázatára. Elvileg nagymennyiségű micéliumtöredék jelenléte utalhat jelentős gomba-anyagcserére, míg a magas konídiumszám kevésbé lehet veszélyes. Alacsony penészszámok (10^2 - 10^3 propagulum/g) ugyanakkor nem jelentik azt, hogy a termék biztonságos, mert előfordulhat, hogy a jelentős toxintartalom, már elhalt, tenyésztéssel ki nem mutatható micéliumtömeg hajdani terméke. A toxinképzés speciális, nehezen definiálható körülménye i-

re nézve, KARUNARATNE és BULLERMANN (1990) vizsgálataiban például, több aflatoxin keletkezett 10^3 spóra/g-mal történő beoltás esetén, mint 10^6 spóra/g esetén. Habár az aktívan penészesedő élelmiszerek TKE számát nehéz értékelni, ezek az értékek mégis támpontot adnak a száraz és feldolgozott élelmiszerek minőségét illetően (JARVIS és WILLIAMS, 1987).

Abraktakarmányok és szénák penészfertőzöttségének vizsgálatában, mint a mikotoxikológiai kockázat értékelésében a jelenleg világszerte autentikusnak elfogadott tenyésztési módszerek komoly fogyatékosága az, hogy az elhalt gradációk (reliktumok) rejtve maradnak.

2.4.3. A metabolitok kimutatásán alapuló módszerek

A metabolitok kimutatásán alapuló módszerekkel, a penészek által képzett anyagcsere-termékeket lehet detektálni valamilyen kémiai úton. Ilyen módszer az ergoszterin-, vagy az ATP tartalom meghatározás.

Ergoszterin meghatározás

Az ergoszterintartalom mérése alkalmas az élelmiszerek illetve élelmiszer-nyersanyagok gombás fertőzöttségének megállapítására. Az ergoszterin – számos *Phycomyces* és üszöggomba kivételével – a gombák által termelt legfontosabb szteroid, amely a növényekben előforduló szteroidok között csak mikrokomponens (WEETE, 1980).

SEITZ és mtsai (1977) felületen fertőtlenített penészes cirok, búza és kukorica magvak penésztartalmát vizsgálták ergoszterintartalom meghatározással és tenyésztéssel. Összehasonlító vizsgálataik eredménye szerint ez a módszer jól alkalmazható a gabonaszemekben jelenlévő élő és holt penészgombák kimutatására.

A módszer előnye az agartalajos tenyésztéssel szemben, hogy nemcsak az életképes penészgomba propagulumok mutathatók ki, hanem, az egész gomba-biomassza mennyi-

sége mérhető, és 2-3 óra alatt végrehajtható. Hátránya viszont, hogy a penészfajok identifikálása nem lehetséges.

ATP tartalom meghatározás

ATP-t minden élő rendszer termel, és kimutatása viszonylag egyszerűen kivitelezhető. A többiek által pontosan leírt technika jó becslést ad a metabolikus aktivitásra (PATEL és WILLIAMS, 1985; STANNARD 1987).

Az ATP meghatározási módszer azonban mégsem terjedt el széles körben az élelmiszerek és takarmányok penésztartalmának becslésére. Ennek fő oka, hogy a penészgomba eredetű ATP nem választható el megbízhatóan más ATP-tól.

A penészgombák anyagcseréjében résztvevő, valamint a termelt enzimek, és metabolitok kimutatásán alapuló módszerek

Ezek a módszerek a „penész-enzimek”, illetve a metabolizmus során keletkező metabolitok mennyiségének kimutatása alapján becslik a penészszámot.

OFFEM és DART (1983) gázkromatográfiával mérték a metanol azon mennyiséget, ami a gomba által termelt pektinészteráz hatására, pektinből szabadult fel.

MAGAN (1993) *Alternaria alternata*, *Eurotium amstelodami* és *Penicillium aurantiogriseum* törzsekkel beoltott gabonák penészesedési folyamatát kísérte figyelemmel, 0,95 vízállóságon. A mintákban a száraz, nem penészes gabonákhoz viszonyítva jelentős ergoszterintartalom, α -D-galaktozidáz és β -D-glükózidáz aktivitás növekedést figyeltek meg.

KESHRI és MAGAN (2000) toxint képző és nem képző *Fusarium moniliforme* és *F. proliferatum* törzsek illóanyag és hidrolitikus enzim termelését vizsgálta. Mindkét módszer alkalmasnak bizonyult a mikotoxinogén törzsek egymástól való megkülönböztetésére. Az illóanyag komponensek vizsgálata 48 óra után megbízható és jól reprodukálható.

tó eredményt adott. A hét vizsgált enzim közül három (β -D-glükózidáz, α -D-galaktozidáz és N-acetil- β -D-glükózaminidáz) aktivitása 72 óra után szignifikánsan nagyobb volt mindkét fajban a nem toxinogén, mint a toxinogén törzsek esetében. A többi vizsgált enzim (β -D-fruktozidáz, α -D-mannozidáz, β -D-xilozidáz és N-acetil- α -D-glükózaminidáz) aktivitásában nem találtak szignifikáns különbséget a toxinogén és nem toxinogén törzsek között.

MAYER (2002) kifejlesztett egy tenyésztési technikát, amelyben a korai micéliumnövekedés jelezhető az invertáz (β -D-fruktofurazonidáz) aktivitás, a redukáló cukor táplevesben történő felhalmozódása alapján. Vizsgálataiban a gabonák és abrak-takarmányok terméktipikus penészflórájában, az *Aspergillus flavus* csoport tagjainak, ezen felül, az *Aspergillus niger* és az *Aspergillus japonicus* invertáz aktivitását találta jellemzőnek. Egyes *Aspergillus* fajok nagyon gyors növekedést és intenzív – a folyékony táptalajban 20 óra inkubálás után felhalmozódott redukáló cukor mennyiségében mérhető – invertáz termelést mutattak. Ezen eredményen alapuló *Aspergillus*-invertáz teszt tehát alkalmas elsősorban erosen szennyezett élelmiszer, illetve takarmány-gabona magvak *Aspergillus flavus* csoport tagjaival és *Aspergillus fumigatus*-szal való fertőzőségének megállapítására.

Az invertáz-teszt, az agarlemezen történő tenyésztéssel szemben, lényegesen gyorsabb lehetőséget nyújt a takarmányalapanyagok (gabonák) raktári penészekkel történő fertőzőségének kiszűrésére. Szerencsés körülmény, hogy az *Aspergillus flavus* csoport tagjait, ezen kívül az *Aspergillus fumigatus*-t toxinogén ill. patogén gombákként tartjuk nyilván, és a szubmerz tenyésztés körülményei között éppen ezek invertáz termelése kiemelkedő.

2.4.4. Molekuláris biológiai módszerek

2.4.4.1. A PCR-módszer

A Polymerase Chain Reaction (Polimeráz lánreakció): *Kary Mullis* (Nobel-díj 1993) által kidolgozott felmérhetetlen jelentőségű laboratóriumi módszer, ami lehetővé teszi bármilyen eredetű DNS tetszőleges szakaszának (ez többnyire néhány száz-tól néhány ezer nukleotid hosszúságú lehet) gyors és olcsó, *in vitro* (kémcsoban, laboratóriumi körülmények közötti) felszaporítását az eredeti mennyiség sokezerszeresére. Az alkalmazás előfeltétele, hogy a kérdéses szakasz két végén 10-20 nukleotid sorrendje ismert legyen. A technika lényegében a természetes replikációt végző DNS-polimeráz enzim működésén alapul. A PCR alapú kimutatás alapfeltétele a megfelelő primerek kiválasztása.

A kutatás a penészgombák metabolizmusára, jelenlétük kimutatására alkalmas PCR módszert fejlesztett ki. Az AllFun Taq valamennyi penészgomba genomában jelenlévő konzervatív régióban kötődik, és ezért az összes penészgomba kimutatására alkalmas primer (MAYER, 2002).

A gombákban előforduló 18S rDNS igen konzervatív nukleotid szekvenciákat kódol, ezért alkalmas a mintában lévő összes penészgomba kimutatására használható PCR reakció templátjaként (DAMS és mtsai, 1988). A 18S rDNS szekvenciájában kötődik "AllFunTaq-forward", "AllFunTaq-reverse" TaqMan-PCR primerek, és az "AllFunTaq-Probe" specifikusan kötődő próba segítségével végzett Real Time PCR próba az összes penészgomba kvantitatív kimutatására alkalmas módszer. A primerek és a próba fejlesztését, együttműködő partnerünk (*Mayer Zsuzsa*, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, BFEL, Karlsruhe) a „Primer-Express 1.0” szoftver segítségével végezte (PE Applied Biosystems, Foster City, California).

MAYER (2002) vizsgálatai szerint az AllFunTaq primerrel minden, a *Moniliaceae* család élelmiszeren és takarmányon előforduló genusz (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Byssoschlamis*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Alternaria* és *Cladosporium*) képzett PCR terméket. Penészgomba DNS-en kívül petrezselyem, alma,

burgonya, humán és *E. coli* DNS-t is vizsgáltak az AllFun Taq RT-PCR reakcióban, és PCR termék egyik esetben sem képződött. Eredményeik szerint tehát az AllFun Taq primer alkalmas valamennyi a PCR reakcióban részt vevő penészgomba specifikus kimutatására.

Ez a módszer gyorsasága miatt jelenthet elonyt a hagyományos módszerekkel szemben, hiszen itt a tenyésztési technika többnapos inkubációs ideje kiesik.

Használata a szénák penészfertőzöttségének megállapítására azzal a további elonnyel járna, hogy nemcsak az élő penészekre és a spórákra, hanem a szénák esetében gyakori betakarítás utáni penészgradáció elhalt reliktumaira nézve is jelző értékű, amelyet a tenyésztési módszer, a TKE figyelmen kívül hagy.

A PCR technika rohamos terjedésének és a használatos reagensek és kitek árcsökkenésének köszönhetően a Real Time PCR reakció segítségével történő penészgomba kimutató gyakorlatközelbe kerülhet.

Kísérleteink elvégzésének idejében az eljárást szénákra nézve más még nem alkalmazta.

SAJÁT VIZSGÁLATOK

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Szénák terméktipikus csíraszámának megállapítása

Reprezentatív minták begyűjtése

Szénák penészferozottságának (penészsám, TKE) meghatározását 76 db (41 db lucerna és 35 db fu) Hajdú-Bihar és Pest megye eltérol adottságú területeiről gyűjtött reprezentatív szénamintán végeztük el. A mintavételek során semmiféle minoségi preferenciát nem érvényesítettünk, felhasználói panaszra vagy kifogásra nem voltunk tekintettel azért, hogy a minták gyakorlati átlagként legyenek elfogadhatók. Ezekben a vizsgálatokban, mintavételi helyként mindig a tétel legnagyobb mennyiségét jellemző részét jelöltük ki. A bálák belsejéből, mintegy 10 cm vastag külső szénaréteg lefejtése után, kb. 1 kg tételt gyűjtöttünk fóliazsákokba. A bálák kiválasztása véletlenszerű volt, mind pajta alól, mind szabadban tárolt tételeknél. Feljegyeztük a sorszámot, a mintázás időpontját a bála elhelyezkedését, illetve kitettségét az időjárási viszonyoknak, továbbá ha ismert volt, a múltját (“egyszer megázott”, “renden megázott”, stb.). A zsákokat a mintázás napján a laboratóriumba szállítottuk, majd azonnal feldolgoztuk.

Érzékszervi vizsgálat

A mintákat, eloször érzékszervi bírálatnak vetettük alá. Megállapítottuk a minták jellemző botanikai összetételét, színét, szagát, porosságát és penészesedésre utaló nyomok előfordulását.

Mikológiai vizsgálat

Az alapsuszpenziót, manuálisan aprított (3 mm-es átlagos szecskaméretű) minta 10 grammjának, 90 ml vízzel történő 20 perces rázatásával készítettük. A decimális hígítási sort lemezöntéses technikával az MSz SO 7954 horizontális vizsgálati szabványban előírt táptalajra vittük. A minta 10^{-3} , 10^{-4} és 10^{-5} hígításából 1,0-1,0 ml-t Petri-csészébe adagoltunk, majd 15 ml MSz SO 7954 táptalajjal (5,0 g élesztőkivonat, 20,0 g glükóz,

0,01 g kloramfenikol, 12-15 g agar / 1000 ml deszt. víz, pH 6,6-ra beállítva) terítettük. A csészéket 25°C hőmérsékletű termosztátba helyeztük. Az inkubálás 5. napján a TKE-eket azokon a hígításokon számoltuk meg, amelyeken a telepek száma 100 és 200 közé esett. A mikrobiológiai gyakorlatnak megfelelően, az adatok értékelésében, és azok szemléltetésében, a mintatömegre visszaszámított TKE érték decimális logaritmusait használtuk.

3.2. A szénák terméktipikus flóraelemeinek és a toxinogén penészek elofordulásának vizsgálata

A szénaminták TKE kiértékelése után további 1-5 napos inkubálás során a toxinogén *Aspergillus*, *Penicillium* és *Fusarium* fajok telepeit vizsgáltuk. A konídiumképletek megjelenése után e fajok telepeit mikroszkópos azonosítással lemezenként értékeltük. A toxinogén fajok elofordulását a szénák érzékszervi és TKE szám eredményeivel vetettük össze.

3.3. A penészek tömeges felszaporodásáért felelős fizikai tényezők vizsgálata szénákon

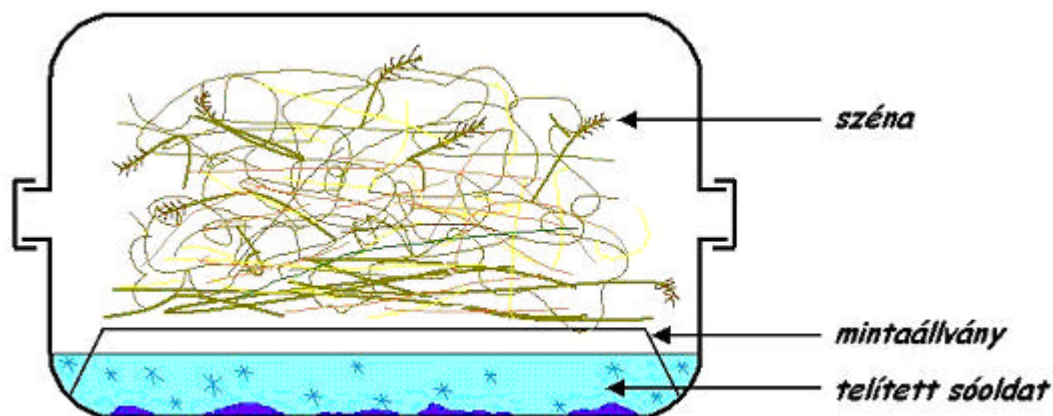
A terméktipikus penészflóra szaporodáskinetikáját különböző víztartalmú fumintákon (17,65, 37,5, 52,64 %) különböző relatív páratartalmakon (75, 84, 95, 100%) és hőmérsékleteken (15, 25°C) konstans vízaktivitású pára kamrákban vizsgáltuk.

A konstans páratartalom kialakítása

Az általunk használt konstans páratartalmat (ERP, %-ban kifejezve) biztosító pára kamrák azon alapulnak, hogy a szervesetlen kristályok telített sóoldatai, zárt rendszerben, az oldat fölötti térben szigorúan állandó, és az egyes sókra jellemző, relatív ERP-t biztosítanak. Az ebbe a térbe behelyezett takarmányminta így állandó páratartalomra tartható, és ezen keresztül, vízaktivitása a kiválasztott értékre beállítható. Pára kamraként mikro hullámú fozásra gyártott műanyag fedeles dobozt használtunk, amelynek fenekén a telített oldat, állványán pedig a minta foglal helyet. A kamrákat, a légcserét megakadályozá-

sára, muanyag ragasztószalaggal zártuk le (1. ábra, 1. fénykép). Ezek a kamrák könnyen elhelyezhetők a különböző hőmérsékletet biztosító inkubátorokban (2. fénykép). A penészgombák életfeltételeinek kielégítéséhez és szaporodásához, legalább 0,7 $a_{(w)}$ -ra van szükség. Ezért az erre a célra alkalmas (VAS és CSONTOS, 1956) szervesetlen kristályok közül hármat választottunk ki: NaCl – $a_{(w)}$ =0,75, amely fölött 75%, KCl – $a_{(w)}$ =0,84, amely fölött 84% és KH_2PO_4 – $a_{(w)}$ =0,95, amely fölött 95% RH értékű páratartalmat biztosíthatunk.

A beállított pára kamrákba, azonos mennyiségű, különböző mértékben elofonnyadt, 17,65%, 37,5%, 52,64% nedvességtartalmú, kaszált fűmintákat (*Lolium* 80%, *Festuca* 10%, *Bromus* 10% keveréke) helyeztünk el és 15 és 25°C-on inkubáltuk.



1. ábra. Páramutra szerkezeti rajza



1. fénykép. Fuminta a lezárt pára kamrában



2. fénykép. Párakamrák az inkubátorban

Mikológiai vizsgálat

A penésznövekedést, a TKE szám meghatározásával, a 0., 4., 8. és 14. napon állapítottuk meg MSz ISO 7954 szabvány szerinti lemezöntéses módszerrel.

3.4. A szénák, és a kukoricamag terméktipikus penészflórájának, valamint az *Aspergillus parasiticus*-nak az érzékenysége, az erjedési savak (laktát, acetát) jelenlétére

Mintaelőkészítés

a) Szénából, a terméktipikus penészflóra vizsgálatára, országos felmérés keretében végzett vizsgálatsorozatban, átlagos minőségű, dominánsan *Lolium perenne*-t tartalmazó mintákból készítettünk alapszuszenziót, a 3.1. pontban leírt mikológiai vizsgálati módszer szerint.

b) kukorica (mag) vizsgálatára, 2002-es termésű, egészséges tételek vegyes orleményéből készítettünk alapszuszenziót;

c) modell-organizmusként, laboratóriumunk törzsgyűjteményében fenntartott, a Magyar Nemzeti Mikrobiológiai Torzsgyűjtemény által hitelesített (1999), *Aspergillus parasiticus* friss tenyészetéből, 10^9 /ml koncentrációjú konídium-szuszpenziót készítettünk.

Standard táptalaj (kontroll) készítése

Standard talaj: MSz SO 7954 szerinti összetétel (20,0 g glukóz, 5,0 g élesztőkivonat, 0,01 g klóramfenikol, 12-15 g agar / 1000 ml deszt. víz); pH 6,6.

Kísérleti táptalaj-variánsok készítése

1. Laktát hatásának vizsgálatára: a fenti talajhoz 1,0 vagy 2,0 % (töm/térf. %) mennyiségben semlegesített Na-laktátot adtunk.
2. Tejsavas erjedés közegének vizsgálatára: 80 °C-on, 20 percig előlt, *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*) 10^9 /ml nagyságrendű szubmerz tenyészetéből, az MSz ISO 7954-nek megfelelő táptalajösszetételt állítottuk elő, az előlt *Lactobacillusok* és metabolitjaik feltételezett inhibitor hatásának vizsgálatára.
3. Az acetát hatásának vizsgálatára: az alaptalajba 2 % laktáttal ekvimoláris 1,5 % koncentrációjú semlegesített acetátot adtunk.
4. pH hatásának vizsgálatára: 1 % laktátnak megfelelő tejsavat, az alaptalajban, NaOH-val pH 6,5; 5,5 és 4,5-re állítottuk be.

Kísérleti tenyészközegek:

Az MSz ISO 7954 talajösszetételt alapul véve (a továbbiakban a komponensekre utalva: glu-ye-chlo stb. formában rövidítve), a növekedést a 4. táblázatban bemutatott kísérleti táptalajokon vizsgáltuk.

4. táblázat. A kísérleti táptalajok összetétele

tenyészközeg sorszáma	MSz ISO 7954 komponensek	kezelés
1.	glu-ye-chlo	kontroll, pH 6,5
2.	glu-ye-chlo	+ 1,0 tömeg/térfogat % Na-laktát
3.	glu-ye-chlo	+ 2,0 tömeg/térfogat % Na-laktát
4.	0-ye-chlo	szénforrás nélkül
5.	0-ye-chlo	+ 2,0 % Na-laktát, mint szénforrás
6.	glu-ye-chlo	penésztalaj előlt szubmerz <i>Lactobacillus</i> tenyészetten
7.	glu-ye-chlo	+ 1,5% acetát
8.	glu-ye-chlo	+ 2% Na- laktát + 1,5% acetát
9.	0-ye-chlo	+ 1,5% acetát
10.	glu-ye-chlo	+ 1% Na-laktát pH 5,5
11.	glu-ye-chlo	+ 1% Na-laktát pH 4,5
12.	0-ye-chlo	+ 1% Na-laktát pH 4,5

Inokuláció, inkubálás

A kísérleti és kontroll talajokkal, valamint az inokulumokkal, 10 cm átméروju Petri-csészékbe, Koch-szerint, lemezöntést végeztünk, majd azokat 25 °C-on, vízköpenyes, bakteriológiai termosztátban inkubáltuk.

A mikrobanövekedés gátlásának elbírálása és mérése

Valamennyi kísérleti talaj esetében a tenyészetekben, a telepek elbírálása alapján meghatároztuk

- a numerikus gátlást, a TKE százalékos arányát a kontrollhoz képest;
- a miceliális növekedés ütemét, a telepek átlagos átmérojét a kontroll százalékában kifejezve az inokuláció során, azonos idopontban;
- a konídium képződés megindulását, az inkubálási napokban, és ezen felül, a jellegzetes telepképleteket.

3.5. Kísérletek a szénák mikológiai vizsgálatára alkalmas táptalajreceptúra összeállítására

Tömegetakarmányok penészfertozottságére jellemzo a *Mucor* faj gyakori jelenléte. A fajra jellemzo a táptalajt hamar befutó, gyors növekedés és az eroteljes légmicéliumképzés, ezért a kiértékelést nehézkessé, gyakran lehetetlenné teszi. A cél, egy olyan táptalajreceptúra összeállítása, ami visszaszorítja a *Mucor* növekedését a többi flóraelem gátlása nélkül. Kiinduló táptalajként, a gabonák mikológiai vizsgálatára alkalmas MSz ISO 7954 szabványtalajt használtuk.

Vizsgálatainkban, származási helyre és minoségre nézve, vegyes fu- és lucernaszéna mintákat dolgoztunk fel. A széna mintákat 0,5-1 cm-es darabokra vágtuk, majd az alapszuspenzió készítéséhez 10,0 grammot mértünk be.

Alapszuspenzió és hígítási sor készítése

A bemért mennyiségeket, 90 ml steril desztillált vízzel, 20 percig rázógéppel ráztattuk. Ebbol az alapszuspenzióból, 200 x 16 mm kémcsövekben, decimális hígítási sort készítettünk. A hígítási sor tagjaiból (általában a 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} hígításokból) lemezöntést végeztünk a kísérleti táptalajokkal.

Táptalajok összetétele

MSz ISO 7954: Horizontális módszer a penész és élesztőszám meghatározására.

Összetétele: 20,0 g glukóz, 5,0 g élesztőkivonat, 0,1 g kloramfenikol, 12-15 g agar, 1000 ml talajban.

DRBC Általánosan használt receptúra, King és mtsai (1979) szerint.

Összetétele: 10,0 g glukóz, 5 g pepton, 1,0 g KH_2PH_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12-15 g agar, 25,0 mg Rose Bengal, 2 mg dichloran, 1000 ml talajban

MSz ISO 7954 + DC: A szabványtalaj kiegészítése a DRBC talajban alkalmazott mennyiségu dichlorannal (2,6-Dichlor-4-nitroanilin) feltételezve annak gátló hatását az expanszív fajokra.

Összetétele: 20,0 g glukóz, 5,0 g élesztőkivonat, 0,1 g kloramfenikol, 12-15 g agar, 2,0 mg dichloran, 1000 ml talajban

1/4 N MSz ISO 7954: A szabványtalaj tápanyagszintjeinek csökkentése egynegyedére, abból a feltételezésből kiindulva, hogy ez az expanszív fajok miceliális növekedését viszonylag jobban hátráltatja, mint a lassúbb fejlődésű fajokét.

Az ISO 7954 összetétel előirt tápanyagkoncentrációinak egynegyede: 5,0 g glukóz, 1,25 g élesztőkivonat, viszont a teljes mennyiségu, 0,1 g kloramfenikol, 12-15 g agar, 1000 ml talajban.

1/4 N DRBC: A DRBC receptúra tápanyagkomponenseinek csökkentése egynegyedére az inhibitorok megtartása mellett.

Összetétele: 2,5 g glukóz, 1,25 g pepton, 1,0 g KH_2PH_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12-15 g agar, 25,0 mg Rose Bengal, 2,0 mg dichloran, 1000 ml talajban.

1/4 N DC: Itt a tápanyagkoncentráció a King-féle DRBC összetétel egynegyede, viszont inhibitoroként csak dichlorant tartalmaz.

Összetétele: 2,5 g glukóz, 1,25 g pepton, 1,0 g KH_2PH_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15-20 g agar, 2 mg dichloran, 1000 ml talajban

DRBC + DSA: Az aromás dinitroszármazékok (dinitro-orto-krezol, DNOC növényvédőszer) fungicid hatásának analógiájára ebben a kísérleti talajváltozatban a DRBC összetételben a dichloránt semlegesre pufferált, a DNOC-nál polárosabb dinitro-szalicilsavval (DSA) egészítettük ki.

Összetétele: 10,0 g glukóz, 5,0 g pepton, 1,0 g KH_2PH_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15-20 g agar, 25,0 g Rose Bengal, 2,0 mg dichloran, 10 mmól DSA, 1000 ml talajban

Törzsoldatok:

- Rose Bengal törzsoldat: 5,0 % -os vizes oldat. (0,5 ml 1000 ml talajban)
- dichloran törzsoldat (2,6-Dichlor-4-nitroanilin (Merck)): 0,2 %-os etanolos oldat (1,0 ml / 1000 ml talaj)

Lemezöntés

A hígítási sor tagjaiból, 1,0-1,0 ml-t, a Petri-csészékbe (100 mm átméruju) pipettáztunk. Ezután a megolvasztott, majd 43-45 °C ra lefutott táptalajból, 15,0-15,0 ml-t öntöttünk rá és a laminár-box lapján körkörös csúsztató mozgással elkevertük. Kidermedés után a csészéket 25 °C-os inkubátorba helyeztük.

TKE leolvasása

A *Mucor* növekedésének megjelenését, 24 óra eltelte után, naponta ellenoriztük. A különböző talajverziókon 4-5 napos tenyésztési ido után számoltuk meg a lemezeken kifejlodött összes penésztelepet, és morfológiai bírálatot végeztünk.

Morfológiai tájékozódás

A telepek színe, felülete és a konídiumképletek alakja (mikroszkóp) szerint.

3.6. Kísérletek szelektív propagulum-festési technika kidolgozására

Kísérleteinkben a szénák alapszuspenzióinak mikroszkópos vizsgálatára olyan színezéket kerestünk, amely

- a hífát és a spórákat egyaránt erosen festi,
- a növényi rostokhoz, szorökhöz, mikroszkópikus állati szervezeteket és képletekhez gyengébben kötődik,
- nagyon jó vízdoldhatóságú, ami vizes kimosással lehetővé teszi a lebegek festék-kötődés szerinti differenciálását,

A kialakított technika szerint, az alapszuspenziót agar-mátrixba visszük, festék oldattal hokezeljük majd tárgylemezre visszük. Az agar-mátrix kidermedése után vizes áztatással differenciálunk. Feltételezésünk az volt, hogy a propagulumok a festéket mosás után is megtartják, míg a többi képletből a festék, jó vízdoldhatósága miatt, kimosódik.

A kiülepedés meggátlására és a lebegek részecskék rögzítésére, a tárgylemezen, az alapszuspenzió agarvizes hígítását alkalmaztuk. Ebben, a tárgylemezre történő kezelés és kidermedés után végrehajtható a szelektív festés, a penész eredetű elemek azonosítására, a konídiumok és a micélium differenciálfestése. Először Rose Bengal-t (RB) alkalmaztunk, annak alapján, hogy korábbi kísérletekben a vitális penészképletek a Rose Bengal-t szelektíven kötötték meg. A Rose Bengalra azért esett a választás, mert előkísérletben azt találtuk, hogy a szubmerz micéliumtömeg az RB-t irreverzibilisen köti, miközben az RB híg vizes oldata hokezelés során halványul, ugyanakkor növényi képletekhez gyengébben kötődik, a színezék vízzel kimosható.

(A jelenség egyébként a DRBC talajjal való munka során is észlelhető. A telepkezdemények még jóval a konídiumképződés előtt piros foltokként vehetők észre a lemez hátoldalán. Ez a szín jóval intenzívebb a környező agar transzparens rózsaszín árnyalatánál. A kísérletsorozatban kipróbáltunk más, bizonyos szelektivitású színezékeket is, amelyek azonban ilyen szelektivitással nem kötődtek.)

Az alapszuspenzió elkészítése

12 x 120 mm-es kémcsoban, 1,0 ml 15 %-os agaros vízbe, 1,0 ml széna, gabona vagy csak hífát tartalmazó szuszpenziót adagoltunk.

Festés

Kísérleti festékoldatok:

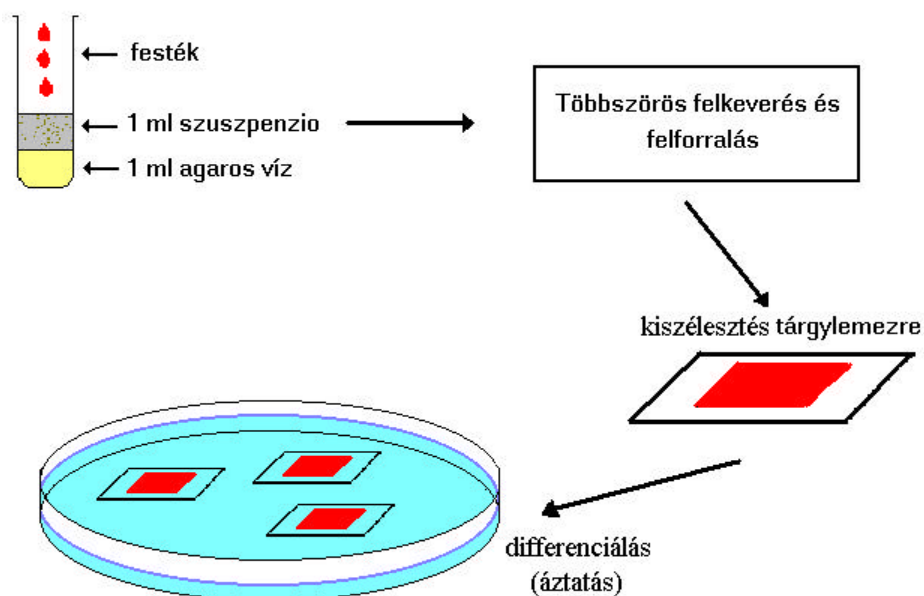
Rose Bengal (RB) 5 %-os törzsoldatból 3 csepp (cca. 70 μ l), ($C_{20}H_{2}O_5I_4Cl_4Na_2$, CI: 45440)

Malachitzöld telített vizes oldatból 3 csepp (cca. 70 μ l), ($C_{23}H_{25}N_2Cl$, CI: 42000)

Amido black (AB) (3,4-re pufferált, 0,6%) oldatból 6 csepp (cca. 140 μ l), ($C_{22}H_{14}N_8Na_2O_9S_2$, CI: 20470)

Sudan III, ($C_{22}H_{16}N_4O$, CI: 26100)

A kémcsövek tartalmát Vortex-szel többszörösen felkevertük, borszeszégőn 3-szor felforraltuk, majd még forró állapotban tárgylemezre kiszélesztettük mintegy 0,5 mm vastagságban. Dermedés után a tárgylemezeken lévő agarréteget vízszintes helyzetben deszt. vizes fürdőben 5, 30 és 60 percig differenciáltuk. Sudan III festés esetében, víz helyett etilénlikolban áztattunk 10 percig, majd vízzel öblítettünk. (2. ábra)



2. ábra. Tárgylemezek festésének folyamatábrája

Elbírálás, vizsgálat

Fénymikroszkóppal, áteso fényben, 250x nagyítással, a

- friss rétegben, vagy
- száradás után (ebben az esetben a beszáradt agarréteg még nem torzít jelentősen).

3.7. Kísérletek az invertáz-teszt alkalmazhatóságára néhány, a szénákon előforduló jellemző genus esetében

Az invertáz-teszt alkalmazása felmerülhet szénák penészfertőzöttségének gyors jelzésére is. Gabonafélék terméktipikus és raktári penészeivel ellentétben, a szénák terméktipikus flórájában a *Mucor* és a *Trichoderma* kivételével lassan növekedő fajok vannak, amelyek agarlemez tenyésztése, a gabonák esetében szükséges inkubációs időnél lényegesen hosszabb ideig tart. Kísérleteinkben a szénák penészflórájának leggyakrabban előforduló tagjainak invertáz termelő képességét vizsgáltuk annak megállapítására, hogy ezek invertáz termelése eléggé jellemző-e ahhoz, hogy az invertáz teszt, mint elovizsgálat alapján az általános penészfertőzöttség mértékére következtethessünk.

A vizsgált penészgomba fajok

A szénákról általunk izolált és meghatározott fajok: *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium poe*, *Fusarium sporotrichoides* (csak telep morfológia alapján), *Mucor piriformis*, *Nigrospora spp.*, *Trichoderma viridae* és *Trichotecium roseum*.

Az Aspergillus-invertáz teszt

Az alkalmazott vizsgálati módszert MÁTRAI és mtsai (2000) dolgozták ki.

Elve: szacharóz bázisú folyékony táptalajban micéliumot tenyésztünk, majd a tápközegben, az invertáz hatására megjelenő redukáló cukor mennyiségéből következtetünk a gomba invertáztermelő képességére.

Folyékony táptalaj: 5 g élesztokivonat, 20 g szacharóz, és 1,0 g klóramfenikol, ad. 1000 ml desztillált víz (az élesztokivonatot előzőleg tesztelni kell, hogy tartalmaz-e detektálható invertáz aktivitást, és a szacharóznak is redukálócukor mentesnek kell lennie). 20 mm átméروju kémcsövekbe 2-2 ml táplevest adagoltunk, lezárva atmoszférikus gozben 60 percig sterilizáltuk, majd 37 °C– os vízfürdoben hulni hagytuk.

Alapsuszpenzió: A szubkultúra egyhetes, szacharóz - élesztokivonat (MSz SO 7954) agarra oltott penészgomba törzs volt. A konídiumokat kacs segítségével, 2 ml 1% tween 80-at tartalmazó steril fiziológiás oldatba vittük. Az inokulált spóraszámot Bürker-kamrával határoztuk meg.

Decimális hígítási sor: Az alapsuszpenzióból kiindulóan decimális hígítási sort készítettünk. A hígítási sor minden tagjából 100-100 µl-el beoltottunk 2 – 2 ml folyékony táptalajt tartalmazó kémcsövet, három párhuzamosban.

Inkubáció: A beoltott kémcsöveket döntött helyzetben, 37 °C- os inkubátorba helyeztük úgy, hogy a folyékony tápközeg levegonek kitett felülete kb. 6-7 cm hosszú legyen. Az így biztosított oxigén mennyiség elegendó a micéliás növekedéshez és később a spóráképződéshez is.

A lehasított redukáló cukrok mérése

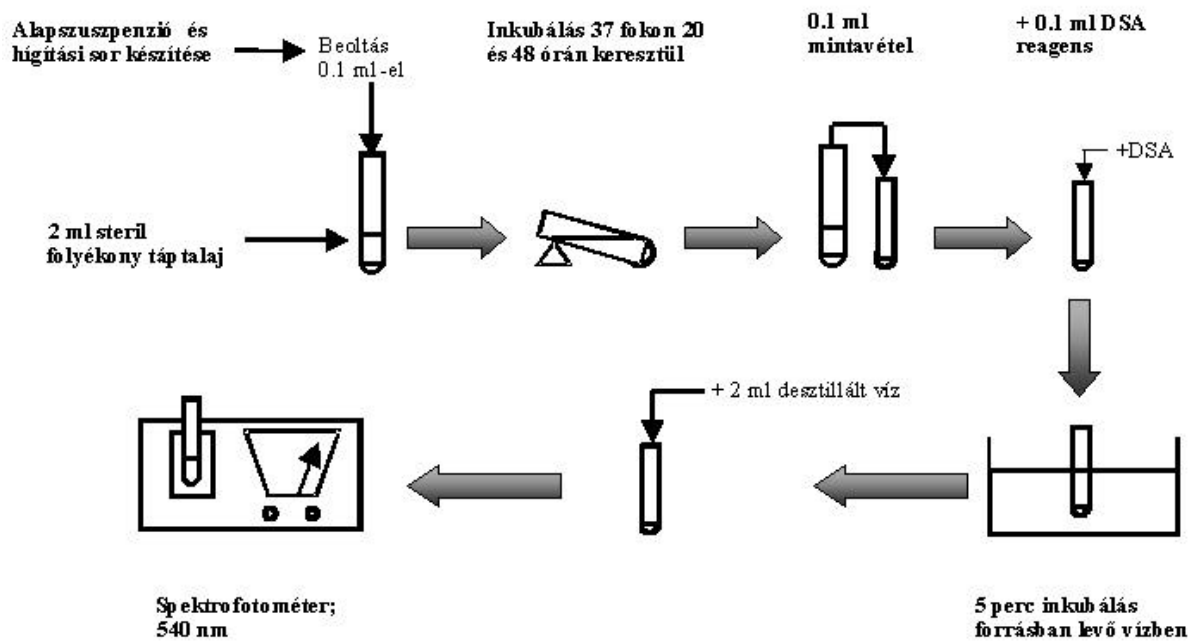
Ezt, a MÁTRAI és mtsai (2000) közleményében megadott módszer alapján, 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoesav (dinitro-szalicilsav, DSA) reagenssel végeztük.

DSA reagens: 5,0 g 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoe savat 400 ml, meleg, 2%-os vizes nátrium-hidroxid oldatban oldottunk fel. Ezután 100 g KNa- tartarátot, 1,0 g fenolt, majd 0,25 g vízmentes nátrium szulfátot oldottunk fel. Az oldatot feltöltöttük desztillált vízzel 500 ml-re. Jól lezárt sötét üvegben, hűvös helyen tárolva, több mint egy évig stabil.

Csoben 0,1 ml DSA reagenst az inkubált csövekből vett 0,1 ml folyékony táptalajhoz adtunk, és az elegyet öt percre forrásban levo vízbe helyeztük. Ezután a mintát 2,0 ml desztillált vízzel hígítottuk, és keverés után az abszorbanciát 540 nm-en mértük. A referencia (vak próba) nem inokulált, de inkubált folyékony médium volt. A pontosabb mérés érdekében glükóz standard sort készítettünk, 0,0, 10, 50, 100, 500 és 1000 µg/ml

koncentrációkkal, és kalibrációs görbét vettünk fel. Így az abszorbanciákat μg redukáló cukor/ml folyékony médium formájában fejeztük ki. $10 \mu\text{g/ml}$ feletti redukáló cukor értékeket fogadtunk el pozitív eredményként.

Az *Aspergillus*-invertáz teszt folyamatábrája a 3. ábrán látható.



3. ábra. Az *Aspergillus*-invertáz teszt folyamatábrája (MAYER, 2002)

3.8. DNS RT-PCR-rel, az ALLFun-Taq penész-specifikus primer segítségével kapott kópiaszám, és a tenyésztés (szabvány) módszerrel meghatározott TKE összefüggésének vizsgálata

Az összehasonlító vizsgálatokat 8, vegyes minőségű szénamintán (5 fu, 2 lucerna és 1 szalma) végeztük el.

Telepképző egység szám (TKE) meghatározása lemezöntéssel

A penész TKE-t, az MSz ISO 7954 horizontális módszerrel határoztuk meg

Alapszuspenzió

Az aprított (3 mm-es átlagos szecskaméretű) minta 10 grammjának 90 ml vízzel történő 20 perces rázatásával készítettük az alapszuspenziót.

Hígítási sor és lemezöntés

A decimális hígítási sort lemezöntéses technikával (MSz ISO 7954) horizontális szabvány által előírt táptalajra vittük.

Az alapszuspenzióból decimális hígítási sort készítettünk. A 10^{-3} , 10^{-4} és 10^{-5} hígításokból, az MSz ISO 7954 horizontális szabvány által előírt módon, lemezöntést végeztünk, két párhuzamosban. A kísérletben a szabvány által előírt MSz ISO 7954 táptalajt használtuk. (5,0 g élesztőkivonat, 20,0 g glükóz, 0,01 g kloramfenikol, 12-15 g agar / 1000 ml deszt. víz, pH 6,6-ra beállítva)

Inkubálás és értékelés

A csészéket 25°C hőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubálás 5. napján a TKE-eket azokon a hígításokon számoltuk meg, amelyeken 100 és 200 közötti mennyiségű telep nőtt. A mikrobiológiai gyakorlatnak megfelelően az adatok értékelésében és szemléltetésében, a minta tömeg egységére számított TKE értékének a decimális logaritmusát használtuk.

A penészgombák kimutatása RT-PCR reakcióval

A minták elokészítése a DNS kivonására

Az első kísérletsorozat szénamintáit, (a penészszám meghatározáshoz végzett feldolgozással azonos módon), mintegy 0,8 cm méretűre szecskáztuk. A minták sorszáma: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49.

A második kísérletsorozatban, a 42, 43, 45, 47 és 48 minták elokészítésekor, fokozottabb, a sejtsztruktúrákat jobban feltáró feldolgozást végeztünk, mert az első kísérletsorozat eredményei nyomán azt feltételeztük, hogy a szénaminta aprítottsága és mechanikai feltártsága elégtelen volt. A 0,8 cm méretűre szecskázott mintákat 1/1 tömegarányban, 0,1 mm és ennél kisebb szemcseméretű kvarchomokkal, Fritsch "Pulverisette" 02.102 típusú achát-malomban, 120 percig dezintegráltuk.

A 48-as számú penészes lucernaszéna minta dezintegrálása után, a nem aprózódó rostszálakat elkülönítettük, ezt 48R, a kiszitált por frakciót 48P megjelöléssel vizsgáltuk.

A 48P és 48R minták kópiaszámának összehasonlításával azt vizsgáltuk, hogy a nem aprózódó frakcióban visszamaradó DNS mennyisége mennyire jelentős a kiszitált porból izolálható DNS mennyiségéhez képest.

A szecskázott mintákat, majd a hatékonyabb DNS kivonás érdekében kvarchomokkal dezintegrált mintaörleményt, az együttműködő intézetbe, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL), Karlsruhe küldtük.

Az elokészített minták AllfunTaq kópiaszámát, a németországi együttműködő laboratóriumban vizsgálták.

A DNS kivonása és izolálása a szénamintákból

Az AllfunTaq bevizsgálása során a penész szintenyészetekből, és mesterségesen fertőzött élelmiszerekből a DNS és RNS izolálásának technikai lépéseit, valamint az AllfunTaq primer fejlesztésének technikáját a 7.2. fejezetben ismertetjük.

Az **első mintasorozatban** (42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 és 49 minta) a DNS izolálást, 0,1 g elokészített szénamintából, a “Dneasy Plant Mini Kit”-tel (Quiagen, Hilden, Germany) végezték a gyártó utasításai szerint, a sejtek mechanikus feltárását folyékony nitrogénben történő eldörzsöléssel, az együttműködő intézetben végezték. Az első mintasorozat kópiaszámainak értékelésekor felmerült a mechanikus dezintegrálás elégtelenségének kérdése.

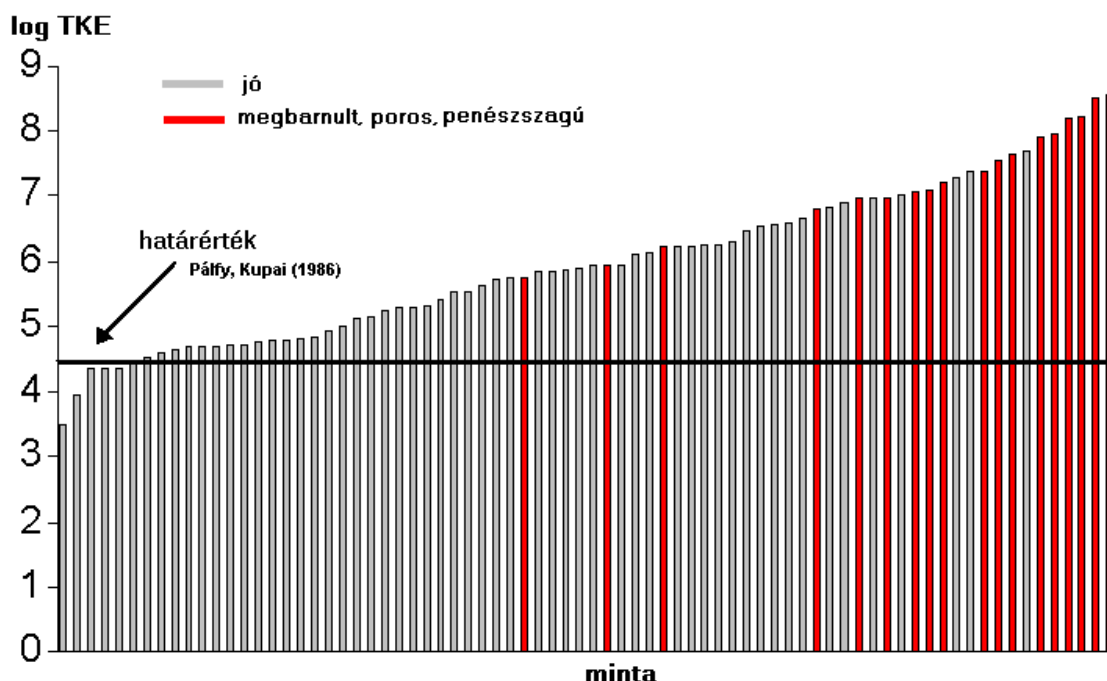
A **második mintasorozatot** (42, 43, 45, 47, 48P, 48R), kvarchomokkal, Fritsch “Pulverisette” 02.102 típusú achát-malomban, 30 percig dezintegráltuk és így finom, 100 mikrométeres szemcsefrakciót, és mellette kevés 0,1–0,3 mm-es szálal rostfrakciót, sejtfrakciót kaptunk. Ezt a 48. sz. minta esetében külön, 48R és 48P mintaszámmal, vizsgáltuk. Ezután az együttműködő intézet a folyékony nitrogénes kezelést egy félórás alumíniumoxidos rázatással is kiegészítette. Az utolsó mosási lépés után a DNS eluálását 2x100 µl eluáló pufferral hajtották végre. Az így kapott DNS oldat 1 µl-ét használták az AllfunTaq Real-Time PCR reakciókban.

4. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

4.1. A szénák terméktipikus csíraszámának megállapítása

Az MSz ISO 7954 szabvány szerint vizsgálva, a jó minőségű minták TKE/g tartalma $3 \times 10^3 - 2,7 \times 10^4$ között, míg a szenzorikusan penészesnek ítélt mintáké $3,2 \times 10^4 - 3,45 \times 10^8$ között változott. Az organoleptikus vizsgálattal megállapítható penészség min. $5,7 \times 10^5$ TKE-t, azaz a bevezetésben (2.1.) idézett Pálfy-féle határérték ($3,0 \times 10^4$) felett 1,0 log-gal magasabb TKE -t valószínűsít. (1. grafikon)

A begyűjtött 76 (100%) szénaminta közül 70 (92,1%) bizonyult a Pálfy-féle határérték felettinak és csupán 6 (7,9%) minta minősült jónak a TKE vizsgálat alapján. Ezzel szemben érzékszervi vizsgálattal 58 (76,3%) mintát találtunk jónak és csak 18 (23,7%) szénát romlottnak. (1. grafikon)



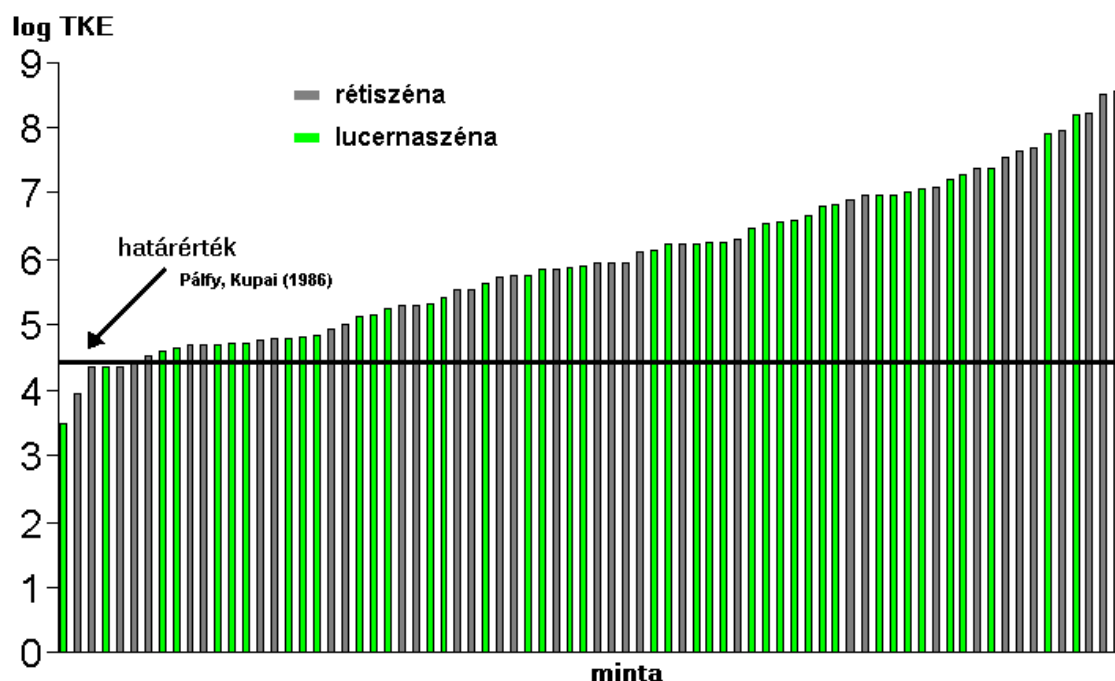
1. grafikon. A szénaminták organoleptikus és penész TKE vizsgálatával megállapított penészsége

Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy a szűrőpróbaszerűen vett minták (gyakorlati átlag) döntő többségében, a korábban ajánlott Pálfy-féle határértéken felüli penészsámszámot

mutattunk ki a mikrobiológiai vizsgálattal, annak ellenére, hogy szenzorikusan csak a minták egynegyedét jósoltuk rossznak. Ez a megfigyelés is indokolja, az organoleptikus bírálat mellett, a mikrobiológiai vizsgálat szükségességét.

Amennyiben az 1. grafikon adatait a minták botanikai összetétele szerint jelöljük (2. grafikon), akkor látható, hogy a megvizsgált 41 lucernaszéna-minta (100%) TKE/g tartalma közül 39 minta (95,1%) volt a Pálfy-féle határérték fölött. A 35 rétiszéna-minta (100%) TKE/g tartalma alapján 31 minta (88,5%) haladta meg a Pálfy-féle határértéket.

A két széna fajtában, mint szubsztrátban, nincs alapvető különbség a penészszámmal tekintetében.

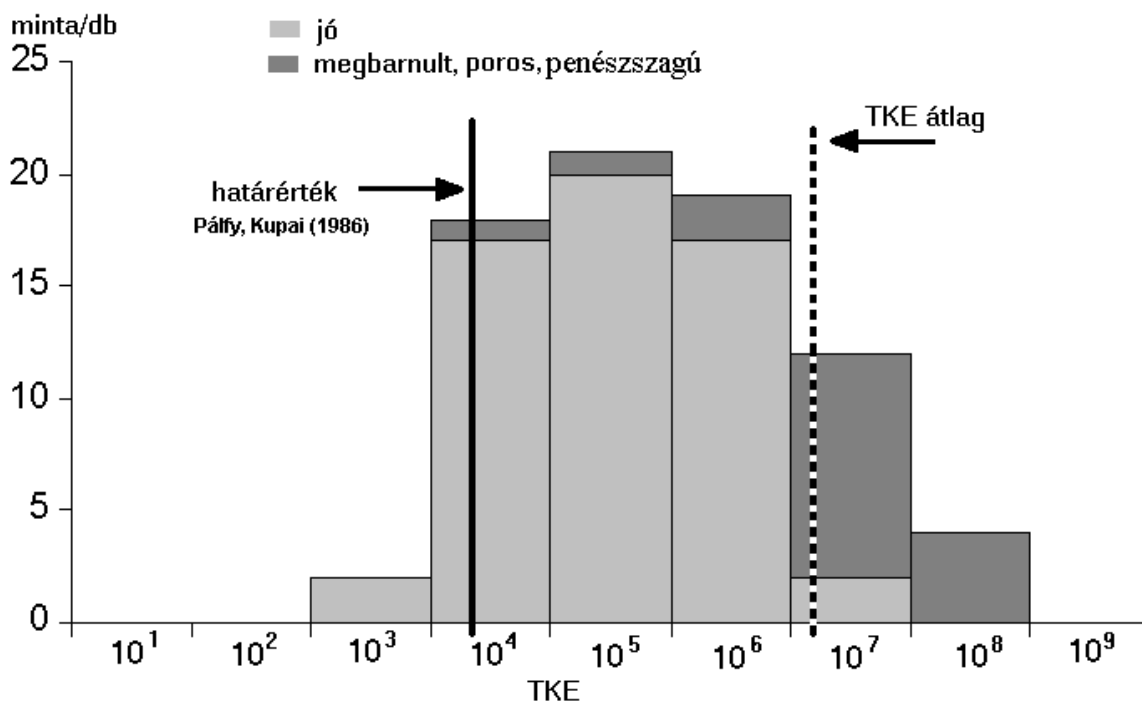


2. grafikon. A szénaminták TKE száma és botanikai összetétele

A TKE értékek gyakorisági eloszlását a 3. grafikon (hisztogram) szemlélteti.

A szénák leggyakoribb penészszáma 10^5 (27,6%), 10^6 (25%) és 10^4 (23,6%) / gramm volt. A minták 15,7%-a volt 10^7 nagyságrendű. Szélsőségesen magas, 10^8 penészsám 5,2%-ban fordult elő. A TKE számok számtani átlaga pontosan $1,987 \times 10^7$, amely érték

nem tükrözi a leggyakoribb penészszámot. Ezért ezzel a számtani átlaggal nem jellemezhetjük a szénák átlagos fertőzöttségét. A hisztogram azonban tükrözi, hogy a felmérő munkánk során begyűjtött szénák átlagosan 10^5 , azaz százezres nagyságrendű penészszámot tartalmaztak.



3. grafikon. Szénaminták penész TKE és a szenzorikus vizsgálat szerinti gyakorisági eloszlása

4.1.1. Statisztikai tényezők a szénák mikológiai minőségében

A tétel és a minőséghez vizsgált minták viszonya

Tételen belüli eloszlás

A nagy takarmánytételben a terméktípikus mikróbák a struktúrának megfelelő mértékben elszórtan fordulnak elő. Kis szemű magvak homogenitása érthetően nagyobb mint pl. szénaké.

A termohely, és később a tárolás körülményei (vízaktivitás, hőmérséklet, aerob vagy anaerob állapot) viszont alkalmat adnak nagyobb mikróbakoncentrációjú részek kialakulásának, egyes fajok nagymérvű felszaporodásának. Abraktakarmányok raktári flórájának felszaporodásának eredményeként, a tételen belül, a „gócos” eloszlás (*contagious distribution*) jellemző. Kialakulásának az oka, hogy különösen a szénhidrátok intenzív mikrobás bontása során jelentős mennyiségű víz keletkezik, és ez, a vízaktivitás emelésével, fokozottabb mikrobaszaporodásra teszi alkalmassá a mikrokörnyezetet. Dercés, illetve apróbb magokból álló tételek esetében „romlási koloncok” is kialakulhatnak melyek hasonlóak a beázás nyomán keletkező összeálláshoz. Szénák esetében raktári gócos penész-gradáció beázás esetén fordul elő, a lucernaszéna esetében főleg *Aspergillus* fajok szaporodnak fel.

Többszámú mintaelemes tételminősítés

Takarmánytétel mikrobiológiai (így mikológiai) minősítésének a fő célja az, hogy a tétel egészét a minta vagy minták TKE-jének meghatározása alapján minél hitelesebben adhassuk meg.

A vizsgálatokkal meghatározott TKE hitelességét (az egész tétel valódi, tényleges mikrobataralmához képest) az úgynevezett többszámú mintaelemes tételminősítéssel próbáljuk javítani. Ekkor a mintaelemek vételének helye és száma, a kívánt pontosságtól és a vizsgáló kapacitástól függ, az élelmiszeripar egyes ágazataiban ezt szabványok szabályozzák.

Több mintaelem vétele történhet célzottan, amelyben a vétel helyét és a minták számát valamilyen gyanú irányítja (ázás, kondenzáció, pangás, stb.). Ilyenkor a mintázás akkor igazán informatív, ha a gyanús tételrész (helyek) mennyisége is hozzávetőlegesen megállapítható.

A hazai takarmánymikrobiológiai gyakorlat, a romlási flóra (így a penészek) vizsgálatában, jelenleg még csak egyelemes tételminősítést végez.

Egy pontminta TKE meghatározását terhelő módszertani eredetű hibák

Az egyes minta (pontminta) heterogenitása

Ez a mintafeldolgozás (örlés, aprítás, szuszpenzió készítése, lényegében homogenizálás) miatt a pontmintára vonatkoztatott valódi TKE megállapításában nem játszik szerepet.

Alapszuszenzió készítése során felmerülő hibák

A mikróbacsomók, penészek esetében a propagulumok a pontminta aprítása, a hígítófolyadékban való keverés - rázás és a Tween hatása miatt szétesnek, így a tenyésztéssel kimutatott TKE szám nohet. Ezért szükséges a technikai körülmények szigorú standardizálása.

A decimális hígítású inokulumsorozat készítésénél jelentkező hiba

Szedimentáció (a szuszpenzió állása) a hígítási sor elkészítése során ill. a lemezöntés inokulálása során hibát okoz, ha a vizsgálati sorozat egyes elemei eltérő ideig állásnak van kitéve és a továbbvitel előtt a szuszpenziót nem keverik megfelelően fel.

A TKE értékek eltérése az elméleti decimális aránytól

A log hígításokban kapott TKE számok egymás között nem követik a tízszeres arányt, hanem nagyobb számú telep növekedése esetén a TKE kisebb, mint az előző hígításon számolt TKE tízszerese. A jól ismert jelenséget a bakteriológiai TKE meghatározásokban azzal igyekszünk kompenzálni, hogy a pontminta TKE-jét abból a hígításból számítjuk ki, amelyen a leolvasott telepszám a 200-at legjobban megközelíti. Penészek esetében ez a feltétel nem tartható, mert a telepek méretükben, expanszivitásukban nagyon különbözőek lehetnek.

A jelenséget többféleképpen magyarázzák. Penészek esetében azzal áll összefüggésben, hogy a talaj tápanyagait, több fejlődő telep, viszonylag gyorsabban éli fel.

Telepszám leolvasási hiba

Ez a telepméretetek heterogenitásából és a vizsgáló személy szubjektívitasából adódik. Ez a hiba nagymértékben csökkenthető, ha a bírálatot rendre ugyanaz a személy végzi. A hibára legnagyobb hatással viszont, a TKE meghatározás alapjául leolvasott - párhuzamosok közötti -telepek számának átlaga lehet. Ezért ezt statisztikailag elemeztük.

Párhuzamos inokulálások közötti tenyésztési hiba

Lényegében egy feldolgozási sokaságon belül az „a”, „b” párhuzamosok közötti eltérések kifejezése s% az egyedi s%-okat alapulvéve.

Párhuzamos feldolgozások közötti hiba

Ez egy feldolgozási sokaságon belül az elozokhoz hasonlóan s%-ban kifejezve magában foglalja a mintafeldolgozás és tenyésztés hibáit is.

A logaritmikus TKE adatok statisztikai értékelése

A TKE értékek logaritmikus transzformációja esetén a mindkét hiba a méroértékhez csak úgy viszonyítható, ha ennek is log értékét adjuk meg. Log értékekre alapítva viszont közvetlenül nem képezhető egyetlen olyan statisztikai vagy adatsokaságok közötti eltérés valószínűségi értékét jelző mutató sem, amelyben mérési elemek közötti számtani átlag alapulvétele szükséges. SD számítását csak az elemi adatra szabad vonatkoztatni. Így nem használható a T-próba sem, mert a t-érték p függvény logaritmikus adatok számára nem értelmezhető.

A párhuzamos feldolgozásokra jellemző log-szórási mutatók értékelése

Az ÁTK Mikrobiológiai Osztályának 1997 évi, a szabvány penésztaajok és feldolgozási technikák ko-validálásával kapcsolatos feldolgozásaiból nagyszámú párhuzamos adatot értékeltünk, mert ebben négy, három és kételemes párhuzamos feldolgozások is készültek.

Négy, három és kételemes párhuzamos feldolgozásokat a TKE meghatározás alapját képező leolvasott telepek számtani átlagai szerint 3 csoportba soroltuk: 0 – 20, 20 – 50 és több mint 50. Az ezekre jellemző átlagos SD log transzformált értékeit az 5. táblázat mutatja:

5. táblázat. Két, három és négyelemes feldolgozások jellemző szórásainak logaritmusai

	TKE alapját képező leolvasás számtani átlagai		
	0 – 20	20 – 50	50 felett
kételemes feldolgozás	0,67	0,52	0,14
háromelemes feldolgozás	0,61	0,47	0,13
négyelemes feldolgozás	0,57	0,38	0,08

Látható, hogy a TKE meghatározásában a hígítási és tenyésztési paramétereket úgy kell meghatározni, hogy 50 feletti telepszámra alapíthassunk. Ez maradéktalanul nem valószínűsíthető meg a széna eltérő növekedésű és expanzivitású penészflórája miatt. A talajösszetétel javítására végzett munkánknak is ez volt egyik indítéka.

A log SD értékekben a gyakorlatunkban is szokásos kételemes feldolgozás a három és négyelemes feldolgozásnál nem sokkal rosszabb.

Ugyanebben a vizsgálatban az eltérő aprítás, keverés-rázás legfeljebb 0,15 log hatású, ami viszont az eljárás technikai szabványosításával elkerülhető.

A saját vizsgálatok során végzett feldolgozásokra jellemző log-szórásos mutatók értékelése.

A párhuzamos feldolgozások közötti hibát terméktipikus penészfertőzöttség megállapítását szolgáló vizsgálatosorozat adatbázisában elemeztük a fentiekkel megegyező algoritmussal. Harminc mérés primer adatait feldolgozva, az eredményeket az 6. táblázat mutatja.

6. táblázat. Szénák terméktipikus penészpulációjának megállapítását szolgáló adatosság hiba elemzése. A valószínű log - hiba számítása a log 3 és log 4 TKE leolvasásnál. (n=30)

Hígítási hiba	SD	AVE	SD/AVE	log SD/AVE	log
3-as	0,1	0,093	1,075269	0,031	0,031
4-es	0,096	0,15	0,64	0,193	0,193

Az adatok azt mutatják, hogy ezekben a vizsgálatokban is a hibára nézve döntő tényező a párhuzamos feldolgozásokon leolvasott telepek abszolút száma. Minthogy a terméktipikus TKE megállapításához rendre azokat a hígítási elemeket használtam fel, amelyeken a telepek száma a 100-at meghaladta, az adatsorra jellemző valószínű hiba log 0,031-nek vehető.

A terméktipikus TKE megállapítására szolgáló log TKE adatsor elemei nagyság szerinti sorrendbe állítva egymástól átlagosan 0,067 log értékkel térnek el (N = 75). A valószínű hiba 0,031 értékét figyelembe véve az eltérések biztosan valószínűek lehetnek.

4.2. A szénák terméktipikus flóraelmeinek és a toxinogén penészek előfordulása

Toxinogén genuskok (2.2.1. fejezet) előfordulására nézve a penészflórát 60 (57 Pálffy féle határérték feletti, 3 határérték alatti) mintában értékeltük.

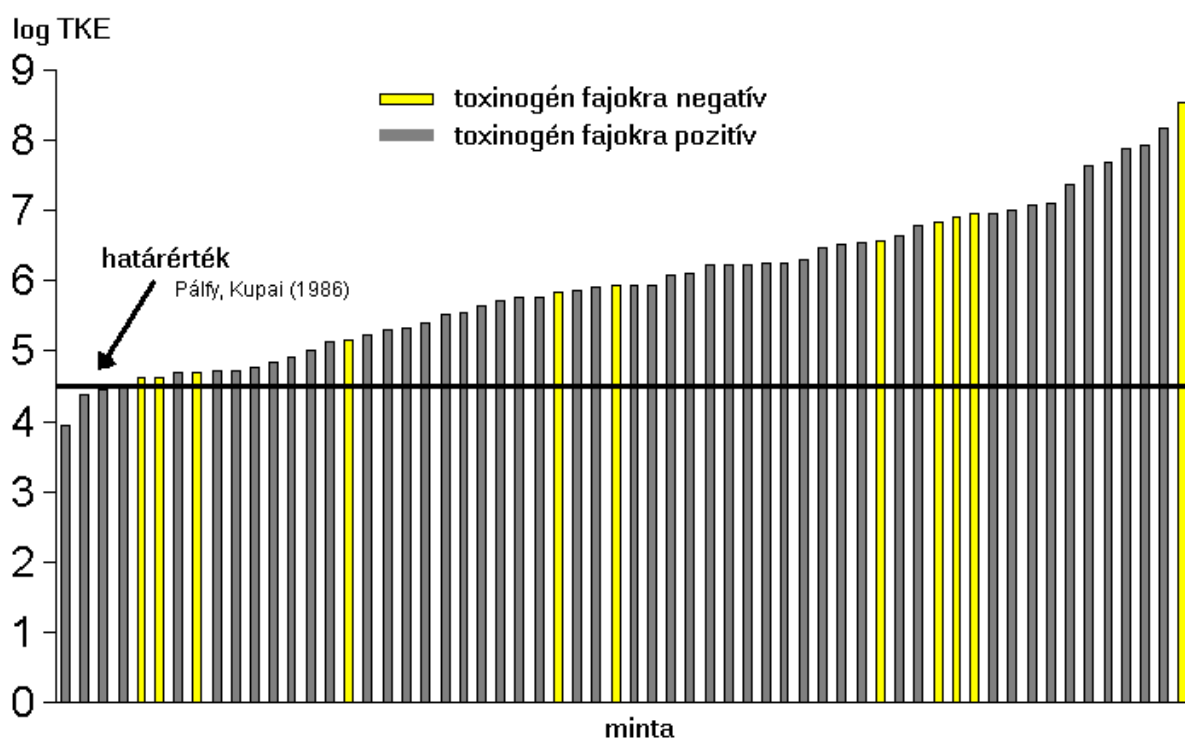
Ezek közül *Aspergillus* fajokat 23 (38,3 %) mintában találtunk. 22 mintára a Pálffy-féle III. osztály határértékét meghaladó TKE volt jellemző. *Penicillium* fajokat 26 mintából (43,3 %) mutattunk ki. 24 minta fölötté, 2 minta alatta volt a fenti határértéknek. *Fusarium* fajokat 23 (38,3 %) mintából lehetett kitenyészteni, és valamennyi penészszáma meghaladta a határértéket. A három TKE alapján jónak minősített mintában tehát *Penicillium* vagy/és *Aspergillus* fordult elő (4. grafikon).

Látható, hogy a toxinogének előfordulása a határérték alatti vagy az azt meghaladó össz-penészszámmal nincs összefüggésben.

A 23 db *Aspergillus*-os mintából 6 (26 %) volt organoleptikusan penészesnek ítéhető, 17 nem. A 26 db *Penicillium*-os mintából 3 (11,5 %) volt láthatóan penészes, a 23 db *Fusarium*-os mintából is csak 6 (26 %) volt szemre penészes.

A toxinogének előfordulása tehát nem valószínűsíthető a minta organoleptikus tulajdonságaival sem.

A magyar takarmány-mikrobiológiai vizsgálati gyakorlattal ellentétben, az *Alternaria* genus tagjait nem soroltuk a potenciális toxinogének közé. A hazai és nemzetközi irodalomban ugyanis nincs egyértelmű adat arra, hogy a szénafogyasztó állatfajok körében az alternariol-toxikózisnak gyakorlati jelentősége lenne.



4. grafikon. A minták TKE száma és a toxinogén fajok előfordulása

Egyéb megfigyelések: Száraz lucernaszénában, az *Aspergillus* genus tagjai, újrancedvesedés hatására nagymértékben felszaporodtak (tároló többszöri beázása, esoverte bálák). A *Fusarium* fajok elofordulása, észrevehetően, ősszel volt gyakoribb.

Az MSZ ISO 7954 szabványban előírt talajon, a széna penészflóra tagjai a tömegvizsgálat igényeit kielégítő gyorsasággal fejlődnek. Problémát okoz viszont a *Mucor* és a *Trichoderma* fajok túlnövése és szétfutása, ami egy speciális, inhibitor tartalmú talaj használatát indokolja.

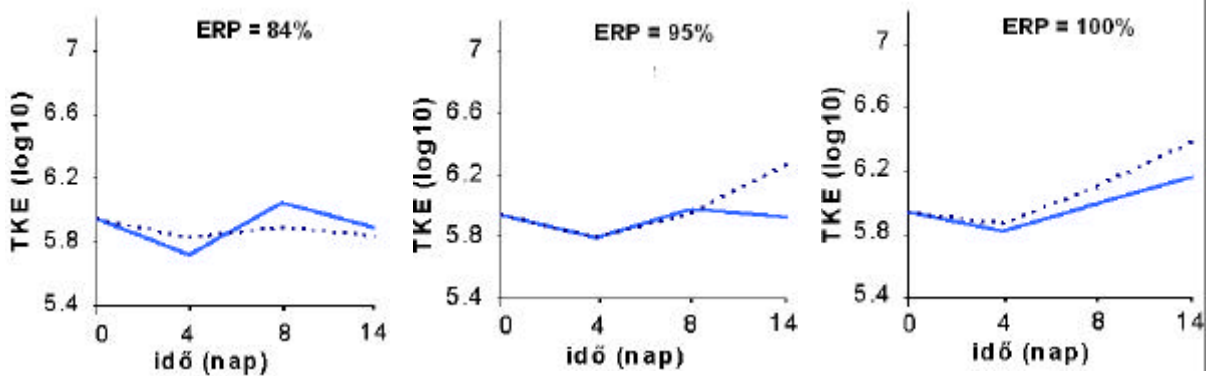
4.3. A penészek tömeges felszaporodásáért felelős fizikai tényezők hatása szénákon

A penészek szaporodáskinetikáját, konstans páratartalmú kamrákban inkubált fűmintákban, a TKE/gramm változásán keresztül kísértük figyelemmel (5., 6., 7. grafikon). Ez a növekedési ráta a $\log TKE/\text{nap}$ értékkel fejezhető ki. Megállapítottuk, hogy az első 8 nap alatt a növekedési rátát elsősorban a minta kiinduló nedvességtartalma határozza meg. Ha a minta nedvességtartalma 40 % fölötti, a penészgombák növekedése intenzív volt, függetlenül a kiinduló fertőzöttségtől, a páratartalomtól és a hőmérséklettől, de 90% páratartalom alatt, 15 °C-on a növekedés csak a 4. nap után indult meg. Az alacsonyabb kiinduló nedvességtartalmú minták (40% alatt) kezdetben, a magasabb relatív páratartalmú atmoszférában, penész-szám csökkenést mutattak. A 8. nap után a 40%-nál alacsonyabb nedvességtartalmú mintákban a penész növekedését meghatározóan a relatív páratartalom befolyásolta. A minták nedvességtartalmától függően, a 84% és alacsonyabb páratartalmon, a penészgombák növekedése között nem találtunk jelentős különbséget. A penészgombák növekedése 15 °C-on 0,1-0,21 $\log TKE/\text{nap}$ -al volt kevesebb, mint 25 °C-on. Ez a különbség nem számottevő.

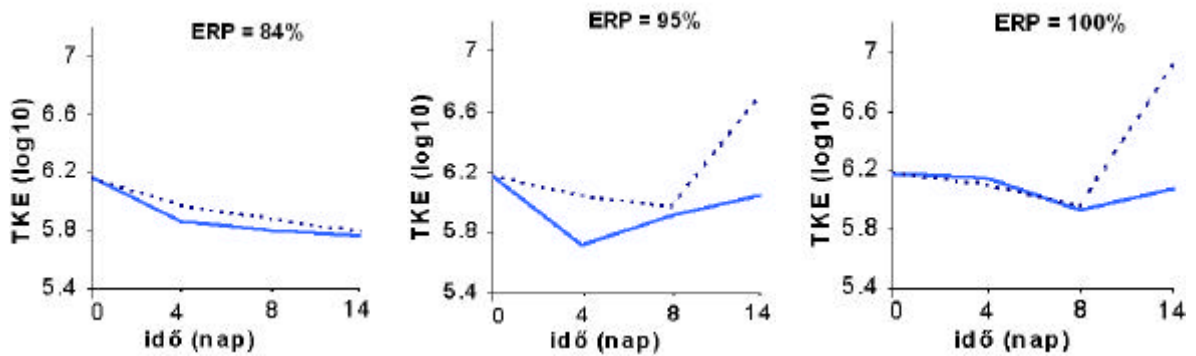
Megállapítható, hogy a penészgombák növekedését a szénákon, az első 8 nap alatt, a kaszáláskori és betakarításkori nedvességtartalom határozza meg. A 8. nap után, a penészgombák növekedése már döntően a relatív páratartalomtól függ.

A magasabb hőmérséklet a penészgombák növekedését nem gyorsítja jelentősen.

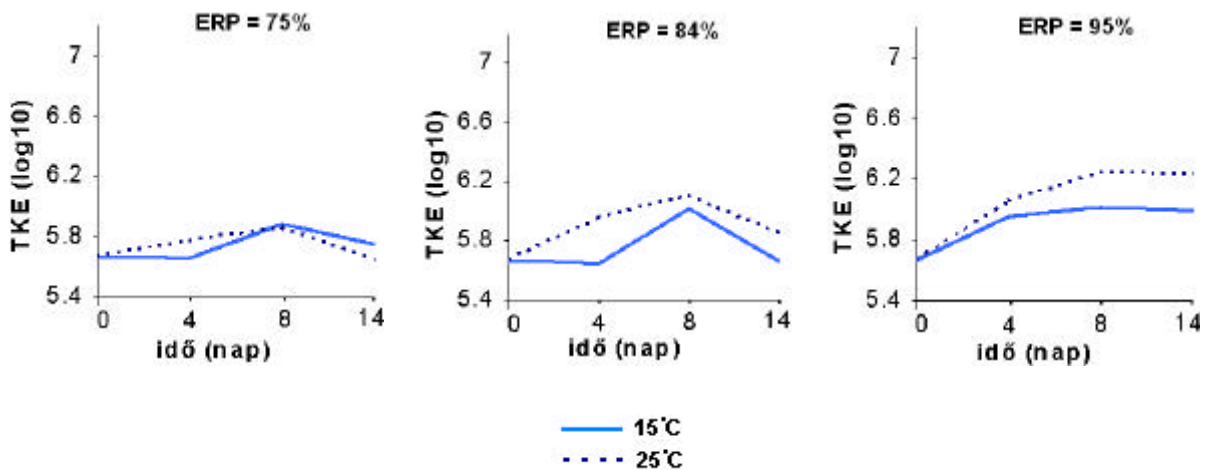
a.) Fuminta nedvességtartalma 17,65%



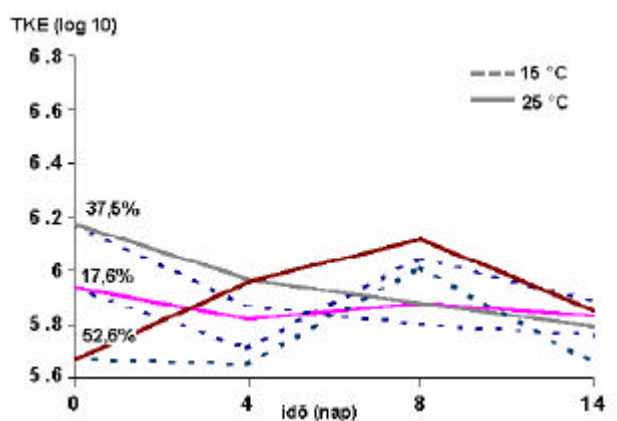
b.) Fuminta nedvességtartalma 37,5%



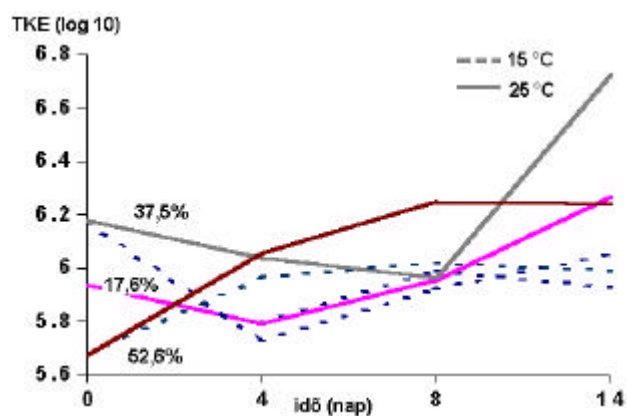
c.) Fuminta nedvességtartalma 52,64%



5. grafikon. Fuminták penész TKE alakulása különböző páratartalmakon és hőmérsékleteken



6. grafikon. Különböző nedvességtartalmú (17,6, 37,5, 52,6 %) fuminták penész TKE alakulása 85%-os ERP-n.

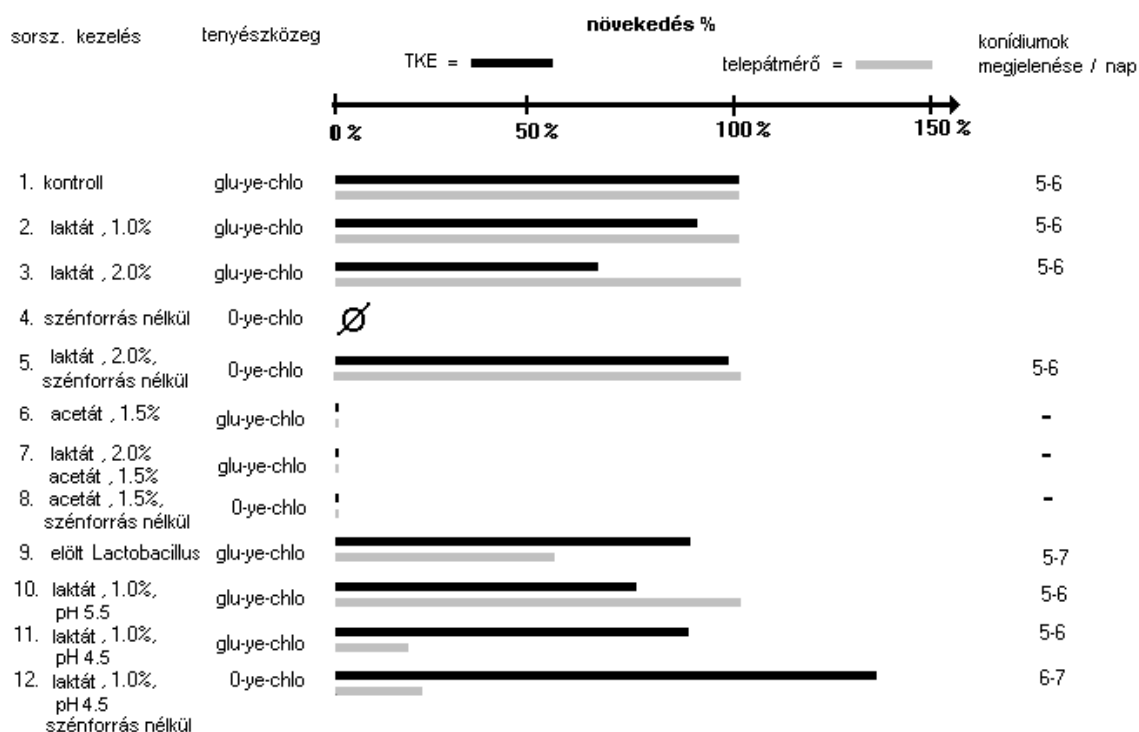


7. grafikon. Különböző nedvességtartalmú (17,6, 37,5, 52,6 %) fuminták penész TKE alakulása 95%-os ERP-n.

4.4. A szénák és kukoricamag terméktipikus penészflórájának, valamint az *Aspergillus parasiticus*-nak az érzékenysége az erjedési savak (laktát, acetát) jelenlétére agartáptalajon

Az inkubációs tenyésztések értékelése

A széna terméktipikus penészflórájának Na-laktátos, szénhidrátmentes és előlt szubmerz *Lactobacillus* tenyészet közegében történő növekedésének jellegzetességeit, az 1., 2. és 3. kísérlet alapján, a 8. grafikonon foglaljuk össze.



8. grafikon. Szénaflóra növekedése a kísérleti táptalajokon. (A 6., 7. és 8. sz. acetátot tartalmazó talajokon nem nettek ki a penésztelepek = teljes gátlás)

Laktát /szénaflóra

A laktát 1 és 2%-os koncentrációban kismértékben gátolja a terméktipikus szénaflóra penészfajainak növekedését

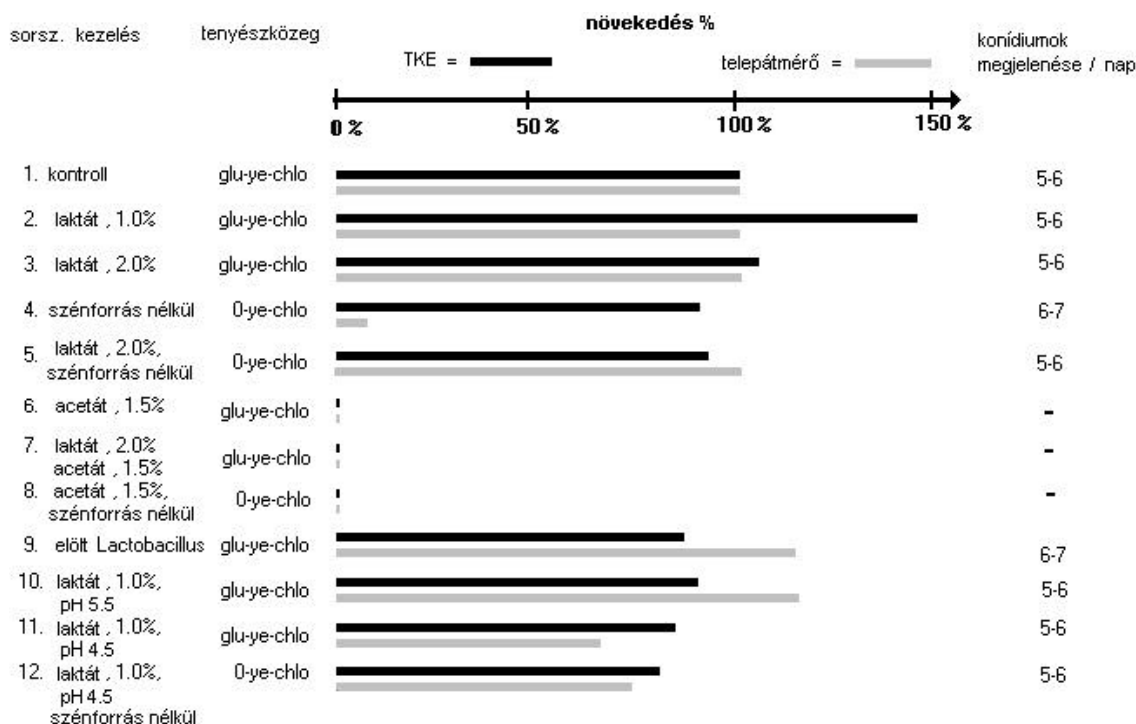
Szénhidrát hiánya / laktáthasznosítás / szénaflóra

Szénhidrátmentes és laktáttartalmú közegben a szénaflóra fajai gyakorlatilag 100%-ban kinonek, a telepfejlődés 100%-os, a penészflóra a laktátot a szénhidráttal azonos mértékben hasznosítja.

Elölt *Lactobacillus* tenyészet /szénaflóra

Elölt *Lactobacillus* tenyészet a szénaflóra növekedését kimutathatóan gátolta mind a TKE-re, mind a telepméretre nézve, de nem jobban, mint az 1%-os Na-laktát.

Az *Aspergillus parasiticus* Na-laktátos, szénhidrátmentes és előlt szubmerz *Lactobacillus* tenyészet közegében történő növekedésének jellegzetességeit, a 4., 5. és 6. kísérlet alapján, a 9. grafikon foglaljuk össze.



9. grafikon. *Aspergillus parasiticus* növekedése a kísérleti táptalajokon (A 6., 7. és 8. sz. acetátot tartalmazó talajokon nem nettek ki az *Aspergillus* telepek = teljes gátlás)

Laktát / *Asp. parasiticus*

Laktát-ionok 1 és 2%-os koncentrációban nem gátolják az *Asp. parasiticust*, sőt, alacsonyabb koncentrációban serkentően hatnak.

Szénhidrát hiánya / laktáthasznosítás / *Asp. parasiticus*

Szénhidrátmentes közegben az *Asp. parasiticus* 100%-ban kinyerődött, de a telepfejlődés erősen gátolt, a laktátot viszont a szénhidráttal azonos mértékben hasznosítja.

Elölt *Lactobacillus* tenyészet / *Asp. parasiticus*

Elölt *Lactobacillus* tenyészet az *Asp. parasiticust* nem gátolja sem a TKE-ben, sem a telepátmérobén lemérve.

Acetát, acetát-laktát / szénaflóra

2% koncentrációjú laktát a szénaflóra TKE-t kis mértékben csökkenti.

1,5% ekvimoláris koncentrációjú acetát a szénaflórát teljesen gátolja (4. fénykép)

Glukóz nélkül a szénaflóra 55,7% arányban nő ki a kontrolhoz képest.

1,5% koncentrációjú acetát, cukor nélküli MSZ ISO 7954-en, a szénaflórát teljesen gátolja: az acetátot egyetlen tagja sem hasznosítja.

Acetát, acetát-laktát / *Aspergillus parasiticus*

2% laktát az *Aspergillus parasiticus*-t nem gátolja.

1,5% (ekvimoláris) acetát teljes gátlás

Laktát és acetát teljes gátlás.

Az *Aspergillus parasiticus*, glukózmentes talajon, 96,7% arányban kinyerődött.

Glukózmentes MSZ ISO 7954 1,5% acetáttal: az *Aspergillus parasiticus* totális gátlása.

Laktát, pH 6,5; 5,5; 4,5/ szénaflóra

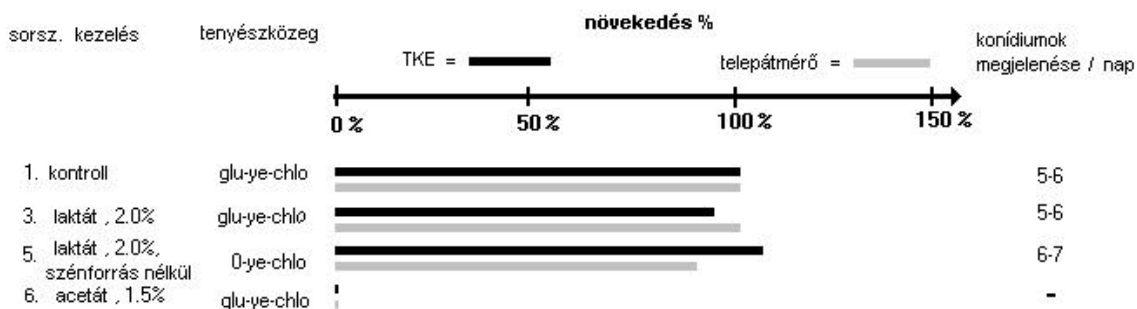
A csökkenő pH (6,5; 5,5; 4,5), a szénaflóra növekedést összességében valamennyire lassítja, és a flóra fajösszetételét szelektálja.

Laktát, pH 6,5; 5,5; 4,5/ *Aspergillus parasiticus* (3. fénykép)

A pH csökkenése az *Asp. parasiticus* növekedését nem gátolja jelentősen. pH=4,5 körében mutatkozik numerikus és növekedési gátlás, azonban a konídiumképződés gyorsabban indul meg.

Laktát, acetát / kukoricaflóra (10. grafikon)

A laktát a terméktipikus penészflórát nem gátolja – sőt számára a laktát metabolizálható, a cukorral egyenértékűen. Az acetát a kukorica terméktipikus penészflóráját teljesen gátolja.



10. grafikon. Kukorica terméktipikus penészflórájának növekedése a kísérleti táptalajokon



3. fénykép. *Aspergillus parasiticus* növekedése MSz ISO 7954 és 2% laktátot tartalmazó (pH 5,5) talajokon



4. fénykép. Az acetát teljes gátlást gyakorol a szénaflóra növekedésére

A kísérletekből levonható következtetések

1. A széna terméktipikus penészflórájára a laktát kimutatható germinációs gátlást gyakorol, azonban a micéliális fejlődést nem gátolja (1., 2. és 3. talajok). A laktát gátló hatása, a szénaflóra különféle fajaira nézve, valószínűleg szelektív.
2. A szénaflóra fajai szénhidrátmentes, de laktátot tartalmazó közegben gyakorlatilag 100%-ban kinőnek, a telepfejlődés 100%-os, tehát a laktátot a szénhidrátokkal azonos mértékben hasznosítják. Szénhidrátot sem és laktátot sem tartalmazó talajban, a növekedés 55%-os (1. és 5. talajok).
3. A szénaflóra növekedését az előlt *Lactobacillus* tenyészet közege mind a TKE-re, mind a telepnövekedés sebességére nézve kimutathatóan gátolta, de nem erősebben, mint egymagában a Na-laktát (1. és 6. talajok). A gátló hatás tehát a közeg laktáttartalmától függ.
4. Az *Asp. parasiticus* tenészeiben, a Na-laktát, a víztérre számított 1,0 és 2,0 töm/térf.%-ban nem gátolta sem a spórák germinációját (numerikus gátlás), sem a telepek növekedését (micéliális gátlás) - 1., 3. kísérlet, 1., 2., 3. talajok. Ebből az következik, hogy leérjedés után aerob körülmények közé kerülő takarmány az aflatoxinogének felszaporodásának éppen úgy ki van téve, mint hasonló vízáktivitású, nem erjesztett tétel. Tehát valamely 0,75 a(w) fölötti vízáktivitású takarmányt, a tejsav jelenléte nem képes megvédeni a penészek felszaporodásától.
5. Szénhidrátmentes közegben is jelentős az *Asp. parasiticus* spórák germinációja, viszont tetemes a micéliális növekedés gátlása (1. és 4. talaj). Amikor a tejsavas erjedés a szénhidrátokat már felhasználta, a közegben laktát van jelen. Az 1. és 5. talajösszetételek összehasonlításából (TKE és telepátméno %) kiderül, hogy az *Asp. parasiticus* a laktátot is képes hasznosítani.
6. Előlt szubmerz *Lactobacillus* tenyészet közege az *Asp. parasiticusra* nézve nem gyakorol gátlást (1. és 6. talajok). Minthogy a laktátnak sincs gátló hatása, ebből következtethetően, az előlt *lactobacillusok* közege a laktáton kívül más természetes inhibitorokat nem képez az *Asp. parasiticusra* nézve.
7. Míg 2% laktát a szénaflórát kis mértékben gátolja, addig a 1,5%-os (a laktáttal ekvimoláris) koncentrációjú acetát azt teljesen gátolja. Az acetátot a szénaflóra egyetlen tagja sem hasznosítja.

8. 1,5% acetát az *Asp. parasiticus* növekedésére teljes gátlást gyakorol. Ugyanez mutatkozik a laktát és az acetát ekvimoláris kombinációjában is. Az *Asp. parasiticus* valószínűleg nem hasznosít acetátot.
9. Csökkenő pH (6,5; 5,5; 4,5) a szénaflóra növekedését összességében valamennyire lassítja, és a flóra fajösszetételét szelektálja.
10. A pH csökkenése az *Asp. parasiticus* növekedését nem gátolja jelentősen. pH 4,5 közegében mutatkozik numerikus és növekedési gátlás, azonban a konídiumképződés gyorsabban indul meg.
11. A kukorica terméktipikus penészflórájára (zömmel *Aspergillus*-ok), a 2 % laktát semmilyen gátlást nem gyakorol. A flóra a laktátot csaknem egyenértékuen hasznosítja. Az ekvimoláris acetát viszont totálisan gátol.

4.5. A szénák mikológiai vizsgálatára alkalmas táptalajreceptúra kialakításának eredményei

14 szénaminta összehasonlító feldolgozása során az MSz ISO 7954, ¼ N MSz ISO 7954, MSz ISO 7954 + DC, DRBC, ¼ N DRBC, DRBC + DSA és ¼ N DC talajakon kinott TKE állományt és a párhuzamosok eltérését a 7. táblázat mutatja.

7. táblázat. A kísérleti talajokon kimutatott penész TKE értékek (párhuzamos feldolgozások különböző szénamintákkal)

Minta sor-száma	MSz ISO 7954	¼ N DRBC	DRBC
1	1,25 x 10 ⁶	1,51 x 10 ⁶	3,28 x 10 ⁶
2	7,9 x 10 ⁵	1,37 x 10 ⁶	1,29 x 10 ⁶
3	3,29 x 10 ⁶	4 x 10 ⁶	2,98 x 10 ⁶
4	2,1 x 10 ⁵	2,48 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁵
5	5,2 x 10 ⁴	5,54 x 10 ⁴	
6	1,8 x 10 ⁶	1,85 x 10 ⁶	
7	7,5 x 10 ⁵	7,95 x 10 ⁵	
8	9,35 x 10 ⁶	9,7 x 10 ⁶	
			¼ N DC
9	3,4 x 10 ⁵	3,36 x 10 ⁵	3,36 x 10 ⁵
10	6,1 x 10 ⁴	7,72 x 10 ⁴	7,4 x 10 ⁴
11	1,34 x 10 ⁵	1,39 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵
12	6,8 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁵	7,85 x 10 ⁶
13	2 x 10 ⁵	2,63 x 10 ⁵	
14	7,09 x 10 ⁵	7,8 x 10 ⁵	
15	1,28 x 10 ⁶	1,62 x 10 ⁶	
		¼ N MSz ISO 7654	MSz ISO 7954 + DC
16	3,5 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁵	3,5 x 10 ⁵
17	3,6 x 10 ⁴	3,9 x 10 ⁴	2,9 x 10 ⁴
			DRBC + DSA
18	6,9 x 10 ⁵	4,9 x 10 ⁵	

A vizsgált talajösszetételeken, a szénák (tömegetakarmányok) vizsgálata szempontjából tett lényeges megfigyeléseket az 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat. A vizsgált talajkombinációk alkalmazhatósága a telepnövekedés, a telepek elbírálhatósága, és a *Mucor* növekedése szempontjából

	MSz ISO 7954	¼ N MSz ISO 7954	DRBC	¼ N DRBC	¼ N DC	MSz ISO 7954 + DC	DRBC + DSA
Telepkezdemények fejlődése	72 h	Nehezen indul, 96 h után kisebb átmérőjű telepek. Számuk valós.	72 h	72 h	72 h	72-96 h	72-96 h
A kimutatott TKE után a konidiumok megjelenése	Genusztól függő, 5- 7. nap után.	Genusztól függő, 10 nap után.	Genusztól függő, 5-7. nap után.	Genusztól függő, 5-7. nap után.	Genusztól függő, 5-7. nap után.	Genusztól függő, 5-7. nap után.	Genusztól függő, 7-10. nap
Színek észlelhetősége	Kiváló	A színek nem tipikusak	Nehézkes, a talaj színe zavaró	Nehézkes, a talaj színe zavaró	Lassan kialakuló színek	Kiváló	Nehézkes, a talaj színe zavaró
<i>Mucor</i> légmicélium megjelenése	48 h	48 h	-	-	96 h	96 h	48-72 h
<i>Mucor</i> gátlás mértéke	Nem gátol	Nem gátol	Teljes gátlás	Teljes gátlás	Csaknem teljes	Késleltető gátlás	Késleltető gátlás

A Rose Bengal adalék a talaj alapszínét intenzív rózsaszínre festi. Ez a színek – különösen a rózsaszín telepárnyalat – észlelését szinte lehetetlenné teszi, ugyanakkor a Rose Bengal inhibitor hatása egymagában jelentéktelen, csak az élesztokra nézve intenzív. A korai telepkezdemények gyorsabb észlelése rózsaszín festékkötésük alapján nem jelentős elony.

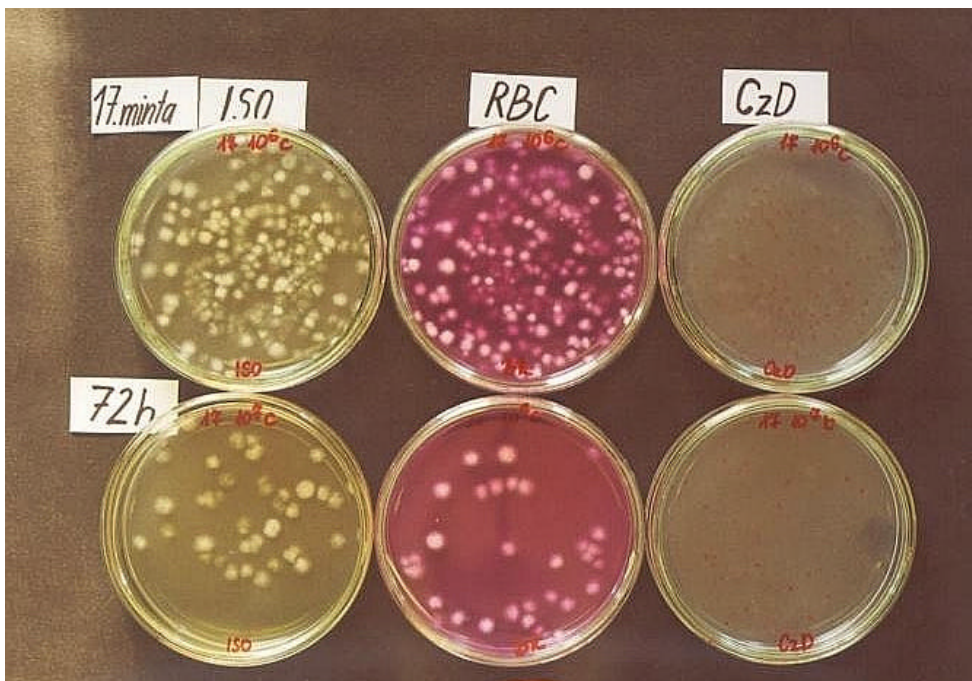
A csökkentett tápanyag-koncentrációjú (1/4 N) talajon a *Mucor* fejlődése is lelassul, a teljes koncentrációjával gyakorlatilag azonos össz-TKE olvasható le, viszont a különböző fajok konídiumai általánosan lassabban fejlődnek ki és színük sokkal kevésbé kifejezett.

Kis mértéku gátló hatás esetén a *Mucor* elveszti intenzíven szétkúszó légmicélium képző képességét, azonban felületi terjeszkedése megmarad. Ekkor még nagy területeket képes elfoglalni, és ezzel a kimutatható TKE-számot rontja. Erősebb gátló hatás esetén szorul annyira vissza, hogy terjeszkedése a flóra többi tagjával körülbelül azonos.

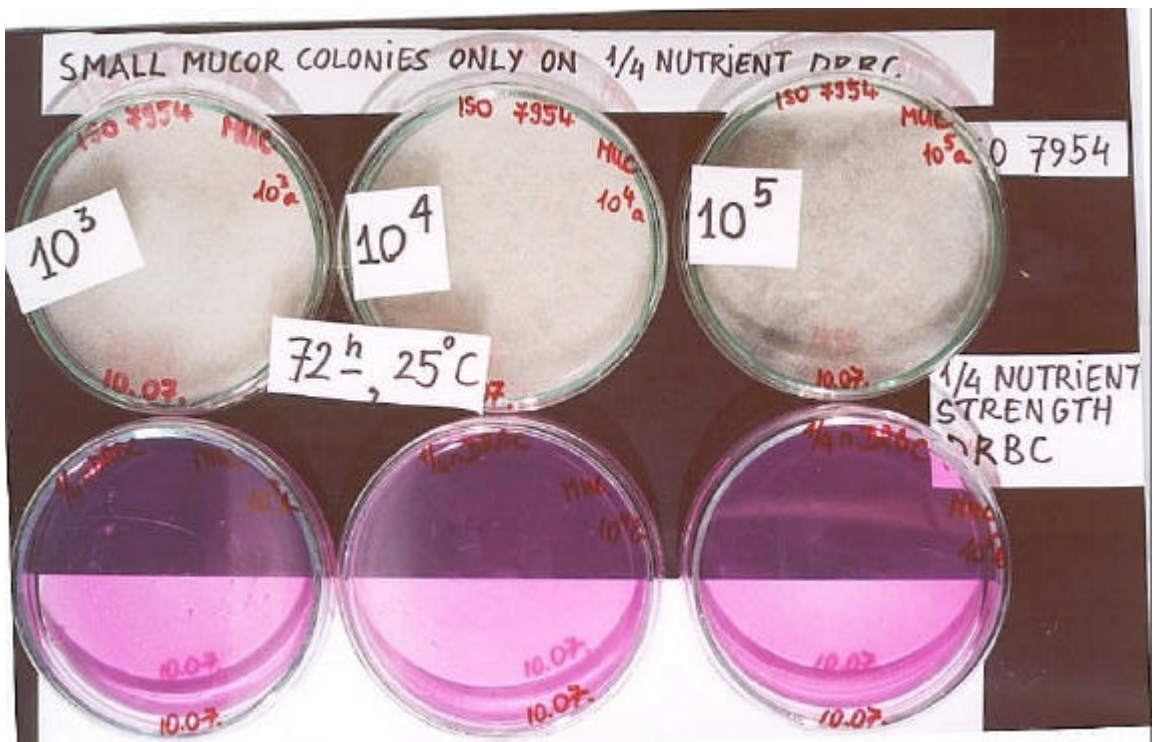
Az 8. táblázatban összesített megállapításokat, az 5-11. fényképen látható feldolgozások illusztrálják.



5. fénykép. Szénaflóra 1/4 N DRBC talajon , ugyanaz MSz ISO 7954-en intenzív *Mucor* növekedéssel (4 csészéből 3 értékelhetetlen a *Mucor* fehér légmicéliuma miatt). A telepek jellemző színét a rózsaszín háttér zavarja.



6. fénykép. MSz ISO 7954 talajon a Rose Bengal-nak nincs inhibitor hatása, ugyanakkor a szintetikus Czapek-Dox talajon (kiegészítő vizsgálat) még nem észlelhető növekedés.



7. fénykép. MSz ISO 7954 talajt befutja a *Mucor*, az 1/4 N DRBC talajon azonban teljes gátlás tapasztalható



8. fénykép. *Mucor* növekedése MSz ISO 7954, DRBC és 1/4 N DRBC talajokon szélesz-
téses ráoltásnál.



9. fénykép. Szénadarabok körüli *Mucor* telepek növekedése MSz ISO 7954, DRBC és DRBC + DSA talajokon.



10. fénykép. *Mucor* növekedése MSz ISO 7954, DRBC + DSA és DRBC talajokon. DSA a Dichlorannál kevésbé hatékony.



11. fénykép. Szénaflóra növekedése MSz ISO 7954, ¼ N MSz ISO 7954 és MSz ISO 7954 - DC talajokon. A dichloran a *Mucort* kielégítően visszaszorítja, a tápanyagszint csökkentése kismértékben lassítja a konídiumok színének kialakulását.

Következtetések

1. A takarmányok penészszámaának meghatározására előírt MSz ISO 7954 szabványtalaj szálastakarmányok vizsgálatára nem alkalmas, mert az esetek mintegy felében, a *Mucor* túlnövése, mind a TKE leolvasását, mind a toxinogén telepek felismerését meggyújtja.
2. Inhibitorok alkalmazása vagy a talaj tápanyagszintjeinek csökkentése esetén, a mintákból kimutatható TKE, az összehasonlítás alapjául vett MSz ISO 7954 szabványtalaj

jon kapott TKE-értékkel gyakorlatilag megegyezik, a feldolgozásnál szokásos hibahatárok mellett.

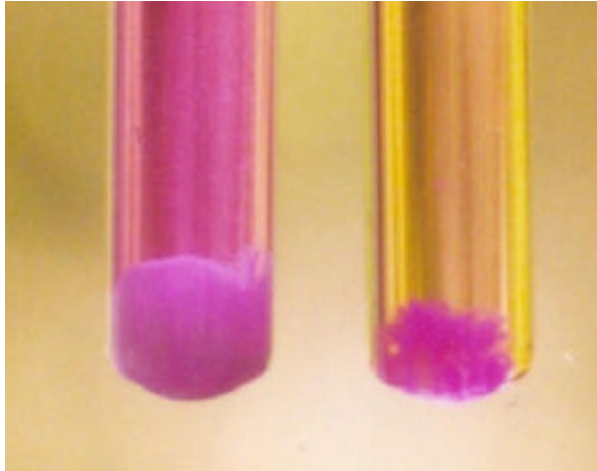
3. Az inhibitorokat tartalmazó DRBC összetétel (KING és mtsai, 1979) korai TKE leolvastat tesz lehetővé (egyenletesebb telep méret), egyidejűleg a *Mucort* visszaszorítja. Ugyanakkor a talaj alapszíne, a konídium-képződmények – különösen a toxinogén *Fusariumok* - színének megítélését megnehezíti. Az Rose Bengal hífafestő hatása nem nagy elony.

4. Vizsgálataink jelenlegi fázisában, az MSz ISO 7954 - dichlorán kombinációt találtuk a legmegfelelebbnek, amelyen a TKE korán leolvasható, a *Mucort* a DRBC-ével egyenértékűen visszaszorítja és színtelen, ezért a telepszínek jól megfigyelhetők.

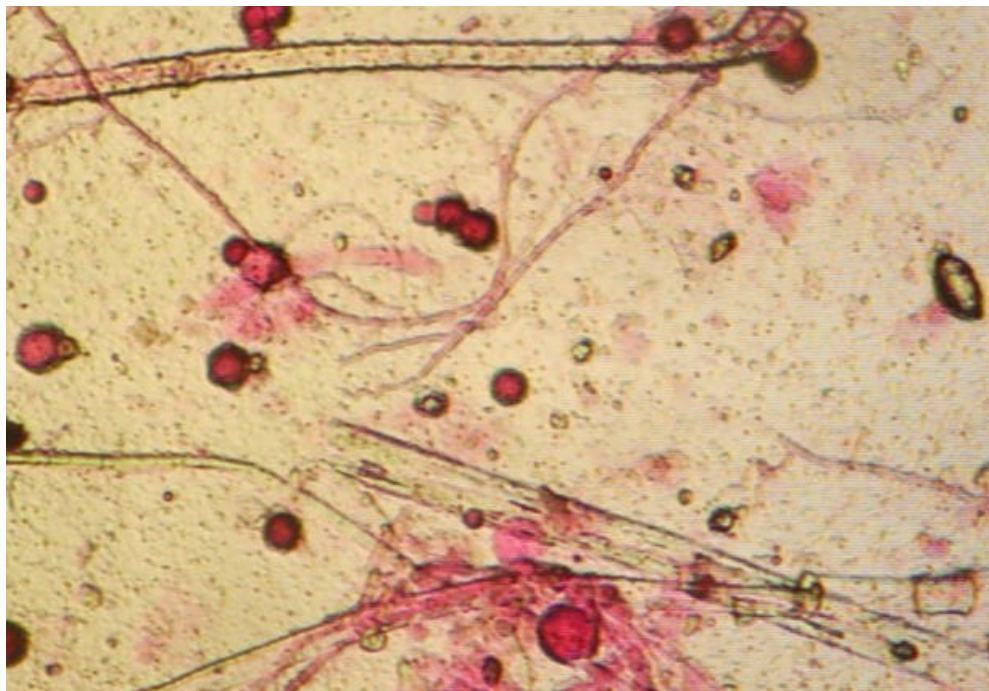
5. A 2-4-dinitroszalícilsav (DSA), mint inhibitor, intenzív alapszíne és csekély hatékonysága miatt nem vált be.

4.6. Szelektív propagulum-festési technika kidolgozásának eredménye

Szénák és abrakfélék alapszuszpenzióiban malachitzöld, amidoblack (AB) és Sudan III festéssel a propagulumképletekre nézve érdemleges szelektivitást nem lehetett észlelni. Ugyanakkor a Rose Bengalt (RB) a konídiumok (spórák) megkötik, és sötétvörös képletek alapján ismerhetők fel, míg más mikroképletekből a festék kioldódik (12., 13. fénykép). Az egyébként pigmentált (fekete) telepeket képező fajok RB-vel nem festődnek, de éppen a pigmentáltságuk révén ismerhetők fel. Az RB a festés során kismértékben kötődik a keményítő-szemcsékhez. Gabonaorlemények szuszpenziójában, a fozás miatt destrukturált keményítőszemcsék rózsaszín töredék-tömeg alakjában láthatók. Az RB a baktériumokat is festi, amelyek, az ajánlott 250x-es nagyítással, halvány porszemcséként láthatók. Növényi rostok, szorók, törmelékek és gyakran nematódák, az RB-t nem kötik, így a penész eredetű képletektől biztosan megkülönböztethetők.



12. fénykép. Hokezelés után, a micélium a Rose Bengalt megköti



13. fénykép. Rose Bengal-lal festett agarmátrixos preparátum (250x-es nagyítás)

A mintaszuszpenziókban az AB gyengén kötődött a propagulumokhoz, és kékeszöld színe jóval kevésbé feltűnő, mint az RB festés esetében. A spóraburok apoláros elemekként gondolván vizsgáltuk a Sudan lipidfestést. Selektivitása nem megfelelő, a hifákban a

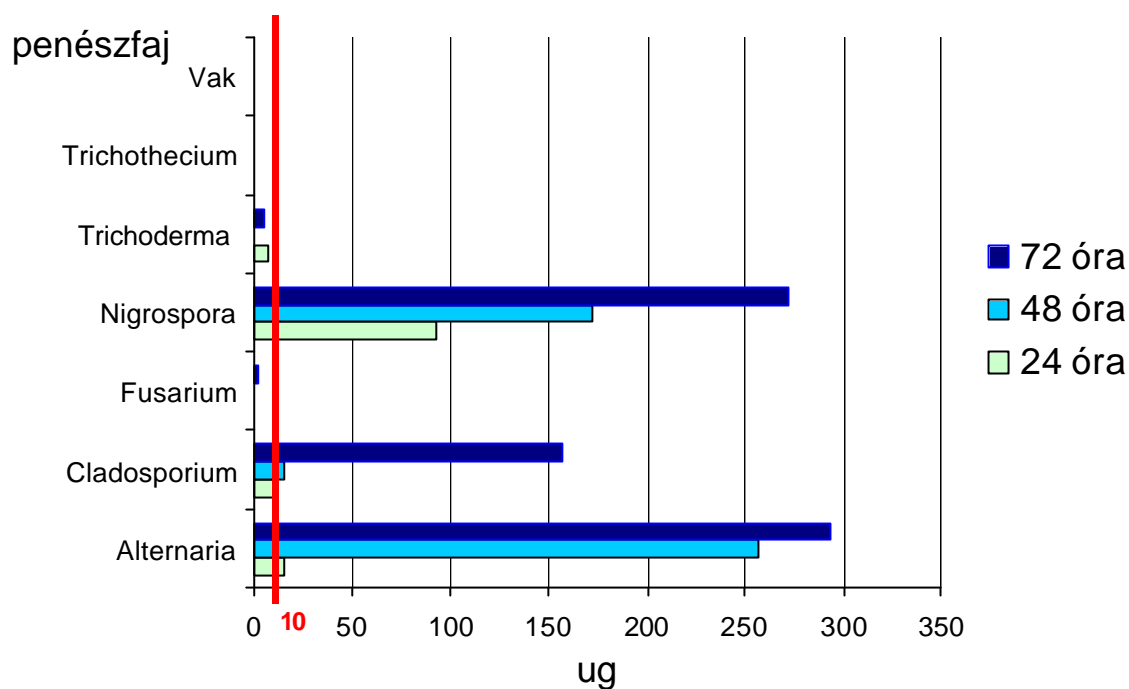
szeptáltságot nem mutatja, ugyanakkor a keményítoszemcsékhez is kötődik.

Eljárásunk alkalmas száraz preparátum készítésére is. A lemezen beszárított agarrétegben a részecskék a széleken sem csapódnak össze, ugyanakkor a vizes készítményhez képest a száraz agar nagy törésmutatója miatt a fázistárgyak határvonalai gyengébbek. Ezen segít a festés, amelyben a színárnyalat lényegében a fázistárgyat amplitúdó-tárggyá alakítja át. A szárazkészítmény elonye az archiválhatóság, ami lehetővé teszi a vizsgálat objektív dokumentálását. Ennek alapján ugyanis – a szuszpenzió hígításának és a felvitt folyadékmennyiség ismeretében – a penészfertőzöttség mértékére jellemző spóraszám/gramm kiszámítható, ami egyrészt a TKE-vel szoros kapcsolatban van, másrészt a tétel előéletére nézve is jelzőértékű.

4.7. Kísérletek az invertáz-teszt alkalmazhatóságára néhány szénákra jellemző genus esetében

A vizsgált terméktipikus penészfajok közül észlelhető invertáz termelése a *Nigrospora*, *Alternaria* és *Cladosporium* fajoknak van (11. grafikon és 7.2. fejezet, 11. táblázat). Közülük a *Nigrospora* növekedési sebessége éri el azt a mértéket, amelynek alapján az invertáz teszt jelző értékűnek tekinthető, már 24 óra után jelentős az aktivitás, amelyet fenntart 48 és 72 óráig is. Az *Alternaria* 24 órás lag-fázis után, a következő 24 órában nagymértékben termel, azonban 48-72 óra között leáll. A *Cladosporium* jelentős invertázt csak még hosszabb lag-fázis után, 72 óra után termel. Érdekes, hogy mind a három faj pigmentált.

Tekintettel arra, hogy a tapasztalatok alapján a "fekete penészek" a terméktipikus állomány mintegy felét teszik ki, és ebben is a *Cladosporium* dominál, az invertáz teszt nem tekinthető használhatónak szénák penészfertőzöttségének gyors megállapítására.



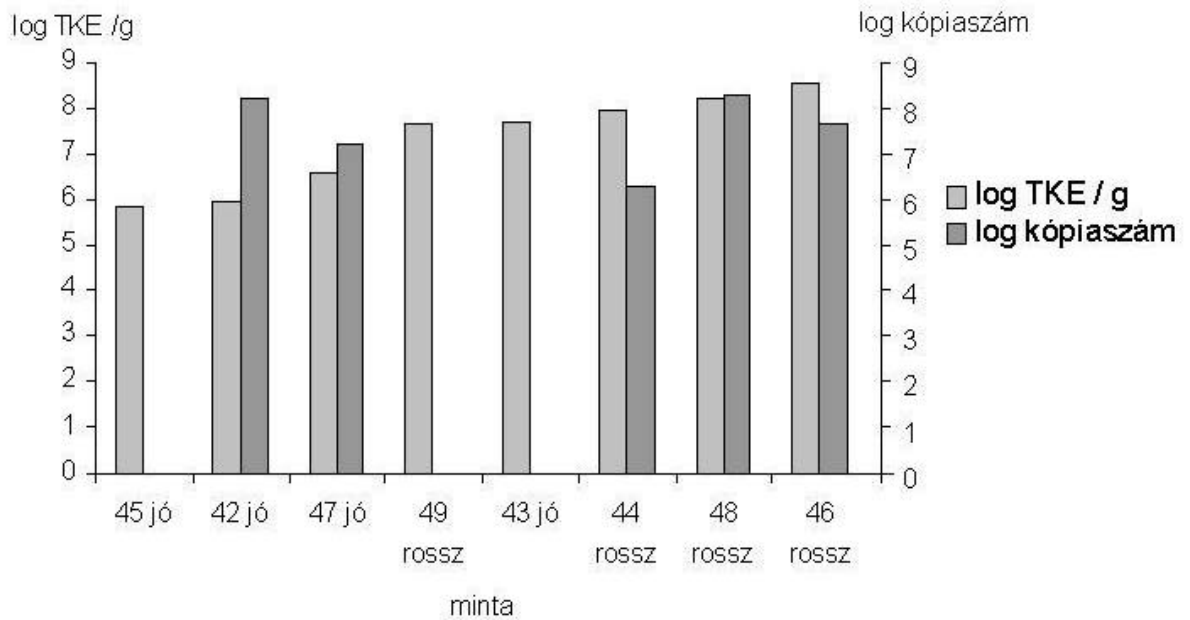
11. grafikon. Különböző penészfajok invertáztermelése az idő függvényében

4.8. DNS RT-PCR-rel az ALLFunTaq penész-specifikus primer segítségével kapott kópiaszám és a tenyésztéses (szabvány) módszerrel meghatározott TKE összefüggésének vizsgálata

Az első vizsgálat sorozatban (amelyben a szénmintákból a DNS kivonása a növényi anyagok feldolgozására általánosan használt technikával történt) a szenzorikus bírálat, az AllFunTaq RT-PCR reakcióval kapott kópiaszámok és az MSz ISO 7954 módszerrel meghatározott TKE értékek a 9. táblázat és a 12. grafikon alapján hasonlíthatók össze.

9. táblázat A szenzorikus vizsgálat, az RT-PCR és a tenyésztéses technikával kimutatható penészszármok, szénamintákban (első vizsgálat sorozat)

<i>Minta száma</i>	<i>Minta, érzékszervi bírálat</i>	<i>kópiaszám / g (x2000)</i>	<i>log kópiaszám / g</i>	<i>TKE/g</i>	<i>log TKE/g</i>
42	Fuszéna, jóminőségű	1,65 x 10 ⁸	8,22	8,5 x 10 ⁵	5,93
43	Fuszéna, jóminőségű	3,56 x 10 ⁵	5,55	5 x 10 ⁷	7,70
44	Fuszéna, rossz, penészes	1,87 x 10 ⁶	6,27	8,8 x 10 ⁷	7,94
45	Fuszéna, jóminőségű	0	0	6,9 x 10 ⁵	5,84
46	Fuszéna, rossz, penészes	4,33 x 10 ⁷	7,64	3,45 x 10 ⁸	8,54
47	Lucernaszéna, jóminőségű	1,5 x 10 ⁷	7,18	3,9 x 10 ⁶	6,59
48	Lucernaszéna, rossz, penészes	1,89 x 10 ⁸	8,28	1,66 x 10 ⁸	8,22
49	Búzaszalma, feketedett, rossz	0	0	4,5 x 10 ⁷	7,65

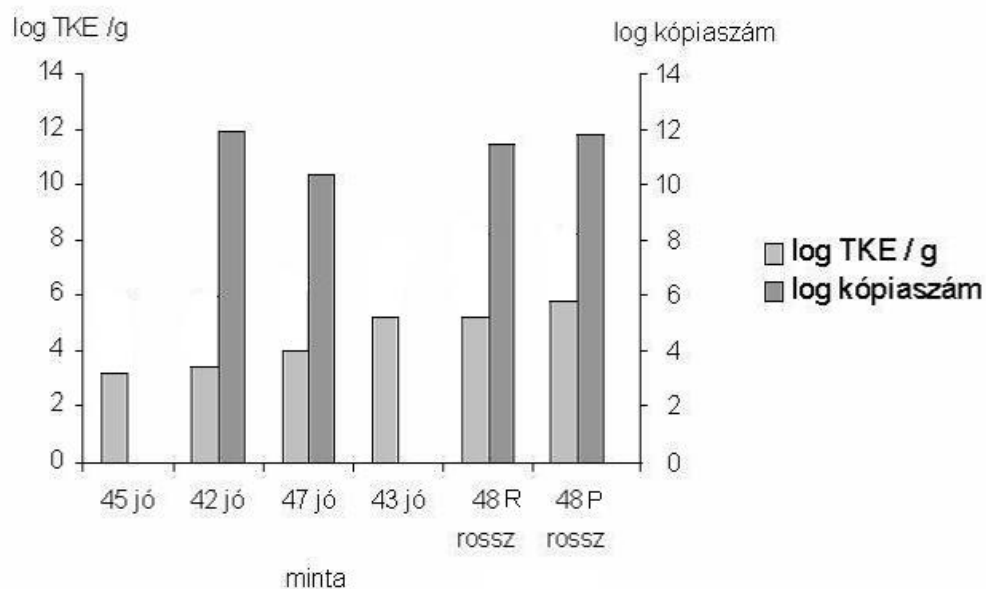


12. grafikon. A szénminták AllFunTaq RT-PCR reakcióval kapott kópiaszámai és az MSz ISO 7954 módszerrel meghatározott TKE értékei (növekvő TKE sorrendben)

A második vizsgálatsorozatban, abrazív adalékkal fokozott dezintegrálást végeztünk. Ennek megfelelően, a mintákból kimutatható kópiaszámok jelentősen nőtték. A mintánkénti szenzorikus bírálat, az RT-PCR kópiaszámok és tenyésztési TKE értékek a 10. táblázat és 13. grafikon alapján vethetők össze.

10. táblázat A szenzorikus bírálat, az RT-PCR és a tenyésztéses technikával kimutatható penészszármok, szénamintákban (második vizsgálat sorozat)

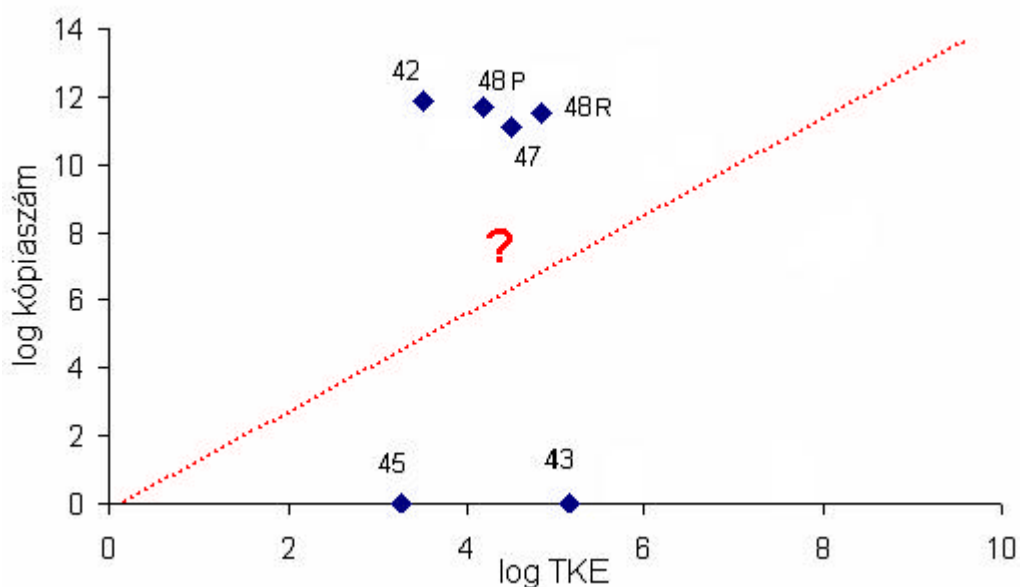
<i>Minta száma</i>	<i>Minta, érzékszervi bírálat</i>	<i>kópiaszám / g (x 2000)</i>	<i>log kópiaszám / g</i>	<i>TKE/g</i>	<i>log TKE/g</i>
42	Fuszéna, jóminőség	$8,36 \times 10^{11}$	11,922	$2,7 \times 10^3$	3,44
43	Fuszéna, jóminőség	0	0	$1,6 \times 10^5$	5,21
45	Fuszéna, jóminőség	0	0	$2,2 \times 10^3$	3,35
47	Lucernaszéna, jóminőség	$2,12 \times 10^{10}$	10,326	$1,2 \times 10^4$	4,10
48P	Lucernaszéna, rossz, penészes, kiszitált porfrakció	$5,3 \times 10^{11}$	11,724	$7,19 \times 10^5$	5,81
48R	Lucernaszéna, rossz, penészes, csak a rostok	$3,1 \times 10^{11}$	11,491	$1,59 \times 10^5$	5,20



13. grafikon A szénaminták AllFunTaq RT-PCR reakcióval kapott kópiaszámai és az MSz ISO 7954 módszerrel meghatározott TKE értékei (növekvő TKE sorrendben)

Eredmények értékelése

A szénaminták mikológiai állapotát, az organoleptikus minőség és az autentikusnak tekintett TKE-hez képest az AllFunTaq primerrel mért gomba 18S rDNS kópiaszám még tendenciaszerűen sem jelzi (14. grafikon). Összefüggést a molekuláris biológiai és hagyományos tenyésztési technikával kimutatott penészsám között nem találtunk (a korreláció értéke nagyon alacsony: $R=0,17$).



14. grafikon. A tenyésztéssel kapott penészsám és a RT-PCR-rel kapott kópiaszám összefüggése

Magas PCR kópiaszámok viszonylag alacsony TKE értékek mellett, magyarázhatók lehetnek azzal, hogy a mintában régebbi penész-gradáció elhalt maradványait mutattuk ki. Azonban, ezek a minták organoleptikus, vizuális bírálatnál egészségesnek látszottak. (Ezen minták terméktipikus penészflórájukban zömében *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* fajokat tartalmaztak, amelyekre nézve az AllFun Taq specificitását Mayer (2002) modellkísérletben igazolta).

Egyes nyilvánvalóan penészes, magas TKE-ju mintákból nem sikerült kópiákat kimutatni. Szénamintában természetes körülmények között keletkezett gombatömeg kvantifikálását RT-PCR-rel nagymértékben bizonytalanná teszi az a tény, hogy a DNS kivonásának módja a kitinbe zárt micéliumsejtből, valamint a cellulóz-lignin struktúrákból, alapvetően befolyásolja az ugyanazon mintából elérhető kópiaszámot.

A 48P számú (kvarchomokkal dezintegrált penészes lucernaszéna, porfrakció) és a 48R számú (ugyanennek rostfrakciója) minta RT-PCR vizsgálatában kapott log - kópiaszámok (48P számú minta: 11,721; 48R számú minta: 11,491) hasonlósága arra utalhat, hogy a rostokra ránott micéliumtömeg ugyanolyan nagyságrendben tartalmaz penészgomba DNS-t, mint a vélhetően túlnyomóan konídiumokat tartalmazó porfrakció.

Szénák penészfertozottságának megállapítására az AllFunTaq RT-PCR módszer alkalmazása, vagy ennek ellenkezője akkor állapítható meg, ha valamilyen, - eddig még nem ismert úton, - a száraz vegetatív anyaggal deszikkált struktúrából, a DNS teljes kvantitatív kinyerése megoldhatóvá válik. A problémán nem segítene a DNS összmenyiségének meghatározása a feltárt mintában, mert a növényi sejtképletekből valószínűleg a teljes DNS tartalom nagyobb %-a nyerhető ki, mint a gomba-eredetű mikroképletekből.

Egyéb megfigyelések:

A TKE adatok összehasonlításakor – 1. mintasorozat: szecskázott szénák és a 2. mintasorozat örleménye – az örleményekből két nagyságrenddel kisebb penészszámot tudunk kimutatni. Ezt az elhalást az örlés folyamán keletkező hő, tehát az örlemény felmelegedése okozhatta.

Ebben a résztémában együttműködnek: Dr. Mayer Zsuzsanna, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL) Institut für Hygiene und Toxikologie, Haid- und-Neu-Str. 9. 76131 Karlsruhe, igazgató: Prof. Dr. Wilhelm Holzapfel, témavezető: Dr. rer. nat. Priv. Doz. Rolf Geisen. Köszönet együttműködésükért és segítségükért.

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

➤ Hazai szénaminták feldolgozása alapján meghatároztuk a penészfertozottság terméktipikus értékét: ez 1×10^6 , ami a minőségi osztályokba soroláshoz, és a penész TKE-határértékek meghatározásához szükséges.

➤ A szénák penészflórájában, a toxinogének előfordulása független a penészfertozottság mértékétől.

➤ Penészek felszaporodása szénákon elsősorban a betároláskori víztartalomtól, jóval kevésbé a tárolási tér eRH értékétől és még kevésbé a hőmérséklettől függ.

➤ Az erjedési termékek közül a laktát alig, míg az acetát jelentősen gátolja mind a terméktipikus szénaflóra, mind a toxinogén *Aspergillus parasiticus* felszaporodását.

➤ A takarmányok penésszámának meghatározására előírt MSz ISO 7954 szabványtalaj szálastakarmányok vizsgálatára nem alkalmas, mert az esetek mintegy felében a *Mucor* túlnövése, mind a TKE leolvasását, mind a toxinogén telepek felismerését meggyújtja. Szénák mikológiai vizsgálatára a *Mucorales* elnyomása, a kielégítő telepnövekedés és a színes képletek elbírálhatósága szempontjából, az MSz ISO 7954 szabványösszetétel Dichloran inhibitor kiegészítéssel ajánlható.

➤ Szénák penészfertozottságának tájékoztató mikroszkópos értékelésére agarmátrixos Rose Bengal differenciál-festési eljárást dolgoztunk ki.

➤ A β -D-fruktofurazonidáz (invertáz) enzimprodukción-teszt - szénaminták esetében - csak három terméktipikus genus esetében ad jelentős reakciót eltérően a gabonák

toxinogén raktári genusaitól.

➤RT-PCR-rel az AllFun-Taq penész-specifikus primer segítségével kapott kópiaszám és a tenyésztéses (szabvány) módszerrel meghatározott TKE között az elovizsgálatban nem találtunk összefüggést, ezért az eljárás szénák vizsgálatára, ez idő szerint nem ajánlható.

6. ÖSSZEFOGLALÁS, SUMMARY

ÖSSZEFOGLALÁS

Hazai szénák penészfertőzöttségének vizsgálata és a vizsgálati módszerek fejlesztése

Takarmányozási gyakorlatunkra jellemző, hogy a termelőüzemek igyekeznek gondosan betartani az egyes állatfajok, korcsoportok, illetve a különböző hasznosítások szerint meghatározott táplálóanyag-, ill. energianormákat. A gazdaságok nagy része azonban, még csak részben foglalkozik takarmány-egészségügyi kérdésekkel, takarmány-higiéniával, aminek egyik oka, hogy a takarmányok mikrobiológiai minosítése hiányos és kevés illetve nincsenek hivatalos határértékek.

Általában megállapítható, hogy az üzemekben kevés a jó minőségű széna. Ezt a megállapítást igazolják a táplálóanyag-tartalomra vonatkozó vizsgálati eredmények és a szenzorikusan megállapított penészesesség. Sajnos a penészgombák jelenlétére, ez idáig, csak a küllemi vizsgálat hívja fel a figyelmet. A szemestermények esetében a mikológiai vizsgálat szerves része a takarmány minőségmeghatározásának. Ismertek a gaborákon élő gombafajok, a toxinogén fajok jelenléte, és meghatározták a penészs szám határértéket is. Mivel a szénafélék mikológiai jellemzői, mind a flóra összetételében, mind a penészs szám nagyságrendjében eltérnek a szemesektől és egyéb takarmányoktól, és mivel nem fektetünk kellő hangsúlyt a szénák laboratóriumi vizsgálatára, a szénák egészséges mivolta gyakran kétséges.

Az irodalmi áttekintésben a szalastakarmányok mikrobiológiai vizsgálati módszereit és minosítését hasonlítottam össze itthon és külföldön. Röviden áttekintettem a szénák minőségét befolyásoló tényezőket. Ezt követően a szénákon élő penészgombákat és toxinjait mutattam be. Ezt követte a penészgombák tömeges felszaporodásáért felelős fizikai és kémiai tényezők hatásait értékelő irodalom bemutatása. Végül a penészvizsgálati módszerek témakörében készített munkák közül ismertettem az általam fellelteteket.

Dolgozatomban összefoglaltam a szalastakarmányok mikológiai vizsgálatával, és a vizsgálati módszerek fejlesztésére ill. a szálas takarmányokra adaptálására való törekvéseimmel kapcsolatos eredményeket.

Elsodleges céloom volt kiinduló vizsgálatként a hazai szénák mikológiai felmérése. A természetes körülmények között található penészszámból, és a penészflóra összetételéből, következtetést vontam le a szénák ún. terméktipikus penészszáma és flóraösszetételére. A felméro munkánk során begyujtott szénák leggyakrabban 10^5 , azaz százezres nagyságrendu penészszámot tartalmaztak grammonként. Ez alapján a szénák terméktipikus penészszámanak, ezen csoport felsó értékét tekinthetjuk, azaz 1×10^6 -t. Megállapítottam, hogy a toxinogén fajok elofordulása az össz-penészszámmal nincs összefüggésben. A szénák botanikai összetétele és a TKE értékek között szintén nem találtam összefüggést.

E mellett, laboratóriumi körülmények között is vizsgáltam a szénák penészesedését. Kísérletek alapján állapítottam meg, hogy a széna betakarításakor az egyes tényezok közül melyik felelos leginkább a penészedésért, vagyis a terméktipikus mikoflóra gradációjáért. Az erjedés során keletkezo savak hatását vizsgáltam a lekaszált zöldnövényen élo penészek növekedésére.

Megállapítható, hogy a penészgombák növekedését a szénákon, az első 8 nap alatt, a kaszáláskori és betakarítás kori nedvességtartalom határozza meg. A 8. nap után, a penészgombák növekedése már döntően a relatív páratartalomtól függ.

A magasabb hőmérséklet a penészgombák növekedését nem gyorsítja jelentősen.

Az erjedési termékek közül a laktát alig, míg az acetát teljesen gátolja a penészgombák felszaporodását.

A szemestakarmányok mikológiai vizsgálata során bevált módszerek gyakran nem működtek jól a szénaminták vizsgálatakor. Mivel a mikrobiológiai minosítés alapja a pontos, megbízható és gyors módszer, céloom volt a takarmányvizsgálati módszerek olyan továbbfejlesztése, amellyel a szénák mikológiai vizsgálata is problémamentes lehet.

– inhibitorral kiegészített, a telepek alaktani elbírálására alkalmasabb talajösszetélt kísérleteztem ki. Az eredmények alapján, az MSz ISO 7954 szabványtalaj, dichloran inhibitor kiegészítéssel ajánlható szénák penészfertőzöttségének vizsgálatára.

– az abraktakarmányok *Aspergillus* fertőzöttségének kimutatására kifejlesztett *Aspergillus*-invertáz teszt alkalmasságát vizsgáltam a szénák penészfertőzöttségének jelzésére. A szénákon élő penészgomba fajok közül csupán három genus esetében kaptunk pozitív reakciót. Mivel ezek a fajok nem tartoznak a „veszélyes” toxinogenek közé, az invertáz teszt nem tekinthető használhatónak szénák penészfertőzöttségének gyors megállapítására.

– mikroszkópos vizsgálat kapcsán kísérletet tettem olyan szelektív festési módszer kidolgozására, amely útján a penész eredetű képletek a széna szuszpenzióban előforduló más növényi és állati eredetű mikroképletektől könnyen megkülönböztethetők és számlálhatók is. Kidolgoztunk egy ún. agarmátrixos Rose Bengal differenciál-festési eljárást, amely alkalmas archiválható preparátumok készítésére. A differenciál festés, és a felvitt folyadékmennyiség ismeretében, a penészfertőzöttség mértékére jellemző spóraszám/gramm számítható ki, amely a TKE-vel szoros kapcsolatban van, másrészt a tétel előéletére nézve is jelzőértékű.

– a penészkimutatás vizsgálati idejének lerövidítésének reményében megvizsgáltam azt, hogy a penész-DNS kinyerése és RT-PCR módszer az All-funTaq gombaspecifikus primerrel mennyiben fut együtt a takarmányvizsgálatban általánosan autentikusnak elfogadott élocsírás TKE meghatározással. A szénaminták mikológiai állapotát, az AllFunTaq primerrel mért gomba 18S rDNS kópiaszám még tendenciaszerűen sem jelzi az organoleptikus minőséghez és az autentikusnak tekintett TKE-hez képest. Problémát okoz a gomba eredetű DNS kinyerése is. További metodikai fejlesztések nélkül, a PCR technika egyelőre szénák vizsgálatára nem ajánlható.

SUMMARY

Investigation on the mould contamination of hays in Hungary and development of methods for its evaluation

In order to attain optimal production level of farm animals, it is indispensable to supply the animals with forages rich in nutrients in intact, undamaged microbiological condition.

In general, the qualification of raw-materials for forages covers the following groups of characteristics:

- 1) Nutrient-content (can be calculated on the basis of chemical analysis: as digestible-, available-, net-, macro- and micro-components).
- 2) Undesirable substances (prohibited substances), toxic agents (of environmental origin, from processing), heavy metals, toxic chemicals, mycotoxins.
- 3) Factors causing deterioration of quality: such as microbiological conditions, mycotoxins, lipide oxidation.

In the process of official Hungarian microbiological feed evaluation, parameters for examination, typical values and limit values (at the time of compiling the dissertation) are stipulated by Appendix 2. 44/2003. (IV. 26) FVM (Ministry of Agriculture and Rural Development) decree. A major shortcoming of this decree is that it does not cover mould and yeast numbers and does not set limit values. Similarly, it ignores the qualification of roughages and forages.

In Hungarian practice hay have been classified exclusively according to their nutrient values (Tabulated data in Hungarian Feed Codex II.) so far. An objective system of qualification and related classification in terms of organoleptic properties (colour, smell, stem length, consistency) and primarily of the signs of microbiological decay have not been established.

If hays are qualified on the basis of their nutrient content exclusively and their microbiological properties are ignored, one can easily get misleading results in terms of their practical use.

The above mentioned situation served as the baseline for my research and objectives:

- **to characterize the mould flora of Hungarian hays**, to evaluate the quantified level of moulding in comparison to common sensory assessment. The goal of this examination was to identify the most frequent product typical flora elements and the product typical mould count (CFU) of average quality, and also to define the average (typical) quality in microbiological terms. The most frequent mould count in hays was 10^5 (27.6%), 10^6 (25%) and 10^4 (23.6%) /g. while 15.7% of the samples had the magnitude of 10^7 . Extremely high mould count of 10^8 occurred in 5.2%. The mathematical average of CFU counts was exactly 1.987×10^7 , which value did not reflect the typical (most common) mould count. Therefore the mathematical average is not suitable for the definition of typical contamination in hays.

On the basis of processed hay samples from Hungary we determined the product typical value of mould contamination: this is 1×10^6 . This is indispensable for classification by quality classes and for the determination of the CFU limit values for moulds.

- **to assess the toxicological risks of moulds on hay**. Mould flora was evaluated as regarding the occurrence of toxic genera in 60 samples. Out of them, *Aspergillus* species were found in 23 (38.3%) samples. 22 samples showed CFU values exceeding Pálffy's limit of III. class.

Penicillium species were detected in from 26 samples (43.3%). 24 samples were above, 2 samples were below the above limit. *Fusarium* species were detected in 23 samples (38.3%) and all their mould numbers exceeded the limit value. Therefore, in the sample evaluated to be "good" on the basis of the CFU values *Penicillium* or/and *Aspergillus* were found.

It can be concluded that the occurrence of toxinogens was not related to total mould count above or below the limit value.

- **to investigate the effects of certain factors in processing on the propagation of moulds**. The propagation kinetics of product typical mould flora was studied in moisture chambers of constant water activity., on grass samples of different water content (17.65, 37.5, 52.64%) at different relative humidity levels (75, 84, 95, 100%) and temperatures (15, 25°C). It can be concluded that the growth of mould fungi on hay is determined by the moisture content at cutting and harvest during the first 8 days of stor-

age. After day 8. the growth of mould fungi is depending on relative humidity of the atmosphere of the storage primarily. Higher temperature does not accelerate the growth of mould fungi considerably. Regarding the practical importance of haylage and the occurrence of secondary moulding after its release from storage, was examined the effects of acids and pH, which originate during fermentation, on the secondary aerobic propagation in product typical mould flora. As fermentation products, lactate fails to inhibit both the propagation of product-typical hay flora and toxinogenic *Aspergillus parasiticus*, while acetate inhibits them significantly.

- to adapt and develop experimental methods, adjusted to the special properties of hays.

- MSz ISO 7954, specified for the mould count determination of feed, is not suitable for forages as standard medium, since in about 50% of the cases the overgrowth of *Mucor* disturbs both the counting of CFU values and the recognition of toxinogenic colonies. MSz ISO 7954 standard composition with Dichlorane supplementation can be recommended for the mycological examination of hays with *Mucorales* suppression, satisfactory colony growth and well observable colors of the colonies.

- Selective staining method with Rose-Bengal in agar matrix was developed for the informative microscopic evaluation of mould contamination in hays.

- The -D-fructofurazonidase (invertase) test for enzyme production, in the case of hays, shows a significant reaction in only three product-typical genera, unlike to toxinogenic genera of storage specific moulds in corns.

- No correlation has been found between the copy number obtained with RT-PCR, All-Fun-Taq mould specific primer and the CFU determined by the standard method of cultivation.

As yet, this method can not be recommended as routine method of evaluation of hays.

7. MELLÉKLET

7.1. Fogalom meghatározások

Gradáció (mikróba-, penész-): bizonyos terméktipikus flóra-csoport vagy flóraelem rohamos nagytömege felszaporodása kedvező környezeti feltételek esetén

Mikoflóra: a takarmányon/ban élő és szaporodó eukarióta mikróbák (penészgombák, élesztők) összessége

Propagulum: az életképes penészspórák, és eltöredezett, de továbbnövekedésre képes hifa részek összessége.

Széna: szárítással konzervált zöldtakarmány

Terméktipikus mikoflóra: a termék – esetünkben széna – botanikai származására, fenofázisára, a tartósítás körülményeire és módjára jellemző mikroorganizmusok (penészek és élesztők) fajainak összessége (LUFA)

Terméktipikus penészsám: (tenyésztéssel meghatározott telepképző egységek, TKE száma a mintatömeg grammjára vonatkoztatva) (LUFA)

TKE, (CFU): a mintában tenyésztéssel kimutatott telepképző egységek (TKE), azaz az értékelt agarlemezeken ténylegesen megszámlált telepeknek a minta egy bizonyos tömegegységére vonatkoztatott száma. (Colony Forming Unit = CFU)

7.2. Kiegészítő táblázatok, leírások

11. táblázat A széna fobb terméktípusú penészfajainak invertáz-termelő képessége (µg glukóz / ml tenyészközeg, két párhuzamos tenyészcsoven, 10 fölött pozitív)

Penészfaj	24 óra	48 óra	72 óra
<i>Alternaria</i>	13 / 16	245* / 269*	290* / 296*
<i>Cladosporium</i>	10 / 10	15 / 15	157* / 44
<i>Fusarium</i>	1 / 0	0 / 0	2 / 2
<i>Nigrospora</i>	92 / 95	171 / 174	274 / 269
<i>Trichoderma</i>	7 / 7	0 / 2	5 / 5
<i>Trichothecium</i>	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Vak (kontroll)	0	0	0

(* szemmel látható micélium a tenyészközegben)

A DNS kivonása és izolálása a szénamintákból (kiegészítő leírás a 3.8. fejezethez)

Az elso mintasorozatból (42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 sz. minták) a DNS kivonást és izolálást, Mayer Zsuzsa, "Dneasy Plant Mini Kit"-tel (Quiagen, Hilden, Germany) végezte a következő lépésekben:

1. 100 mg mintaanyagot folyékony nitrogén közegbenben, mozsárban eldörzsölünk
2. a kit AP1 pufferjából 1200 µl-t adunk hozzá ezután 4 µl RNase A-t adunk hozzá
3. vortexelés
4. inkubálás 10 percig, 65 °C-on (közben 2-3-szor felrázás kézzel)
5. 390 µl AP2 puffert adunk hozzá
6. ezután 5 percig jég közé helyezzük
7. centrifugálás, 5 perc, 13000 ford/perc
8. a felülúszót a QI Ashredder oszlopra visszük fel
9. centrifugálás, 2 perc, 13000 ford/perc
10. a gyujtocsobol, a felülúszót eppendorfba visszük át (ca. 400 µl)
11. 1,5 térfogatnyi AP3/E puffert adunk hozzá, majd a pipettával azonnal felkeverjük
12. a minta felét Dneasy Mini oszlopra pipettázzuk
13. centrifugálás, 1 perc, 8000 ford/perc, az átfolyót elöntjük
14. a minta másik felét Dneasy Mini oszlopra pipettázzuk

15. centrifugálás, 1 perc, 8000 ford/perc, a gyűjtocsövet az átfolyással eldobjuk
16. az oszlopot új gyűjtocsobe helyezzük
17. 500µl AW puffert adunk hozzá
18. centrifugálás, 1 perc, 8000 ford/perc, az átfolyást elöntjük
19. 500µl AW puffert adunk hozzá
20. centrifugálás, 2 perc, 13000 ford/perc, száraz állapotig
21. a gyujtot az átfolyással eldobjuk
22. új Eppendorf oszlopra illesztjük
23. 100 µl 65 °C-os AE puffert pipetázzuk az oszlopra
24. 5 percig inkubálás szobahomérskleten
25. centrifugálás, 1 perc, 8000 ford/perc
26. 100 µl 65 °C-os AE puffert pipetázzunk az oszlopra
27. 5 percig inkubálás szobahomérskleten
28. centrifugálás, 1 perc, 8000 ford/perc
29. mintát azonnal továbbvinni vagy lefagyasztani

A **második mintasorozatból** (42, 43, 45, 47, 48, 48r, kvarchomokkal Fritsch "Pulverisette" 02.102 típusú achát-malomban dezintegrált) alkalmazott kivonás lépései:

1. 100 mg mintaanyagot folyékony nitrogénben mozsárban dörzsölünk el
2. 800 µl AP1 puffert és 4 µl RNase A-t adunk hozzá
3. vortexelés
4. 1 spatula alumíniumoxidot adunk hozzá
5. 30 percig Eppendorf rázatóba állítjuk
6. inkubálás 10 percig, 65 °C-on (közben 2-3-szor felrázás kézzel)
7. 260 µl AP2 puffert adunk hozzá
8. 5 percre jég közé állítjuk
9. centrifugálás, 5 percig, 13000 ford/perc
10. a felülúszót a QI Ashredder oszlopra pipetázzuk
11. centrifugálás, 2 perc, 13000 ford/perc.
12. a felülúszót a gyujtocsobol új Eppendorfba visszük át (ca. 400 µl)
13. 1,5 térfogatnyi AP3/E puffert adunk hozzá és a pipettával azonnal fölkeverjük
14. a minta felét a Dneasy Mini oszlopra visszük át

15. centrifugálás, 1 perc, 8000 ford/perc az átfolyót kiöntjük
16. a minta másik felét a Dneasy Mini oszlopra pipetázzuk
17. centrifugálás, 1 perc, 8000 ford/perc, a gyujtocsövet tartalmával eldobjuk
18. az oszlopot új gyujtocsobe állítjuk
19. 500µl AW puffert adunk hozzá
20. centrifugálás, 1 perc, 8000 ford/perc, az átfolyást elöntjük
21. 500µl AW puffert adunk hozzá
22. centrifugálás, 2 perc, 13000 ford/perc, a száraz állapotig
23. a gyujtocsövet az átfolyt anyaggal eldobjuk
24. az oszlopot új Eppendorfba helyezzük
25. 100 µl 65 °C-os AE puffert az oszlopra pipetázzuk
26. 5 percig inkubálás szobahomérsekleten
27. centrifugálás, 1 perc, 8000 ford/perc
28. 100 µl 65 °C-os AE puffert az oszlopra pipetázzuk
29. 5 percig inkubálás szobahomérsekleten
30. centrifugálás, 1 perc, 8000 ford/perc
31. mintát azonnal továbbvinni vagy lefagyasztani

Az utolsó mosási lépés után a DNS eluálását 130 µl desztillált vízzel hajtjuk végre. Az így kapott DNS oldat 1 µl-ét használjuk a Real-Time PCR reakciókban.

8. IRODALOMJEGYZÉK

ANTONY, M. - SHUKLA, Y. - JANARDHANAN, K.K. (2002): Protective effect of tenuazonic acid against dimethyl benz(a)anthracene-induced skin carcinogenesis in mice. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 22(4). 309-314. p.

ASHOOR, S.H. - CHU, F.S. (1973a): Inhibition of alcohol and lactic acid dehydrogenase by patulin and penicillic acid *in vitro*. *Food Cosmet. Toxicol.* 11. 617-624. p.

ASHOOR, S.H. - CHU, F.S. (1973b): Inhibition of muscle by penicillic acid and patulin *in vitro*. *Food Cosmet. Toxicol.* 11. 995-1000. p.

BAINTNER K. (1963): Állattenyésztési enciklopédia I. Gazdasági állatok takarmányozása. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 379. p.

BAINTER K. (1967): Gazdasági állatok takarmányozása 2., Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 24. p., 229-232 p.

BATA Á. - DRASKOVICS I. - ETTER L. - KOUDELA SZ. - NOVÁK E.K. - SÁNDOR G. - SZIGETI G. - TÉREN J. - VÁNYI Á. (1990): Mikotoxinok, toxinogén gombák, mikotoxikózisok. MÉTE Kiadó, Budapest

BATA Á. - HARRACH B. - VÁNYI A. - LEPOM P. (1988): Macrocyclic trichothecene toxins produced by *Stachybotrys atra*. *Acta Vet. Hung.* 36. (3-4). 221-227. p.

BLASER, P. (1978): Comparison of methods for quantitative detection of moulds in foods. I. Selective staining procedures for direct microscopic mould count. *Zentralbl. Bakteriol.* 166. 45-62. p.

BLASER, P. (1978a): Comparison of methods for quantitative detection of moulds in foods. II. Communication: Effect of homogenisation conditions on mould plate count. Zentralbl. Bakteriol. (Orig B). 166. (4-5). 443-453. p.

BLASER, P. (1978b): Comparison of methods for quantitative detection of moulds in foods. III. Comparison of different culture media for the mould plate count. Zentralbl. Bakteriol. (Orig B). 167. (1-2). 146-164. p.

BLOOMQUIST, C. - DAVIDSON, J.N. - PEARSON, E.G. (1982): Zearalenone toxicosis in prepubertal dairy heifers. J. Am. Vet. Med. Assoc. 180. 164-165. p.

BOTHAST, R.J. - FENNEL, D.I. (1974): A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus parasiticus* and related organisms. Mycologia. 66. 365-369. p.

BRODSKY, M.H.P. - ENTIS, M.P. - ENTIS, A. - JARVIS, A. (1982): Determination of aerobic plate and yeast and mould counts in foods using an automated hydrophobic grid membrane filter technique. J. Food Prot. 45 301-304. p.

BULLERMAN, L.B. - WEST, D.I. (1990): Comparison of several media and methods for detecting and enumeration toxigenic *Fusarium* species. Proc. 2nd Int. Works. Standard Meth. Mycol. Exam Foods. August 20-24, Baarn, The Netherlands, 25-26 p.

CAMGUILHEM, M.G. - ESCOULA, L. - HENRZ, M. (1976): Toxines de *Byssochlamys nivea* Westling. I. Etude preliminaire de la toxicite chez le mouton. Ann. Rech. Vet. 7. 177-183. p.

CASTELLA, G. - BRAGULAT, M.R. - RUBIALES, M.V. - CABANES, F.J. (1997): Development of a selective culture medium for *Fusarium moniliforme*. Microbiologia. 13(4). 493-498. p.

CHARMLEY, E. - TRENHOLM, H.L. - THOMPSON, B.K. - VUDATHALA, D. - NICHOLSON, J.W.G. - PRELUSKY, D.B. - CHARMLEY, L.L. (1993): Influence of

deoxinivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. J. Dairy Sci. 76. 3580-3587. p.

CHATTERJEE, K. - PAWLOSKEY, R.J. - TREEFUL, L. - MIROCHA, C.J. (1986): Kinetic study of T-2 toxin metabolites in a cow. J. Food Saf. 8. 25-34. p.

CONNER, D.E. (1990): Evaluation methods for selective enumeration of *Fusarium* spp. Proc. 2nd Int. Works. Standard Meth. Mycol. Exam Foods. August 20-24, Baarn, The Netherlands, 26. p.

COONEY, D.G. - EMERSON, R. (1964). Thermophilic Fungi: An Account of their Biology, Activities, and Classification. S.W.H. Freeman and Co., San Francisco

COTE, L.M. - DAHLEM, A.M. - YOSHIZAWA, T. - SWANSOS, S.P. - BUCK, W.B. (1986): Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 69. 2416-2423. p.

DAILEY, R.E. - BROUWER, E. - BLASCHKA, A.M. - REYNALDO, E.F. - GREEN, S. - MONLUX, W.S. - RUGGLES, D.I. (1977b): Intermediate-duration toxicity study of patulin in rats. J. Toxicol. Environ. Health 2. 713-725. p.

DAKIN, J.C. (1974): The validity of the Howard Mould Count as a means of assessing the quality of tomato puree-a review. Food Trade Review. 34. (41). 44-69. p.

DAMS, E. - HENDRIKS, L. - VAN DE PEER, Z. - NEEFS, J.M. - SMITS, G., VANDENBEMT, I. - DE WACHTER, R. (1988): Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Res. 16. 87-173. p.

DANKÓ GY. (1972): A szarvasmarha stachybotryotoxikózisának hazai előfordulása. Magyar Állatorvosok Lapja. 241-249. p.

DANKÓ, GY. (1976): A Stahybotrykózis kórtana. Kandidátusi értekezés. DATE, Debrecen, 79-83. p.

DELITSCH, H. (1943): Systematik der Schimmelpilze. In: LEMKE A. (Ed.): Ergebnisse der theoretischen und angewandten Mikrobiologie, Bd I. Neumann, Neudamm.

DÖRNER L. (1955): A különböző eljárásokkal készült lucernaszénák szárítás közben fellépő változások és a kész szénák összehasonlítása. Állattenyésztés. 2. 169-180. p.

DROCHNER, W. (1990): Aktuelle Aspekte zur Wirkung von Phytohormonen, Mykotoxinen und ausgewählten schädlichen Pflanzeninhaltsstoffen auf die Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind. Übers. Tierernährg. 18. 177-196. p.

ERASMUSON, A.F. - SCAHILL, B.G. - WEST, D.M. (1994): Natural zearanol (alpha-zearalanol) in the urine of pasture-fed animals. J. Agric. Food Chem. 42. 2721-2725. p.

FAZEKAS B. (1998): A kukorica fumonizin-B1 és fuzariotoxin szennyezettsége, fumonizin-mikotoxikózisok. Ph. D értekezés. Kaposvári Egyetem, Állattenyésztési tudományok Doktori Iskola

FOSTER, J.W. (1949). Chemical Activities of Fungi. Academic Press, New York

FRISVAD, J.C. (1983): A selective and indicative medium for groups of *Penicillium viridicatum* producing different mycotoxins in cereals. J. Appl. Bacteriol. 54(3). 409-416. p.

FRISVAD, J. - FILTENBORG, O. (1989): Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. Mycologia 81. 837-861. p.

FRISVAD, J.C. - SAMSON, R.A. (1991): Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: J. CHELKOWSKI (ed.), Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Elsevier, Amsterdam, 441-476 .p.

FREUDENBERG, S. - FASOLD, K.I. - MÜLLER S.R. - SIEDENBERG. D. - KRETZMER, G. - SCHÜGERL, K. - GIUSEPPIN, M. (1996): Fluorescent microscopic investigation of *Aspergillus awamori* growing on synthetic and complex media and producing xylanase. J. Biotechnol. 46. 265-273. p.

GILL, C.O. - LOWRY, P.D. (1982): Growth at sub-zero temperatures of black spot fungi from meat. J. Appl. Bacteriol. 52. 245-250. p.

GOLDING, N.S. (1945): The gas requirements of moulds. IV. A preliminary interpretation of the growth rates of four common mold cultures on the basis of absorbed gases. J. Dairy. Sci. 28. 737-750. p.

GOTO, S. – TAKAYAMA, K. – SHINOHARA, T. (1989): Effect of temperature, water activity and the vapor of ethanol and acid on growth of wine cellar molds. J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 24. 1-6. p.

GOURAMA, H. - BULLERMAN, L.B. (1995): Detection of Molds in Feeds Potential Rapid and Selective Methods. Journal of Food Prot. 12. 1389-1394. p.

GRANT, C. – HUNTER, C.A. – FLANNIGAN, B. – BRAVERY, A.F. (1989): The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. Internat Biodeter. 25. 259-284 p.

GURUNG, N.K. – RANKINS, D.L. - SHELBY, R.A. - GOEL, S. (1998): Effects of fumonisin B1- contaminated feeds on weanling angora goats. J. Anim. Sci. 76. 2863-2870. p.

HALL, L.A. – DENNING, D.W. (1994): Oxygen requirements of *Aspergillus* species, J. Med. Microbiol. Vol. 41. Issue 5. 311-315. p.

HAMSA, T.A.P. - AYRES, J.C. (1977): A differential medium of *Aspergillus parasiticus* from cottonseed. J. Food Sci. 42. 449-453. p.

HAWKER, L.E. (1950): Physiology of Fungi. University of London Press, Warwick Square, London

HE, P. - YOUNG, L.G. - FORSBERG, C. (1992): Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). Appl. Environ. Microbiol. 58. 3857-3863. p.

HEDMAN, R. - PETTERSSON, H. (1997): Transformation of nivalenol by gastrointestinal microbes. Archives of animal nutrition. 50. 321-329. p.

HEROLD I. (1994): Az új takarmányértékelési rendszer, Egyetemi jegyzet, Debrecen, Debreceni Agrártudományi Egyetem Nyomda üzeme

HIETANEN, P. (1985): Temperature raise in hay and its microbiology-growth factors of microbes causing farmer's lung disease. University of Helsinki, Department of Plant Pathology. Report 13. Helsinki, 43 p.

HOCKING, A.D. (1989): Responses of fungi to modified atmospheres. In: Fumigation and Controlled Atmosphere Storage of Grain: Proc . Int. Conf. Singapore, 14-18 February (Edited by Champ, B.R et al.), ACIAR Proceedings. 25. 70-82. p.

HOWARD, B.J. (1911): Tomato kechup under the microscope with practical suggestions to insure a cleany product. US Department of Agriculture, Bureau of Chemistr., Circular No. 68.

HSU, I.C. - SMALLEY, E.B. - STRONG, F.M. - RIBELIN, W.E. (1972): Identification of T-2 toxin in mouldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. Appl. Microbiol. 24. 684-690. p.

INGALLS, J.R. (1996): Influence of deoxynivalenol on feed consumption by dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol. 60. 297-300. p.

JARVIS, B. (1973): Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in foods. J. Appl. Bacteriol. 36. 723-727. p.

JARVIS, B. (1977): A chemical method for the estimation of mould in tomato products. *Journal of Food Technology*. 12. 581-591. p.

JARVIS, B. - STAHLY, G. D. - PAVANASASIVAM, G. - MAZZOLA, E. P. (1980): Antileukemic compounds derived from the chemical modification of macrocyclic trichotecenes 1. Derivatives of verrucaric acid. *J. Med. Chem.* 23. 1054-1058. p.

JARVIS, B. - WILLIAMS, A.P. (1987): Methods for detecting fungi in foods and beverages. In: BEUCHAT L.R. (Ed.): *Food and beverage mycology* 2nd ed. AVI Publishing Co., New York, 599-635. p.

JOFFE, A.Z. (1962): Biological properties of some toxic fungi isolated from overwintered cereals. *Mycopathologia*. 10. 16. 201-221. p.

JUHÁSZ A. (2000): Az akridinnarancs fluoreszcens festék alkalmazása a metabolikus aktivitás vizsgálatára. Diplomamunka. Debreceni Egyetem Természettudományi Kar, 18. p.

KAKUK T. - SCHMIDT J. (1988): *Takarmányozástan*. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest. 575 p.

KALLELA, K. - VASENIUS, L. (1982): The effects of rumen fluid on the content of zearalenone in animal fodder. *Nord. Vet. Med.* 31. 336-339. p.

KARUNARATNE, A. - BULLERMAN, L.B. (1990): Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. *J. Food. Prot.* 53. 227-229. p.

KARY, M. (1993): <http://www.karymullis.com> (2005. szeptember 05.)

KENNEDY, D.G. - HEWITT, S.A. - MCEVOY, J.D.G. - CURRIE, J.W. - CANNAN, A. - BLANCHFLOWER, W.J. - ELLIOT, C.T. (1998): Zearalenone is formed from *Fusarium* spp. Toxins in cattle in vivo. *Food Addit. Contam.* 15. 393-400. p.

KESHRI, G. - MAGAN, N. (2000): Detection and differentiation between mycotoxigenic and nonmycotoxigenic strains of two *Fusarium* spp. using volatile production profiles and hydrolytic enzymes. J. Appl. Microbiology. 89. 825-833. p.

KIESSLING, K.H. - PETTERSSON, H. - SANDHOLM, K. - OLSEN, M. (1984): Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 47. 1070-1073. p.

KING, A.D. - HOCKING, A.D. - PITT, J.I. (1979): Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. Appl. Environ. Microbiol. 37. 959-964. p.

KING, R.R. - MCQUEEN, R.E. - LEVESQUE, D. - GREENHALGH, R. (1984): Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. J. Agric. Food Chem. 32. 1181-1183. p.

KISKÓ G. - SZEGMAN H. - FARKAS J. (1997): Application of the DEFT and MEM techniques as rapid methods for screening mycological quality of spices. Acta Alimentaria. 26. (1). 47-56. p.

KISKÓ G. (1998): Fűszerek penész-szennyezettségének vizsgálata gyors módszerekkel. Doktori Értekezés. Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi kar, Hűto- és Állatitermék Technológia Tanszék

KISS G. - RADVÁNYI Sz. - SZIGETI G. (1995): Gombás borbetegségek laboratóriumi diagnosztikája. Kisállatorvoslás. 5. 256-264. p.

KISS I. (1978): Mikrobiológiai vizsgálati módszerek az élelmiszeriparban, Mezogazdasági Kiadó, Budapest. 52-53. p.

KNIGHT, M.T. – NEWMAN, M.C. – BENZINGER, M.J – NEUFANG, K.L. – AGIN, J.R. (1977): Comparison of the Petrifilm Dry Rehydratable Film and Conventional Culture Methods for Enumeration of Yeasts and Molds in Foods: Collaborative Study.

J. AOAC Int. 80. (4). 806-811. p.

KRIESEL, H. (1988): Zur Bestimmung des Begriffs „Schimmelpilze”. Zbl Mikrobiol. 143. 263-267.p.

KROGH, P. - HALD, B. - PLESTINA, R. - CEOVIC, S. (1977): Balkan (endemic) nephrotoxic and foodborne ochratoxin A: Preliminary results of foodstuff. Acta Pathol. Microbiol. Scan. Section B85. 283. p.

KURELEC V. (1956): A réti szénák emészthető fehérjetartalmának megállapítása. Állattenyésztés és Takarmányozás. 4. 341-349. p.

LESTER, R. V. (2000): Evaluating hay quality. On line publikations. University of Maryland at College Park, USA

<http://www.agnr.umd.edu/MCE/Publications/Publication.cfm?ID=110> (2005.június 27.)

LORINCZNÉ I.G. (1998): A repce kórokozói és az ellenük való védekezés lehetőségei. Gyakorlati Agrofórum. 9. 8. 21-22. p.

MAGAN, N. (1993): Early detection of fungal spoilage in grain. International Biodeterioration and Biodegradation. 32. 145-160. p.

MAGAN, N. - CAYLEY, G. R. - LACEY, J. (1984): Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. Appl. Environ. Microbiol. 47. (5). 1113-1117. p.

MAGAN, N. - LACEY, J. (1984): Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 84. 71-81 p.

MARÁZ A. (2001) Eukariota mikroorganizmusok, gombák. In: Általános mikrobiológia. Szerk. PESTI M., Budapest-Pécs, Dialóg Campus Kiadó. 215-220. p.

MÁTRAI T. - MAYER ZS. - KÓKAI ZS. - SALAMON I. (2000): Invertase production of common storage moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. of Food Microbiol.* 61. 187-191. p.

MÁTRAI T. - RAFAI P. - VARGA J. (2003): Mikotoxin határértékek a takarmánykeverékekben. (MTA-Állásfoglalás). *Állattenyésztés és Takarmányozás.* 52. 4. 293-296. p.

MATSUOKA, H. - YANG, H.C. - HOMMA, T. - NEMOTO, Y. - YAMADA, S. - SUMITA, O. - TAKATORI, K. - KURATA, H. (1995): Use of congo red as a microscopic fluorescence indicator of hyphal growth. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43. 102-108. p.

MAYER ZS. (2002): A penészgomba kimutatás korszerű lehetőségei élelmiszerekből és takarmányokból. Ph. D. értekezés. Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar

MIETTINEN, H. - ORANEN, H. (1994): Metabolism of zearalenone by rumen fluid. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 3. 202. p.

MIROCHA, C.J. - HARRISON, J. - NICHOLS, A.A. - MCCINTOCK, M. (1968): Detection of fungal estrogen (f-2) in hay associated with infertility in dairy cattle. *Appl. Microbiol.* 16. 797-798. p.

MIROCHA, C.J. - SCHAUERHAMER, B. - PATHRE, S.V. (1974): Isolation, detection and quantitation of zearalenone in maize and barley. *J. Assoc. Off. Anal.Chem.* 57. (5). 1104-1110. p.

MIROCHA, C.J. - PATHRE, S.V. - ROBISON, T.S. (1981): Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19. 25-30. p.

MISLIVEC, P.B. - TUIITE, J. (1970): Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from Yellow dent corn. *Mycologia.* 62. 75-88. p.

MOLARD, D.R. (1984): A selective medium for *Fusarium* species. In: KING A.D., PITT J.I. - BEUCHAT L.R. - CORRY J.E.L. (Eds.): Methods for the mycological examination of food. NATO ASI Series. Plenum Press, New York, 142. p.

MSz ISO 7954 - Magyar Szabvány - Mikrobiológia - Általános útmutató élesztők és penészek számlálásához – Telepszámlálási technika 25 °C-on

MULLER, M. (1992): Toxin-producing ability of the genus *Alternaria*. Zentralbl Mikrobiol. 147. (3-4). 207-213. p.

MUNGER, C.E. - IVIE, C.W. - CHRISTOFER, R.J. - HAMMOCK, B.D. - PHILLIPS, T.D. (1987): Acetylation/Deacetylation reactions of T2, acetyl T2, HT-2, and acetyl HT-2 toxins in bovine rumen fluid *in vitro*. J. Agric. Food. Chem. 35. 354-358. p.

NIKULIN, M. - PASANEN, A.L. - BERG, S. - HINTIKKA, E.L. (1994): *Stachybotrys atra* growth and toxin production in some building material and fodder under different relative humidities. Appl. Environ. Microbiol. 60. 3421-3424. p.

NOLLER, C.H. - STOB, M. - TUIITE, J. (1979): Effects of feeding *Giberella zaeae*-infected corn on feed intake, body weight gain, and milk production of dairy cows. J Dairy Sci. 62. 1003-1006. p.

NYIREDI I. - BODNÁR M. (1966):. Vizsgálatok a hazai abraktakarmányokban az *Aspergillus flavus* elofordulására és a törzsek aflatoxinképzésére. Magyar Állatorvosok Lapja. 21. 352-354. p.

OFFEM, J.O. - DART, R.K. (1983): Rapid determination of spoilage fungi. J. Chromatogr. 260. (1). 109-113. p.

OLSEN, M. (1989): Metabolism of zearalenone in farm animals. In: CHELOWSKI, J. (Ed.) *Fusariummycotoxins, taxonomy, pathogenicity*. Elsevier, Amsterdam, Vol. 2. 167-177. p.

OSWEILER, G.D. - KEHRLI, M.E. - STABEL, J.R. - ROSS, P.F. - WILSON, T.M. (1993): Effects of fumonisin- contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. J. Anim. Sci. 71. 459-466. p.

PANASENKO, V.T. (1967). Ecology of microfungi. Botanical Review. 33. 189-215. p.

PATEL, O. - WILLIAMS, A.P. (1985): A note on the estimation of food spoilage yeasts by measurement of ATP after growth at various temperatures. J. Appl. Bacteriol. 59. 133-136. p.

PÁLFY K.K. - KUPAI J. (1986): Egészséges takarmányt az üzembe! Mezogazd. Kiadó. Budapest

PETTIPHER, G.L. - RODRIGUES, U.M. (1982): Rapid enumeration of microorganisms in food by direct epifluorescent filter technique. Appl. Environ. Microbiol. 44. (4). 809-813. p.

PETTIPHER, G.L. - WILLIAMS, R.A. - GUTTERIDGE, C.S. (1985): An evaluation of possible alternative methods to the Howard Mould Count. Letters in Applied Microbiology. 1. 49-51. p.

PIER, A.C. - RICHARD, J.L. - CYSEWSKI, S.J. (1980): Implications of mycotoxins in animal disease. J. Am. Vet. Med. Assoc. 176. 719-724. p.

PITCHARD, R.C. - MUIR, D.B. (1987): Black fungi: a survey of dematiaceous hyphomycetes from clinical specimens identified over a five year period in a reference laboratory. Pathology. 19. 281-284. p.

PITT, J.I. - HOCKING, A.D. - GLENN, D.P. (1983): An improved medium for the detection of *Aspergillus parasiticus*. J. Appl. Bacteriol. 54. 109-114. p.

PITT, J.I. (1990): Collaborative study on media for the detection and differentiation of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and the detection of aflatoxin production. Proc. 2nd

Int. Works. Standard Meth. Mycol. Exam Foods. August 20-24, Baarn, The Netherlands, 28 .p.

PITT, J.I. - HOCKING, A.D. (1997): Fungi and Food Spoilage. Plenum US.

PRELUSKY, D.B. - VEIRA, D.M. - TRENHOLM, H.L. - FOSTER, B.C. (1987b): Metabolic fate and elimination in milk, urine and bile of deoxynivalenol following administration to lactating sheep. J. Environ. Sci. Health. B 22. 125-148. p.

PRIESTLEY, R.H. - KNIGHT, C. (1985): Diseases of Oilseed Rape and Fodder Brassicals. National Institute of Agricultural Botany, Cambridge.

RIBELIN, W. E. - FUKUSHIMA, K. - STILL, P. E. (1978): The toxicity of ochratoxin to ruminants. Can. J Comp Med. 42. (2). 127-136. p.

ROINE, K. - KORPINEN, E.L. - KALLELA, K. (1971): Mycotoxicosis as a probable cause of infertility in dairy cows. A case report. Nord. Vet. Med. 23. 628-633. p.

SEITZ, L.M. - MOHR, H.E. - BURROUGHS, R. - SAUER, B. (1977): Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. Cereal Chem. 54. 1207-1217. p.

SCHIEFER, H.B. (1990): Mycotoxicoses of domestic animals and their diagnosis. Can. J. Physiol. Pharmacol. 68, 987-990. p.

SCHUH, M. (1981): Klinische Auswirkungen der in Östereich vorkommenden Mycotoxine. Wien. Tierärztl. Mschr. 68. 308-312. p.

SCHUH, M. (1983): The importance of fusariotoxicosis in austrian domestic animals. Proc. 5th Intern. Conference on Production Diseases in Farm Animals. 10.-12. August 1983, Uppsala, 390-394. p.

SELLYEY G. (1978): Az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok toxinvizsgálatának indoklása. Hazai mikotoxin-vizsgálatok. MÉTE, Budapest, 187. p.

SODERHALL, K. - SVENSSON, E. - UNESTAN, T. (1978): Light inhibits the production of alternariol and alternariol monomethyl ether in *Alternaria alternata*. Appl. Environ. Microbiol. 36.(5).655-657. p.

SÖDERSTRÖM, B. E. (1977): Vitality of fungi in pure cultures and soil with fluorescein diacetate. Soil. Biol. Biochem. 9. 59-63. p.

SPANGENBERG, D.S. - INGHAM, S.C. (2000): Comparison of Methods for Enumeration of Yeasts and Molds in Shredded Low-Moisture, Part-Skim Mozzarella Cheese. J. Food Prot. 63. (4). 529-533. p.

STANNARD, C.J. (1987): ATP estimation. In: ADAMS M.R. - HOPE C.F.A. (Eds.): Rapid methods in food microbiology. Elsevier, New York

SZIGETI G. (1997): A állategészségügyi jelentőségű gombák (Az állatorvosi mikológia alapjai), Europharma, Budapest

SZUCSNÉ PÉTER J. (2000): A fuzilázskészítés és takarmányozás új aspektusai. A takarmányozás jelene és jövője az ezredforduló küszöbén. Takarmányozástani Tudományos Napok. Budapest. 32-40 p.

SWANSON, S.P. - HELASZEK, C. - BOOCK, W.B. - ROOD, H.D. - HASCHEK, W.M. (1988): The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. Fd. Chem. Toxic. 26. 823-829. p.

THRANE, U. - FITTENBORG, O. - FRISVAD, J.C. - LUND, F. (1990): Methods for detection and identification of toxigenic *Fusarium* Species. Proc. 2nd Int. Works. Standard Meth. Mycol. Exam Foods. August 20-24, Baarn, The Netherlands, 28-29. p.

VALENTA, H. - VEMMER, H. (1996): In vitro Untersuchungen zum Metabolismus von Zearalenon bei Inkubation mit Pansensaft. Proc. 18. Mykotoxin Workshop, 10-12. Juni 1996, Kulmbach, Hrsg. Garines, M. - Scheuer, R. 185-191. p.

VÁMOSI J. (1971): Lucernabetakarítás és tartósítás. Magyar Mezőgazdaság. 19. 9-11. p.

VÁNYI A. (1990): Haszonállatok mikotoxikózisai. In: Mikotoxinok, toxinogén gombák, mikotoxikózisok. Szerk. TÉREN J.- DRASKOVICS I. - NOVÁK E.K., MÉTE Kiadó, Budapest, 154. p.

VÁNYI A. - SZEMEREDI G. - QUARINI, L. - ROMVARYNE, S.E. (1974): Fusariotoxicosis egy szarvasmarha-állományban. Magyar Állatorvosok Lapja. 29. 544-546. p.

VÁNYI A - TIMÁR I. - SZÉKY A. (1980): Fusariotoxikózisok. IX. Az F-2 fusariotoxin (zearalenon) hatása kosok és bikák spermiogenezisére. Magyar Állatorvosok Lapja. 35. 777-780. p.

VAS K. - CSONTOS É.(1956): A hidratúra méréséről és jelentőségéről. Agrokémia és Talajtan. 5. 4. 411-425. p.

WEAVER, G.A. - KURTZ, H.T. - BEHRENS, J.C. - ROBISON, T.S. - SEGUIN, B.E. - BATES, F.Y. - MIROCHA, J.C. (1986a): Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. Am. J. Vet. Res. 47. 1395-1397. p.

WEAVER, G.A. - KURTZ, H.T. - BEHRENS, J.C. - ROBISON, T.S. - SEGUIN, B.E. - BATES, F.Y. - MIROCHA, J.C. (1986b): Effect of zearalenone on dairy cows. Am. J. Vet. Res. 47. 659-662. p.

WESTLAKE, K. - MACKIE, R.I. - DUTTON, F. (1987a): Effects of several mycotoxins on specific growth rate of *butyrivibrio fibrisolvens* and toxin degradation *in vitro*. Appl. Environ. Microbiol. 53. 613-614. p.

WESTLAKE, K. - MACKIE, R.I. - DUTTON, F. (1987b): T-2 toxin metabolism by ruminal bacteria and its effect on their growth. Appl. Environ. Microbiol. 53. 587-592. p.

WEETE, J.D. (1980): Lipid biochemistry of fungi and other organism. Plenum Press, New York

WILLIAMS, P.H. (1992): Biology of *Leptosphaeria maculans*. Can. Journ. Plant. Pathol. 14. 30-35. p.

YOSHIZAWA, T. - COTE, L.-N. - SWANSON, S.P. - BUCK, W.B. (1986): Confirmation of DOM-1, a de-epoxidation metabolite of deoxynivalenol, in biological fluids of lactating cows. Agric. Biol. Chem. 50. 227-229. p.

YOSHIZAWA, T. - MIROCHA, C.J. - BEHRENS, J.C. - SWANSON, S.P. (1981): Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. Fd. Cosmet. Toxicol. 19. 31-39.p.

ZIPKES, M.R. - GILCHREST, J.E. - PEELER, J.T. (1981): Comparison of yeast and moulds counts by spiral, pour and streak plate methods. J. AOAC Int. 64. 1465-1469. p.

Tudományos közlemények jegyzéke

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

SIPICZKI, B.; MÁTRAI, T.; KÓKAI, Zs. (2003): Szénák penészfertőzöttsége és a penészedést befolyásoló tényezők kísérletes vizsgálata. Állattenyésztés és Takarmányozás 2003. 52. 1. 69-76 (Studies of mould contamination of hays and experiments assessing influencing factors of spoilage processes)

SIPICZKI Bojana (2003): Kísérletek szálastakarmányok penészfertőzöttségének minősítő vizsgálatára alkalmas táptalajösszetétel kialakítására. Acta Agraria Debreceniensis, Agrártudományi Közlemények 10, 34-38. (Studies on the Suitability of Different Mould Media Compositions for the Mycological Evaluation of Hay Samples)

SIPICZKI, B.; KÓKAI, Zs.; MÁTRAI, T (2004): Erjedési savak gátló hatása a kukorica és a széna terméktipikus penészflórájának valamint az *Aspergillus parasiticus* növekedésére. Állattenyésztés és Takarmányozás 2004. 54. 6.

SIPICZKI, B.; KÓKAI, Zs.; MÁTRAI, T: A takarmányok penészfertőzöttségének gyors kimutatására használható invertáz-teszt és alkalmazhatósága szénákon. Állattenyésztés és takarmányozás (közlésre elfogadva, 2006. január 16.)

ELOADÁSOK ÉS POSZTEREK NEMZETKÖZI RENDEZVÉNYEKEN

SIPICZKI, B.; MAYER, Zs.; MÁTRAI, T. (2001): Assesment of Microbiological Stability of Feeds and Forages in Constant Water Activity (A(w)) Moisture Chambers. Timisoara's Academical Days, Temesvár, 2001. május

MÁTRAI, T.; MAYER, Zs.; SIPICZKI, B. (2001): Constant Water Activity Chambers for laboratory Using Saturated Solutions os Inorganic Crystals. Anual Conference of European Feed Microbiologists, Ljubljana, 2001. június

SIPICZKI, B.; MAYER, Zs.; MÁTRAI, T. (2001): Constant Water Activity (A(w)) Moisture Chambers as Tools in Measuring Aerobic Storability of Feed, 52nd Ann. Meeting of European Association for Animal Production (EAAP), Budapest, N6.11.

SIPICZKI, B.; MÁTRAI, T.; KÓKAI, Zs. (2002): Szénák penészfertőzöttségének felmérése és a penészedés körülményeinek laboratóriumi modellezése. Innováció, a tudomány és a gyakorlat egysége az ezredforduló agráriumban. Nemzetközi konferencia, Debrecen-Gödöllo, 2002. április 11-12.

ELOADÁSOK ÉS POSZTEREK HAZAI RENDEZVÉNYEKEN

SIPICZKI, B.; MAYER, Zs.; MÁTRAI, T. (2001): Penészgombák elofordulása szénákon és felszaporodásuk különböző vízakaktivitásokon pára kamrákban. Az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság Jubileumi Nagygyulése. Balatonfüred, 2001.

SIPICZKI Bojana (2002): A széna-mikológia aktuális feladatai. Takarmányozástani Tanszékek és Osztályok Országos Találkozója. Kaposvár, 2002. június 20-21.

SIPICZKI Bojana (2002): Kísérletek szálastakarmányok penészfertőzöttségének minősítő vizsgálatára alkalmas táptalajösszetétel kialakítására, Debreceni Tudományos Napok 2002, „Tudósjelöltek a mezőgazdaságban”, Debrecen

SIPICZKI, B.; MÁTRAI, T.; KÓKAI, Zs. (2003): Laktát és acetát hatása szénák terméktipikus penészflórájának és az aflatoxinogén *Asp. parasiticus* szaporodására. Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak, Mikrobiológia és Biotechnológia Szekció, 2003. november 6-7, Budapest

SIPICZKI, B.; MÁTRAI, T.; KÓKAI, Zs. (2003): A laktát és acetát ionok hatása a takarmányok terméktipikus penészeinek felszaporodására, Tudományos Napok, Debrecen, 2003. november 15-20.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

SIPICZKI, B.; MAYER, Zs.; MÁTRAI, T. (2001): Constant Water Activity (A(w)) Moisture Chambers as Tools in Measuring Aerobic Storability of Feed, Book of Abstract of the 52nd Conference of European Association for Animal Production (EAAP), Budapest, N6.11. p.130.

SIPICZKI, B.; MAYER, Zs.; MÁTRAI, T. (2001): Penészgombák előfordulása szénákon és felszaporodásuk különböző vízáktívításokon pára kamrákban. Az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság Jubileumi Nagygyűlése. Balatonfüred, p. 145.

SIPICZKI, B.; MÁTRAI, T.; KÓKAI, Zs. (2003): Laktát és acetát hatása szénák terméktipikus penészflórájának és az aflatoxinogén *Asp. parasiticus* szaporodására. Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak, Mikrobiológia és Biotechnológia Szekció, p. 158.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Gundel János professzor Úrnak, aki mint téma-vezetom szakmai útmutatásával és kritikai észrevételeivel segített dolgozatom elkészítésében.

Köszönettel és hálával tartozom Dr. Mátrai Tibornak, az ÁTK Mikrobiológia Laboratórium nyugalmazott vezetőjének, aki a takarmánymikológia területén mérhetetlen szakmai tudásával segítette munkámat.

Köszönöm Kókai Zsuzsa az ÁTK Mikrobiológia Laboratórium vezetőjének és Salamon Irén technikusnak, hogy a mindennapos laboratóriumi munkában mindig számíthattam rájuk.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Mayer Zsuzsának, aki nagy segítségemre volt a PCR technika alkalmazásában.

Köszönöm Dr. Mihók Sándor tanszékvezető Úrnak, a DE AC Állattenyésztés- és Takarmányozástani Tanszéknek, és a herceghalmi Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet vezetésének a témám iránt tanúsított támogatást.

NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum Mezőgazdaságtudományi Karán, az Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem ATC MTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 200.....

.....
a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Sipiczki Bojana Nóra doktorjelölt, 1999 – 2006. között, a fent megnevezett Doktori Iskola keretében, irányításommal – irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom – javasoljuk.

Debrecen,

.....
a témavezető aláírása