

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**MIKOTOXIN ELIMINÁCIÓ SILÓ ÉS ÉLELMISZERIPARI
EREDETŰ MIKROORGANIZMUSOKKAL**

Adácsi Cintia

Témavezető: Dr. Pusztahelyi Tünde



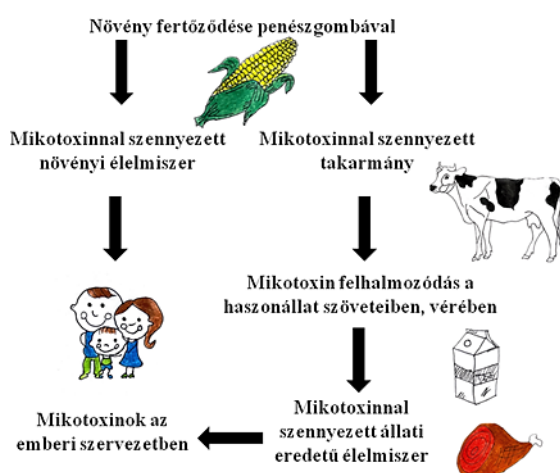
DEBRECENI EGYETEM

Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2024

1. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

Az egyes gombák által termelt mikotoxinok emberre és állatra egyaránt veszélyesek, az élelmiszerben és takarmányban történő előfordulásuk miatt biológiai veszélyt jelentenek. A mikotoxinok az élelmiszerlánc minden lépésénél megtalálhatók, képesek áthaladni a táplálékpiramis különböző szintjein. A mikotoxinok bekerülése az élelmiszerláncba egyszerű: a gabonafélék révén direkt módon, és közvetve is kerül mikotoxin az emberi szervezetbe (1. ábra). Negatív hatásaik a mezőgazdasági haszonnövény alapú termékek fogyasztásával, illetve a mikotoxinnal szennyezett állati takarmány révén, és az állati termékek fogyasztásával közvetítve az emberben közvetlenül kimutathatók. A mikotoxinnal szennyezett állati eredetű ételek, az aflatoxin M1 (AFM1) tartalmú tej és tejtermék, és a húsban felhalmozódott ochratoxin A (OTA) az emberi szervezet egészségét veszélyeztetik.



1. ábra Mikotoxinok az élelmiszerláncban (saját szerkesztés)

A doktori értekezésem célja, hogy kiemelje a biológiai detoxifikáció értékét, a baktériumok hasznosíthatóságát ezekben a folyamatokban.

Dolgozatomban célul tűztem ki magam elé:

- a fermentált takarmányok mikrobiológiai állapotának (össz mikrobaszám, tejsavbaktérium (LAB), penészgomba, és mezofil szulfitredukáló *Clostridium* szám) meghatározása,
- a fermentált takarmányok mikotoxin szennyezettségének kimutatása HPLC (High Performance Liquid Chromatography, nagynyomású folyadékkromatográfia) módszerrel,

- magas mikotoxin rezisztenciával, és eliminációval rendelkező baktériumok izolálását, jellemzését,
- izolált baktériumok 16S rRNS alapú, és MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization coupled to time-of-flight mass spectrometry, mátrixszal segített lézer deszorpciós ionizációval kapcsolt tömegspektrometria) módszerrel történő azonosítását,
- silótakarmány és tejipari eredetű organizmusok (élő, és bakteriális sejtfrakciók) mikotoxin eliminációs képességének vizsgálatát HPLC és ELISA (enzyme linked immunosorbent assay, enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálat) módszerrel, a lehetséges jövőbeli alkalmazás szempontjából,
- általam begyűjtött kukorica növényből szilázs készítését, mikotoxin elimináció tesztelése céljából.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Felhasznált anyagok

A vizsgált erjesztett takarmányminták az alábbiak voltak: kukorica szilázs, rozs szilázs, rozs szenázs, lucerna szilázs, lucerna szenázs, tritikálé szenázs (2019-2020-ban Magyarországon, Hajdú-Bihar vármegye tejelő szarvasmarha telepeiről), (Adácsi és mtsai, 2022a).

A nyerstej minták random különböző telepekről származtak. 100 ml nyerstej került begyűjtésre a tartálykocsikról az Alföldi Tej Kft. (Debrecen) átvevő helyén. A tejminták beszállítása hűtve történt.

A *Lactiplantibacillus plantarum* NCAIM B01074 törzset a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (MATE Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet) biztosította.

A *Lactococcus lactis ssp. lactis* R703, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12, *L. paracasei ssp. paracasei* 431 (Chr. Hansen A/S, Dánia) törzseket MRS táplevesben (Scharlau, Németország) tenyésztettem 24 órán át 30 °C-on. A baktériumtenyészeteket 6100 g-n (centripetális gyorsulás) 10 percig (4 °C) steril körülmények között centrifugáltam, hogy eltávolítsam a felülúszót. Az összegyűjtött biomasszát PBS-sel (phosphate-buffered saline; foszfát-pufferelt sóoldat) (Sigma-Aldrich) átmostam, és 100

ul-es aliquot részekben Eppendorf-csővekbe osztottam a kezelésekhez. A sejtkoncentráció 10^9 TKE/ml volt. Az aliquot részeket -18°C -on tároltam.

Az in vitro szilázkészítéshez felhasznált kukorica növény a DE MÉK Bemutatókertben termesztett Sy Orpheus kukorica volt, a termesztésében a DE MÉK Precíziós Növénytermesztési Kutatás-fejlesztési Szolgáltató Központ segített.

2.2. Mikrobiológiai analízis

100 g szilázs mintát steril homogenizáló Stomacher zsákokban, 1:9 arányban szuszpendáltam pufferolt peptonvízben (BPW) (Scharlab, Barcelona, Spanyolország), és Stomacher homogenizátorral (IUL Instruments, Barcelona, Spanyolország) homogenizáltam. Majd a szuszpenziókból további decimális hígításokat készítettem.

A teljes mikrobaszámot Plate Count Agar (PCA) (Scharlab, Barcelona, Spanyolország) táptalajon határoztam meg lemezöntéses módszerrel, mélyöntéses eljárással. Az inkubálás 30°C -on 3 napig, aerob vagy anaerob körülmények között (ISO 4833-1: 2013) történt. Az anaerob tér biztosításához Oxoid™ AnaeroGen™ 2.5 L tasakot (Thermo Scientific™) anaerob edényben (Anaerocult, Merck) használtam.

A LAB-ok számát De Mann-Rogosa-Sharp (MRS) agar (Scharlab) lemezeken határoztam meg felületi szélesztéses módszerrel, és inkubáltam a lemezeket 30°C -on anaerob körülmények között, 3 napig.

A penészgombákat felületi szélesztéses módszerrel határoztam meg kloramfenikol-glükóz -agar (CGA) (Scharlab) táptalajon, amelyet 25°C -on inkubáltam öt napon keresztül.

A szulfátredukáló *Clostridium* számot Vas-Szulfit-Agar (Scharlab) táptalajon határoztam meg mélyöntéses eljárással. A szilárd tápközeget 37°C -on 3 napig anaerob módon inkubáltam.

2.3. Mikotoxin kimutatás

2.3.1. Mikotoxin kimutatás HPLC módszerrel

A HPLC mérésekhez Biopure mikotoxin standard oldatokat (Romer Labs, Tulln, Ausztria) alkalmaztam megfelelő hígításban. A minták előkészítése VICAM (Waters) történt, némi módosítással.

A DON HPLC kimutatását Hitachi Elit LaChrom HPLC (San Jose, CA, USA) készüléken végeztem. Phenomenex (Torrance, CA, USA) RP-C18 oszlopot (125x4 mm, 5 µm) használtam, diódasoros (DAD) detektorral detektáltam UV 218 nm-en acetonitril: víz (10:90) eluenssel.

A DON mikotoxin eliminációs vizsgálatnál a dezoxinivalenol méréshez a szűrt felülúszó mintákat mértem.

A DON szilázsból történő kimutatásához 12,5 g szárított mintát homogenizáltam 2,5 g polietilén glikollal (VWR International Kft., Magyarország) és 50 ml desztillált vízzel, nagy sebességű keverés közben. Szűrés után 1 ml kivonatot töltöttem a DON immunaffinitás oszlopra (VICAM DONtest HPLC oszlop, Weber Consulting Kft.). Az oszlopot egymás után 5 ml desztillált vízzel és 5 ml metanollal mostam, hogy az oszlopról a toxint eluálni tudjam. A metanolt Rotadest-en (Büchi) párologtattam el a mintákból.

Az AF és az OTA HPLC kimutatását Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) berendezéssel (Adácsi és mtsai, 2022a) végeztem. Az AF kimutatásához Phenomenex (Torrance, CA, USA) RP-C18 oszlopot (150 x 4.6 mm, 5 µm) használtam, Romer UV származékképző egységgel (Romer Labs Ltd., Tulln, Austria), és fluoreszcencia detektorral (ex360 nm, em440 nm), metanol: víz (45:55) eluenssel. Az OTA kimutatásához Phenomenex RP-C18 oszlopot (150*4,6 mm, 5 µm) használtam fluoreszcencia detektorral, (ex360 nm, em440 nm), acetonitril: 0,012 M Na-foszfát pH 7,5 (60:40) eluenssel.

Az AFB1 mikotoxin eliminációs vizsgálatnál a metanollal 1:1 arányban kevert, nagy sebességgel vortexelt mintát mértem.

Az AF és az OTA szilázsból történő kimutatásához 25 g szárított mintát 2,5 g nátrium-kloriddal (VWR) és 50 ml 80% -os metanollal (HPLC, Sigma-Aldrich) nagy sebességű keverés közben homogenizáltam. Az extraktumot 1:4 arányban hígítottam desztillált vízzel. A hígított kivonatot leszűrtem, és 10 ml-t az AF immunaffinitás oszlopra (VICAM AflaTest HPLC oszlopok, Weber Consulting Kft.) vagy az ochratoxin immunaffinitás oszlopra (VICAM OchraTest WB HPLC oszlop, Weber Consulting Kft.) töltöttem. Az oszlopot 10 ml desztillált vízzel mostam, és a toxint 5 ml metanollal eluáltam.

A ZEA HPLC kimutatását Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) berendezéssel (Adácsi és mstai, 2022b) szerint végeztem. Phenomenex (Torrance, CA, USA) RP-C18

oszlopot (150 x 4,6 mm, 5 μ m) fluoreszcencia detektorral (ex274 nm, em440 nm) használtam, acetonitril-víz-metanol (46: 46:8) eluenssel.

A ZEA-nak kitett mintákban a felülúszók és a pellett mikotokointartalmát is megmértem. A felülúszókat metanollal kezeltem 1:1 arányban, és nagy sebességgel vortexeltem. A pellet adszorbeált ZEA-t acetonitril-víz-metanol (46:46:8) keverékkel extraháltam ZearalaTestTM (VICAM, Watertown, USA).

A ZEA HPLC méréséhez 20 g szárított mintát homogenizáltam 2 g nátrium-kloriddal (VWR, Magyarország) és 50 ml 90% -os acetonitrillel (HPLC, Sigma-Aldrich), nagy sebességű keverés közben. Az extraktumot 1:4 arányban hígítottam desztillált vízzel. A hígított kivonatot leszűrtem, és 10 ml-t a ZEA immunaffinitás oszlopra töltöttem (VICAM ZearalaTest WB HPLC oszlop, Weber Consulting Kft.). Az oszlopot 10 ml desztillált vízzel mostam, és a toxint 5 ml metanollal eluáltam.

Az alkalmazott HPLC-módszerek teljesítményét, LOD értékét, lineáris tartományát és reprodukálhatóságát szárított és őrölt kukoricaszilázs különböző koncentrációjú mikotoxinokkal történő szennyezésével határoztam meg (n = 8). A lineáris tartományokat 300 μ g/kg-ig találtam az AFB1 és az OTA esetében, míg a DON és a ZEA esetében 50 mg/kg-ig terjedő linearitást mutattam ki. A relatív szórást a variációs együttható abszolút értékeként számítottam ki, és minden esetben 10% alatt találtam.

2.3.2. Mikotoxin kimutatás ELISA rendszerben

Az AFM1 kimutatását direkt kompetitív ELISA segítségével hajtottam végre (Aflatoxin M1 High Sensitivity ELISA; Romer Labs, Tulln, Ausztria). A referencia sort és a zsírtalanított tejet a mikrotiter lemez vájataiba pipettáztam. Ezt követően 45 perces inkubálás következett. Az inkubálási idő leteltével, eltávolítottam a lyukakból a folyadékot, és Wash Solution Pufferrel mostam. Majd az Aflatoxin M1 High Sensitivity Conjugate (M1 Antitest) felvitele történt. 15 perces inkubálási idő elteltével, újabb mosási lépések után, az M1 szubsztrát felvitele következett. Ezután újabb 15 perces inkubálást követően, már nem végeztem mosást, hanem Stop Solution hozzáadása következett, így leállítottam az enzimreakciót. Ezt követően Synergy HTX Multimode Reader (BioTek) segítségével 450 nm-en mértem a mintákat (n = 4, CV% \leq 5%).

2.4. Baktériumtörzsek izolálása, majd MALDI-TOF MS és 16S rRNS alapú azonosítása

31 baktérium izolátumot gyűjtöttem erjesztett takarmány mintákról. A teljes mikrobaszám (PCA), valamint a LAB szám (MRS agar) meghatározásánál használt lemezekről egyedi telepek kioltása, majd újraoltása történt, tiszta tenyészet létrehozása céljából. Az izolátumokat -76 °C -on tároltam glicerolban, és gyöngyön (Cryoinstant Blue 50 Cryotubes Preservation system, VWR). Az izolátumokat MRS (Scharlab), illetve Nutrient Broth (Scharlab, Barcelona, Spain) táplevesben vizsgáltam a továbbiakban.

Az izolált baktériumokat MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonik GmbH, Németország) segítségével Zudorné dr. Dombrádi Zsuzsanna Rita (Debreceni Egyetem, DE Klinikai Központ (DEKK), Egészségügyi Szolgáltató Egységek, Diagnosztikai Egységek, Orvosi Mikrobiológia) azonosította. Egyedi telepeket elemeztünk a Biotyper 3.0 szoftverrel (Bruker Daltonik GmbH, Németország) és annak 3.1.2 verziójú referenciakönyvtárával.

A genomi DNS izolálására alkalmazott DNS extrakciós protokoll (Wilson, 2001) a következő volt: 16 órás tenyészetből $200\ \mu\text{l}$ -t összekevertem $1000\ \mu\text{l}$ CTAB (Biochemica) lízis pufferrel {2% w/v Cetrimonium bromid CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 8,0} (Applichem GmbH, Darmstadt, Németország), majd 30 percig, 65 °C -on inkubáltam. Ezt követően a mintát 2 ml-es Lysing Matrix B (MP Biomedicals Germany GmbH, Schwege, Németország) feltárócsövekbe tettem. A gyöngy alapú lízist 20 másodpercig, 4000 g-n (centripetális gyorsulás) fordulatszámon, Precellys 24 homogenizálóval (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Németország) végeztem, majd 10 perc 18600 g (centripetális gyorsulás) centrifugálás következett. $600\ \mu\text{l}$ felülúszóhoz $240\ \mu\text{l}$ kloroformot adtam, 30 másodpercig kevertem, 20 percig centrifugáltam, 18600 g (centripetális gyorsulás) alkalmazásával. $400\ \mu\text{l}$ felső vizes fázist $400\ \mu\text{l}$ izo-propanollal kevertem, majd 10 percig 18600 g (centripetális gyorsulás) alkalmazásával centrifugáltam. A felülúszó leöntését követően $500\ \mu\text{l}$ 70% etanolt adtam hozzá, majd 10 percig 18600 g (centripetális gyorsulás) alkalmazásával centrifugáltam. A felülúszó leöntését követően 2 perc 18600 g (centripetális gyorsulás) centrifugálás következett, és a cső alján összegyűlt folyadékot kisméretű pipettával eltávolítottam, és a pelletet szobahőmérsékleten száradni hagytam. A száraz DNS pelletet $500\ \mu\text{l}$ steril vízben szuszpendáltam.

A DNS tisztítási protokoll során a DNS-kivonatot Amicon Ultra membránon (Merck Millipore, Darmstadt, Németország) tisztítottam meg. Az Amicon Ultra szűrőeszközbe 500 µl genomi DNS kivonatot pipettáztam, majd 10 percig 18600 g (centripetális gyorsulás) alkalmazásával centrifugáltam. Mosási lépésként 480 µl vizet adtam hozzá és 10 perc, 18600 g (centripetális gyorsulás) centrifugálás következett. Az Amicon Ultra szűrőeszközt megfordítva egy tiszta mikrocentrifuga csőbe helyezve, 2 perc 1000 g-n (centripetális gyorsulás) történt a centrifugálás, majd a koncentrált minta átkerült az eszközből a csőbe. 20 µl vízzel feltöltve megkaptam a tisztított DNS kivonatot, amit 4 °C hőmérsékleten tároltam.

A PCR reakciót iProof High-Fidelity PCR Kit-el (BIO-RAD Ltd., Hercules, CA, USA Litvánia) végeztem. A genomi DNS-t a polimeráz lánreakció templátjaként használtam. A reakcióhoz 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) és 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') primereket használtam (Pradhan és Tamang, 2019). Steril PCR csövekbe 4 µl 5xiProof HF Buffer, 0,4 µl dNTP mix-et, 2 µl forward, és 2 µl reverse primert, 1 µl DNS templátot, 10,4 µl desztillált vizet, 0,2 µl iProof DNS Polymerázt pipettáztam, így a végső térfogat 20 µl lett. A PCR-t 98 °C-on 3 percig végeztem; ezt követően 98 °C-on 30 másodpercig, 54 °C-on 30 másodpercig, 72 °C-on 45 másodpercig 30 cikluson keresztül és 72 °C-on 7 percig T100-as hőcikluson (T100 Thermal Cycler, BIO-RAD Ltd., Litvánia) tartottam.

A DNS tisztítása Nucleo SpinGel and PCR Clean up Column (Macherey-Nagel, Düren, Németország) segítségével történt a gyártó által meghatározott protokoll szerint. 0,8%-os BIOLINE agaróz (Meridian Life Science, Memphis, Tennessee, USA) gélt öntöttem, amely az alábbiakat tartalmazza: 50x TAE puffer, desztillált víz. A gél zsebeibe 10 µl DNS mintát vittem fel. A lemért steril Eppendorf csőbe beletettem a kivágott gél darabot, majd lemértem. Minden 100 mg agaróz gélhez 200 µl puffer NTI-t adtam. Majd a mintát inkubáltam 5-10 percig 50 °C-on. A Nucleo SpinGel and PCR Clean up Column-be betöltöttem a mintát, 30 másodpercig 11000 g fordulatszámon centrifugáltam, majd az átfolyást eltávolítottam. Hozzáadtam 700 µl NT3 puffert az oszlophoz, és centrifugáltam 30 másodpercig, 11000 g-n, majd az átfolyást kidobtam, és megismételtem a mosási lépést. Centrifugáltam 1 percig 11000g fordulatszámon, majd kidobtam az átfolyást, hogy eltávolítsam a puffer NT3-at. Majd az oszlopot egy új Eppendorf csőbe helyeztem, 3x20 µl 70 °C-os NE puffert tettem rá, 5 percig 70 °C-on

tartottam, ezt követően centrifugáltam 30-50 g fordulatszámon 1 percig, majd 11000 g fordulatszámon 1 percig.

A PCR termékek szekvenálását a BIOMI Kft. (Gödöllő, Magyarország) végezte. A szekvenciákat National Library of Medicine at the National Center for Biotechnological Information (NCBI) nyújtottam be, OP183257-OP183263 nyilvántartási számon.

2.5. Baktériumok mikotoxin rezisztenciája

Minden rezisztencia vizsgálathoz Biopure mikotoxin oldatokat (Romer Labs, Tulln, Ausztria) alkalmaztam megfelelő hígításban. Az izolátumokat LAB-ok esetében MRS tápvelesbe (Scharlab) más baktériumok esetében Nutrient tápvelesbe (Scharlab) oltottam, és 16 órán át 30 °C-on inkubáltam, hogy exponenciális fázisú tenyészeteket kapjak. Az 200 µl MRS táptalajjal vagy Nutrient Broth-val készült mikrotiterlemez oltottam, hogy kis sűrűségű tenyészetet kapjak (0,1-0,2 OD_{630nm}). A tenyészetekhez különböző koncentrációban mikotoxint adtam (AFM1: 0-1,47 µg/L; AFB1: 24-50-100 µg/L; OTA: 50-1000 µg/L; DON: 700 -1000 µg/L; ZEA: 100-200-500 µg/L). A baktériumokat 24 óráig inkubáltam a mikotoxinokkal 30 °C-on mikrotiterlemez-leolvasóban (Synergy HTX Multimode Reader, BioTek), és az optikai denzitást óránként leolvastam 630 nm-en intenzív rázás után (30 mp). A kezeletlen (mikotoxinok nélküli) tenyészetek növekedési görbáját összehasonlítottam a mikotoxinnal kezelt tenyészetekkel (n = 4). A végső százalékos értéket a 24. óras eredményből határoztam meg. A növekedési adatok elemzését Gen5 3.05 szoftverben dolgoztam fel (Bio-Tek) és Microsoft Excel Analízis ToolPac Pearson's t próba ($p \leq 0,05$) segítségével.

2.6. Bakteriális sejtfrakciók készítése

A baktériumtörzsekből előállított pelleteket különböző vegyszerekkel kezeltem (Niderkorn és mtsai; 2009; Goh és mtsai, 2009), mely során különféle frakciókat kaptam (1. táblázat).

1. táblázat: Különböző kezelések, és az általuk létrehozott baktériumpreparátumok (Niderkorn és mtsai, 2009; Goh és mtsai, 2009)

Kezelés	Preparátum
H ₂ O 100 °C, 15 perc	sejttörmelék
2% w/v nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 100 °C, 15 perc	sejtfal frakció
10% w/v triklórecetsav (TCA) 100 °C, 15 perc	peptidoglükán (PG) frakció
1 M LiCl 100 °C, 15 perc	S-réteg fehérje
1 M HCl 100 °C, 15 perc	teicholsav frakció

2.7. Baktériumok mikotoxin eliminációs képességének vizsgálata

A mikotoxinokat (BIOPURE, Romer Labs, Tulln, Ausztria) pufferelt PBS-el hígítottam, és az alábbi koncentrációkban adtam hozzá az élő baktériumsejtekhez, és a különböző baktériumpreparátumokhoz: AFB1-24 µg/l, AFM1-1,47 µg/l, DON-700 µg/l, ZEA-100 µg/l, OTA-1000 µg/l.

Minden mikotoxinnal kiegészített mintát PBS-ben inkubáltam 1 órán át, 25 °C -on, rázatással (6 g), ezt követően centrifugáltam (6100 g, 10 perc, 4 °C), a felülúszókat eltávolítottam, és HPLC-vel analizáltam, a 2.3.1. fejezetben leírtak szerint. Minden vizsgálatot három párhuzamosban végeztem, pozitív (sejtek, vagy sejtfalfrakciók nélkül) és negatív (mikotoxin nélkül) kontrollokat is alkalmaztam.

2.8. Észteráz aktivitás

Castillo és munkatársai (1999) módszere alapján, a reakcióelegy 800 µl 50 mM Tris-HCl puffert (pH 7.5), 100 µl p-nitrofenil butirátot (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) tartalmazott szubsztrátként (8,1 mM acetonban), és a 100 µl lizált (Precellys 24 Homogenizer, Peqlab Biotechnologie Ltd., Erlangen, Németország) és PBS-el mosott sejttörmelék, vagy a hőkezelt sejtfalfrakció mintákat. Az enzimaktivitást p-nitrofenolként detektáltam 10 perc 37 °C-os inkubálás után (346 nm). Az észteráz aktivitást percenként felszabaduló p-nitrofenilben fejeztem ki.

2.9. Szilázs készítés

A szecskezott nedves kukorica növényt 0,1 v/v% hangyasavval kezeltem, és *Fusarium* mikotoxin tartalmú kukorica referencia minta (Quality Control Material Deoxynivalenol in corn, Biopure, Quality Control Material Zearalenone in corn, BIOPURE, Romer Labs, Tulln, Ausztria) bekeverésével a végkoncentráció 0,7 mg/kg DON, és 0,01 mg/kg ZEA lett. Beoltott törzsként *Lactiplantibacillus plantarum* NCAIM B01074 16 órás tenyésztete lett használva. Összesen négyféle összetételű szilázs lett készítve: kontroll, mikotoxinnal szennyezett, mikotoxinnal szennyezett és baktériummal beoltott, illetve csak baktériummal beoltott. A különböző összetételű kukorica (nyersen ~350 g) növényt műanyag dobozokban, légmentesen becsomagolva, szobahőmérsékleten, 4 hétig, folyamatos nyomás alatt tartottam. A fermentáció végén szárazanyag, pH, illósav tartalom, és mikotoxin tartalom került meghatározásra.

2.10. Száraztömeg meghatározás

Az erjesztett takarmánymintákat (kukorica, lucerna, rozs) vagy a kukoricát három párhuzamosban szárítottam (60 °C±1 °C) szárítószekrényben (UN55, Memmert GmbH, Németország). Szárítás előtt és után a minták tömegét lemértem, amiből száraztömeget számítottam (n = 3; a CV%, a variációs koefficiens ≤ 10%). A variációs koefficiens a párhuzamosan mért értékek standard deviációjának és átlagának hányadosa százalékos formában kifejezve és megegyezik a relatív szórással. $RSD = 100 * S / M$, ahol az S a standard deviáció, M a számtani átlag. A szárítás tömegállandóságig történt (ISO 6496, 1999).

2.11. pH érték meghatározás

Az elkészült szilázs minták kiperéselt levének pH mérése automata pH mérő berendezéssel (pH1100L; VWR Interational Kft.) történt (n = 3, CV% ≤ 10%).

2.12. Tejsav- és illósav tartalom meghatározása

A szilázs minták tejsav tartalmának meghatározása HPLC-DAD módszerrel történt. 50 g szilázs mintát egy Erlenmeyer-lombikba mértem, majd 300 ml víz hozzáadása után parafilmmel lezártam, majd 4 °C-on tároltam. A minta szűrése redős szűrőpapír, majd 0,45 µm-es Spartan fecskendőszűrő (Merck) segítségével történt. A mintához Phenomenex (Torrance, CA, USA) RP-C18 oszlopot (125*4 mm, 5 µm) DAD detektorral használtam UV 218 nm-en, acetonitril: víz (10:90) eluenssel.

Az illósav tartalom meghatározásához 50 g szilázs mintát egy Erlenmeyer-lombikba mértem, 300 ml 1 v/v%-os foszforsav oldat hozzáadása után parafilmmel lezártam, majd 4 °C-on tároltam egy éjszakán át. Szűrést követően, (redős szűrőpapír, majd 0,45 µm-es Spartan fecskendőszűrő), az alábbi komponensek meghatározása történt gázkromatográfia segítségével, melyet Békési Ádám (DE MÉK Agrárműszerközpont) mért: ecetsav, propionsav, i-vajsav, n-vajsav, n-vajsav, i-valeriánsav, n-valeriánsav, i-kaprónsav, n-kaprónsav, heptánsav. A standard Fatty Acid Methyl Esters (FAME) mix volt (Sigma-Aldrich) LOD= 0,002 m/m%, n = 3.

2.13. Statisztikai analízis

A korrelációs elemzést a Microsoft Excel adatelemző ToolPac programban végeztem. A növekedési adat elemzéseket Gen5 3.05 szoftverben (BioTec) és Microsoft Excel Analysis Tool-Pac-ban végeztem, ahol t-próbát ($p \leq 0,05$) végeztem a szignifikanciaelemzéshez.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Az ipari erjesztett takarmányminták jellemzése

Az erjesztett takarmányok száraz tömege 19% és 71% között mozgott.

A mintákban főként DON szennyeződést mértem, és a koncentrációtartomány meglehetősen széles volt, 0,100 mg/kg és 3,254 mg/kg között. A DON általi átlagos szennyeződés kukoricaszilázsban $0,901 \pm 0,012$ mg/kg volt. Más mikotoxinokat is kimutattam, és AFB1-et és AFG2-t, és bizonyos esetekben a ZEA-t is mértem a fermentált takarmányokban. Az erjesztett lucerna termékekben az OTA, és az AF szennyezés jellemző volt mind a szilázs, mind a szenázs mintákban, és a szilázsban a DON is kimutatható volt.

A tritikálé szenázs mintákat alacsony mikotoxintartalom mellett viszonylag magas LAB szám jellemezte ($2,5-5,3 \log_{10}$ TKE/g). A fermentált takarmányok mikrobaszáma nagyon változó volt, mivel az összes aerob telepszám logaritmusos értéke $3,265$ és $7,254 \log_{10}$ TKE/g között mozgott. Az MRS agar táptalajból származó telepszámok logaritmusos értéke $1,778$ és $6,167 \log_{10}$ TKE/g között volt. A fermentált takarmányok összes telepszáma szoros kapcsolatban volt a többnyire LAB-okat tenyésztő MRS agar telepszámaival, mivel a korrelációs együttható $0,848$ volt, ami erős pozitív korrelációt mutatott.

Mezofil szulfiteduláló *Clostridium*-ok számban változóan voltak jelen a mintákban (1-5,4 log₁₀ TKE/g), és számuk nem korrelált sem az összes mikrobaszámmal, sem a LAB számmal. A legtöbb mintát alacsony penészs szám jellemezte (1 log₁₀ TKE/g), de néhány minta magas penészszenyeződést (3,00 - 6,079 log₁₀ TKE/g) tartalmazott. A magas penészszenyeződés semmilyen esetben sem mutatott összefüggést a magas mikotoxintartalommal. A LAB-oknak csak nagyon gyenge negatív korrelációja volt a mikotoxinokkal (AF: -0,360; OTA: -0,336).

A végső összes mikrobaszám nagyrészt LAB-ból állt, és életképes sejtszámuk nem függött a takarmány végső víztartalmától, mivel a korrelációs együttható csak 0,219 volt a fermentált takarmányok nedvességtartalma (29-81%) és az életképes LAB szám között.

3.2. Erjesztett takarmány eredetű izolált baktériumok azonosítása

A MALDI-TOF MS-sel azonosított baktériumok: kukoricaszilázsban a *Lactiplantibacillus plantarum*, a lucerna szilázsban a *Lactiplantibacillus pentosus* míg a rozsszilázs- és szenázsmintákban a *Pediococcus*-ok. Az aerob spóráképző baktériumok egy részét (pl. *Lysinibacillus spp.*, *Rummeliibacillus spp.* és *Bacillus spp.*), valamint egy enterobaktériumot, a *Klebsiella pneumoniae*-t is izoláltam.

16S rRNS génszekvenciák segítségével történő azonosítás: *Rummeliibacillus suwonensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus boronitolerans*, *Lysinibacillus fusiformis*. A *Rummeliibacillus suwonensis* (*Planococcaceae*) kivételével minden izolátum a *Bacillaceae* családba tartozott (Vos és mtsai, 2011; Federhen, 2015; Schoch és mtsai, 2020).

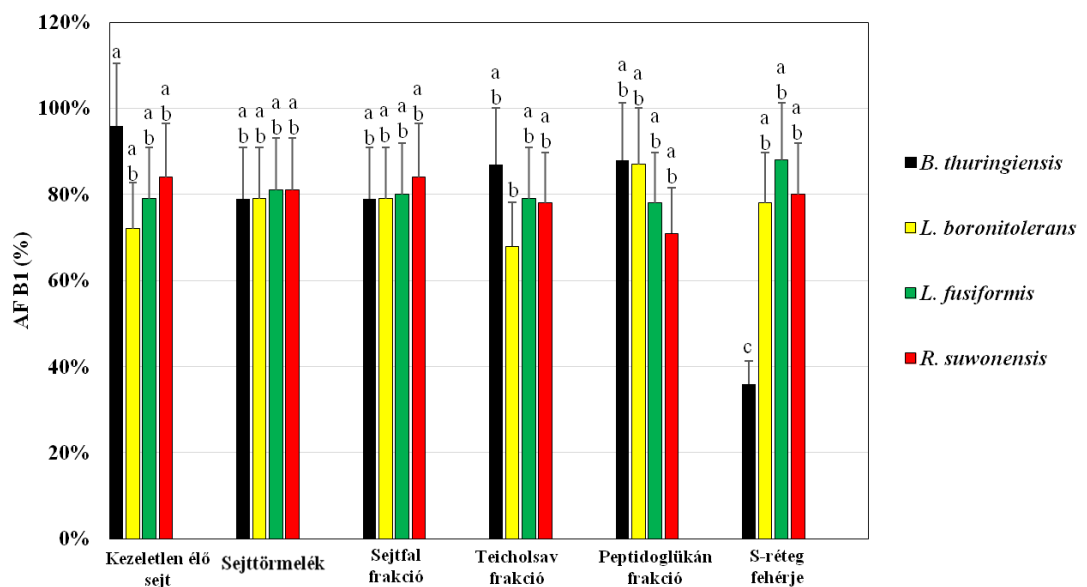
3.3. Erjesztett takarmány eredetű izolált baktériumok mikotoxin rezisztenciája

A DON (1000 µg/l) és a ZEA (500 µg/l) nem gátolta a sejtek szaporodását, viszont az OTA a baktériumok szaporodásának gátlását okozta, 33-86%-os gátlás volt megfigyelhető 1000 µg/l OTA koncentráció mellett. A mikotoxinok alacsonyabb koncentrációi nem okoztak változást a bakteriális tenyészetek szaporodásában és ebben a tulajdonságban a vizsgált LAB-ok, spóráképző baktériumok és a *Klebsiella pneumoniae* sem különböztek egymástól. Az AFB1 24 µg/l koncentrációban szaporodási gátlást okozott néhány LAB izolátumban (*L. curvatus*, *L. brevis*, *L. coryniformis*), de csak maximum 24% -ig a *L. brevis* esetében. Az izolált spóráképző

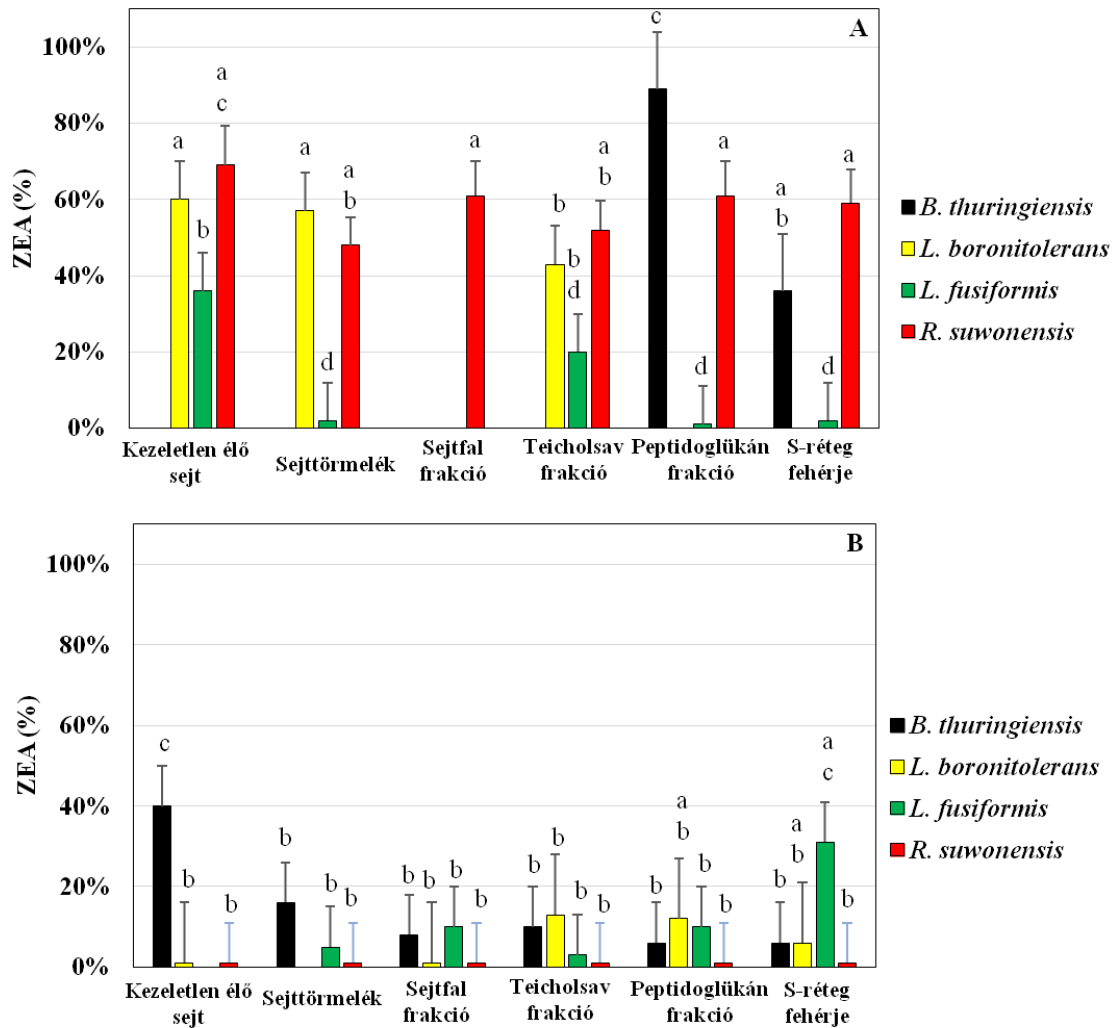
baktériumok (*Lysinibacillus spp.*, *Rummeliibacillus suwonensis* és *Bacillus thuringiensis*) és a *Klebsiella pneumoniae* növekedését 100 µg/l értékig az AFB1 nem befolyásolta.

3.4. Erjesztett takarmány eredetű izolált baktériumok élő sejtjeinek, és sejtfalfrakcióinak mikotoxin eliminációja

A *B. thuringiensis*, *L. boronitolerans*, *L. fusiformis*, *R. suwonensis* esetében a DON eliminációs képesség elhanyagolható volt. Az AFB1 eliminációs képesség 20% alatti volt, kivétel a *B. thuringiensis* S-réteg fehérje frakció esetében, ahol 64% -os AFB1 elimináció történt (1. ábra).



1. ábra *Bacillus thuringiensis* AMK10/1, *Lysinibacillus boronitolerans* AMK9/1, *Lysinibacillus fusiformis* AMK10/2 és *Rummeliibacillus suwonensis* AMK9/2 életképes sejtjeivel, és ezek baktériumpreparátumaival végzett AFB1 eliminációs tesztet követően a felülúszóból mért AFB1 (n = 3, CV% ≤ 15%). Az egyes oszlopok feletti betűk az összes minta páronkénti összehasonlításának eredményét jelzik. Az azonos betűvel jelzett eredmények nem térnek el szignifikánsan (t próba, p ≤ 0,05) egymástól



2. ábra *Bacillus thuringiensis* AMK10/1, *Lysinibacillus boronitolerans* AMK9/1, *Lysinibacillus fusiformis* AMK10/2 és *Rummelinibacillus suwonensis* AMK9/2 életképes sejtjeivel, és ezek baktériumpreparátumaival végzett ZEA eliminációs tesztet követően a felülúszóból (A), és a pelletből (B) mért ZEA koncentráció (n = 3, CV% ≤ 15%). Az egyes oszlopok feletti betűk az összes minta páronkénti összehasonlításának eredményét jelzik. Az azonos betűvel jelzett eredmények nem különböznek szignifikánsan (t próba, p ≤ 0,05) egymástól

A 2. A. ábrán látható, hogy a *Rummeliibacillus suwonensis* AMK9/2 baktérium életképes, és preparátumainak a ZEA eliminációja azonos értékeket mutatott (kb. 40%). Lényeges, hogy az *L. boronitolerans* AMK 9/1 tisztított sejtfal-, PG- és S-réteg fehérje-frakciói majdnem teljesen eliminálták a ZEA-t, és a fennmaradó ZEA koncentrációk a felülúszókban a LOD alatt voltak. A különböző sejtfalfrakció-pelletekből kinyert ZEA

koncentrációk a kiindulási értékek 1–12% -át tették ki (sejtfalfrakció: 1%, PG frakció: 12%, S-réteg fehérje frakció: 6%) (2. A. ábra).

A *Lysinibacillus fusiformis* AMK10/2 esetében a sejtörmelék, a tisztított sejtfal, a PG frakció, és az S-réteg fehérje frakció kimagasló eredményeket mutatott a ZEA eliminációjában (2. A. ábra). Viszont a frakciókból a ZEA visszanyerése csak egy részben volt számottevő, kivéve a *Lysinibacillus fusiformis* AMK10/2 S-réteg fehérje frakcióját, ahol az eredeti ZEA 25%-a volt eliminálható (2. B. ábra).

A *Bacillus thuringiensis* AMK10/1 esetében az életképes sejtek, sejtörmelék, a tisztított sejtfal, és a teicholsav frakció alkalmas volt a ZEA eltávolítására (2. A. ábra). A PG frakció esetében a ZEA elimináció elhanyagolható volt, míg a S-réteg fehérje frakciónál 38% volt. Az AMK/10/1 sejtekből és sejtfalfrakciókból ZEA szabadult fel az extrakció során (2. B. ábra).

A *Klebsiella pneumoniae* esetében DON eliminációt nem tapasztaltunk. Az AFB1 eliminációja a tisztított PG (15%), tisztított sejtfal (18%), teicholsav (20%), és sejtörmelék (27%) szignifikáns volt. A ZEA eliminációs vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a *Klebsiella pneumoniae* esetében a tisztított sejtfal (0%), S-réteg fehérje (0%), és a sejtörmelék (0%) felülúszójából nem mértünk vissza ZEA-t, viszont a tisztított PG frakciónál (84%), és a teicholsav frakciónál (87%) jelentős mennyiségben kimutatható volt a ZEA toxin. A pelletből visszamért ZEA koncentráció alapján a tisztított sejtfalnál (77%), sejtörmeléknél (76%), nagy mennyiségben kimutatható volt a toxin, míg a tisztított PG (9%), teicholsav (11%), és S-réteg fehérje (0%), frakcióknál nem volt jelentős a toxin mennyisége.

3.5. Észteráz aktivitás

Az *R. suwonensis* AMK9/2 és a *B. thuringiensis* AMK10/1 magasabb észteráz aktivitást produkált, mint a *L. fusiformis* AMK10/2 és a *L. boronitolerans* AMK9/1. A legmagasabb enzimaktivitást az *R. suwonensis* AMK9/2 sejtörmelékben mértem (1,98 ± 0,3 mM p-nitrofenol felszabadulás/perc).

3.6. Tejipari mikroorganizmusok aflatoxin M1 rezisztenciája és eliminációja

Az *L. lactis ssp. lactis* R703 tenyészetnél, exponenciális növekedési fázisában, magas AFM1 koncentráció (1,47 µg/l) mellett a sejtsűrűség kismértékű, de szignifikáns csökkenését észleltem.

A szennyezett tejből (AFM1 koncentrációja: 30 ± 5 ng/kg) a *Lactococcus lactis ssp. lactis* R703 PG frakciója eliminálta a legtöbb AFM1-et (58%). A PG frakciótól eltérően a tej AFM1-tartalma minden frakció, a tisztított sejtfal (75%), a teicholsav frakció (84%) és a sejttörmelék (91%) esetében magas volt. Ugyanakkor az AFM1 kezdeti koncentrációjának 67% -a a tejben maradt a kezeletlen, életképes sejtek alkalmazásakor.

A *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12 PG frakció alkalmazásakor volt a legalacsonyabb a tejből visszamért AFM1 tartalom (60%). A PG frakciót követően a tej AFM1 tartalma a többi frakciónál magasabb volt: a tisztított sejtfal (78%), teicholsav frakció (70%), sejttörmelék (75%), életképes sejtek (81%). Különböző mennyiségű (50, 100, 150 μ l) bakteriális PG frakció, hasonló maradék AFM1 mennyiséget eredményezett: 60%, 68%, és 62% a tejben, szignifikáns különbségek nélkül. A *Lactococcus lactis ssp. lactis* R703 esetében, a megemelt PG frakciók (50, 100, 150 μ l), az alábbi maradék AFM1-et eredményezték a tejben: 58%, 65% és 59%. Ezek alapján, arra a következtetésre jutottam, hogy a növekvő mennyiségben alkalmazott készítmény nem növelte az AFM1 eliminációt.

Az *L. paracasei ssp. paracasei* 431 LAB AFM1 eliminációja nem volt számottevő. Az AFM1 kezdeti koncentrációjának 84%-a a tejben maradt, SDS-el és H₂O-val kezelt sejtfrakciók esetében.

Az R703 és BB12 esetében, kétórás kezelési időt alkalmazva, a két sejtpreparátum AFM1 eliminációja nem nőtt az ugyanazon biomassza készítmények egyórás inkubációihoz képest. Az R703 és a BB12 PG frakciók esetében 78%, illetve 68%-ban maradt a tejben AFM1 toxin. A kezeletlen BB12 nem távolította el az AFM1 toxint a tejből. Az életképes R703 baktériumokkal az eredeti AFM1 79%-a mérhető volt.

A BB12 törzs esetében a PG frakció mikotoxin eliminációs képessége jobb volt, mint az életképes sejteké. Az R703 törzs esetében nem volt szignifikáns különbség az élő sejtek és a PG frakciók eliminációs képessége között. A hosszabb inkubációs idő csökkentette az eliminált AFM1 mennyiségét mind az élő sejteknél, mind a PG frakciónál az R703 és a BB12 törzsek esetében.

3.7. Mikotoxin elimináció kísérleti silóban

A legalacsonyabb pH értéket a kontroll minta mutatta (pH 4,55), a mikotoxinnal szennyezett minta pH-ja 4,57, a mikotoxinnal szennyezett és *Lactiplantibacillus plantarum* NCAIM B01074 tenyésztéssel beoltott minta pH 5,16 volt, míg a csak

tenyésztettel beoltott minta pH-ja 5,01 értéket mutatott. A kiindulási szárazanyagtartalom 19,90% volt.

A tejsav tartalom a kontroll mintától jelentősen nem különbözött a mikotoxint tartalmazó minta esetében a folyamat végén, míg a csak *L. plantarum* NCAIM B01074 sejtekkel kezelt silómintánál a legalacsonyabb értéket mutatta. Az ecetsav tartalom a kontroll mintában magas, míg a többi *in vitro* kész szilázsban alacsony értékeket mutatott. Legkisebb propionsav mennyiséget a sejtet tartalmazó szilázs mintában detektáltam. Az izo-vajsav alacsony koncentrációban volt jelen mind a négy kezelésben. Az n-vajsav a legalacsonyabb koncentrációban a kontroll szilázs mintában volt jelen. Az izo-valeriánsav a kontroll mintában magasabb koncentrációban volt jelen, mint a többi szilázs mintában. Az n-valeriánsav esetében csak a toxinnal szennyezett szilázs minta esetében volt detektálható, míg a többi mintában alsó méréshatár alatti koncentrációban volt jelen. Az izo-kaprónsav a kontroll minta esetében volt kimutatható, míg a másik három mintában méréshatár alatt volt. A heptánsav mind a négy szilázs minta esetében méréshatár (LOD= 0,002 m/m%) alatt volt.

A kontroll minta esetében a szecskázott kukorica növényénél a DON mikotoxin nem volt mérhető, viszont a kész szilázsban detektálható volt. A mikotoxinnal szennyezett és sejttel beoltott mintánál a toxintartalomnál jelentős csökkenés figyelhető meg. A *L. plantarum* NCAIM B01074 sejttel beoltott minta esetében nem volt mérhető a DON, sem a szecskázott kukorica növény esetében, sem a kész szilázsban. ZEA toxint a kontroll szecskázott kukorica növényben kimutattam. Azonos mennyiségű ZEA toxin adása mellett, kevesebb a mikotoxinnal és sejttel beoltott minta esetében is kevesebb volt detektálható. Azonban egyik kész szilázs mintában sem volt kimutatható a ZEA toxin.

4. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

1. Megállapítottam, hogy a végső összes LAB szám nem függ a végső víztartalomtól a fermentált takarmányban, mivel a Pearson-féle korrelációs együttható 0,219 volt a fermentált takarmányok nedvességtartalma és az életképes LAB szám között.
2. Megállapítottam, hogy az OTA gátolja az általam vizsgált LAB törzsek szaporodását. 33-86%-os gátlás volt megfigyelhető 1000 µg/l OTA koncentráció mellett.
3. Meghatároztam a *Rummeliibacillus suwonensis* AMK9/2 baktérium mikotoxin rezisztenciáját és eliminációs képességét. *R. suwonensis* esetében a DON eliminációs képesség elhanyagolható volt. Az AFB1 eliminációs képesség 20% alatti volt. A sejtek és a sejtfalfrakciók azonos arányban távolították el a ZEA-t (kb. 40%).
4. Elsőnek határoztam meg a *Lysinibacillus boronitolerans* AMK9/1 baktérium mikotoxin rezisztenciáját és eliminációs képességét. A DON eliminációs képesség elhanyagolható volt. Az AFB1 eliminációs képesség 20% alatti volt. A tisztított sejtfal, PG és S-réteg fehérje-frakciók majdnem teljesen eliminálták a ZEA-t, és a fennmaradó ZEA koncentrációk a felülúszókban a LOD (2,6 µg/l) alatt voltak.
5. Megállapítottam, hogy a *Bacillus thuringiensis* AMK10/1 S-réteg fehérje frakciója eliminálja az AFB1 toxint (64%-os elimináció), magasabb szinten, mint a többi sejtfal frakció vagy a teljes sejt (20% alatti).
6. Megállapítottam, hogy a Gram-negatív *Klebsiella pneumoniae* AMK8/2 baktérium képes a ZEA eliminációra. A tisztított sejtfal (0%), S-réteg fehérje (0%), és a sejttörmelék (0%) frakciók felülúszójából nem volt kimutatható a kiindulási ZEA.
7. Megállapítottam, hogy a *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12 tejipari mikroba PG frakciójának (40%) eliminációja jobb, mint a teljes sejté (19%).
8. Megállapítottam, hogy a *L. paracasei ssp. paracasei* 431 tejipari LAB AFM1 eliminációja nem számottevő. A kezeletlen élő baktérium nem eliminálta az AFM1-et. Az AFM1 kezdeti koncentrációjának 84% -a a tejben maradt, a tisztított sejtfal és a sejttörmelék frakciók esetében.

5. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

1. A silótakarmány száradásától függetlenül nagy mennyiségben marad életben LAB a fermentált takarmányban, ez a probiotikus jelleg miatt megfelelő az állatállomány számára. Az alacsony víztartalom viszont befolyásolhatja (a tejsav mellett) más organizmusok szaporodóképességét. Ez kihasználható a magas sejtszám fenntartására.
2. A viszonylag alacsony LAB fajszaám volt jellemző az erjedések utolsó szakaszára. Az ebben a szakaszban jelenlévő (tehát savtűrő, és mikotoxin-rezisztens) baktériumokból azonosítottam és jellemeztem néhány ismeretlen mikotoxin eliminációs lehetőséggel rendelkező nem-tejsav baktériumot is. Aktivitásuk gátolhatja a gombák szaporodását és a mikotoxinok szennyeződését a silózás aerob kiindulási körülményei között vagy silónyílások után.
3. Silózási kísérletben a mikotoxinnal szennyezett és *Lactiplantibacillus plantarum* NCAIM B01074 sejttel beoltott mintánál a mikotoxintartalom további jelentős csökkenése figyelhető meg. A *L. plantarum* NCAIM B01074 sejttel beoltott minta esetében nem volt mérhető a DON, sem a szecskázott kukorica növény esetében, sem a kész szilázsban. Azonos mennyiségű ZEA toxin adása mellett a mikotoxinnal és sejttel beoltott minta esetében is kevesebb volt detektálható. Azonban egyik kész szilázs mintában sem volt kimutatható a ZEA toxin. A DON esetében az eredeti 42% csökkenés mellett a *L. plantarum* NCAIM B01074 75,6% DON csökkenést adott a „maszkolt” mikotoxin felszabadulását is figyelembe véve.
4. Az R703 és BB12 PG sejtfalfrakciói jelentős mennyiségű AFM1-et kötött meg a természetesen szennyezett tejből egy óras kezelés alatt. Továbbá a PG frakció jobb abszorbens volt az AFM1 esetében, mint a BB12 életképes sejtjei, míg a különbség jelentéktelen volt az R703 törzs esetében. Tejipari alkalmazása lehetséges.

6. IRODALOMJEGYZÉK (felhasznált irodalom)

Adácsi C. - Kovács S. - Pócsi I. - Győri Z. - Dombrádi Z. - Pusztahelyi T.: 2022a. Microbiological and toxicological evaluation of fermented forages. *Agriculture*, 12. 421.

Adácsi C. - Kovács S. - Pócsi I. - Pusztahelyi T.: 2022b. Elimination of deoxynivalenol, aflatoxin B1, and zearalenone by Gram-positive microbes (Firmicutes). *Toxins*, 14. 591.

Castillo I. - Requena T. - De Palencia P. F. - Fontecha J. - Gobbetti M.: 1999. Isolation and characterization of an intracellular esterase from *Lactiplantibacillus casei subsp. casei* IFPL731. *Journal of Applied Microbiology*, 86. 653-659.

Federhen S.: 2015. Type material in the NCBI Taxonomy Database. *Nucleic Acids Research*, 43. D1086-D1098.

Goh Y. J. - Azcárate-Peril M. A. - O'Flaherty S. - Durmaz E. - Valence F. - Jardin J. - Lortal S. - Klaenhammer T. R.: 2009. Development and application of a upp-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of *Lactiplantibacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*, 75. 3093-3105.

ISO 6496 (1999); Animal Feeding Stuffs—Determination of Moisture and Other Volatile Matter Content. International Standard Organization: Geneva, Switzerland, 1999.

Niderkorn V. - Morgavi D. P. - Aboab B. - Lemaire M. - Boudra H.: 2009. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106. 977-985.

Pradhan P. - Tamang J. P.: 2019. Phenotypic and genotypic identification of bacteria isolated from traditionally prepared dry starters of the Eastern Himalayas. *Frontiers in Microbiology*, 10. 2526.

Schoch C. L. - Ciufu S. - Domrachev M. - Hottot C. L. - Kannan S. - Khovanskaya R. - Leipe D. - Mcveigh R. - O'Neill K. - Robbertse B. - Sharma S. - Soussov V. - Sullivan J. P. - Sun L. - Turner S. - Karsch-Mizrachi I.: 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). baaa062. 2020.

Vos P. - Garrity G. - Jones D. - Krieg N. R. - Ludwig W. - Rainey F. A. - Schleifer K. H. - Whitman W. B. (szerk.): 2011. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3). Springer Science & Business Media.

7. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/28/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Adácsi Cintia

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Élelmiszertudományi doktori program

MTMT azonosító: 10075110

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

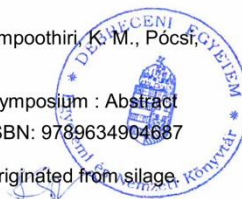
1. **Adácsi, C.**, Kovács, S., Pusztahelyi, T.: Aflatoxin M1 binding by probiotic bacterial cells and cell fractions.
Acta Aliment. 52 (4), 579-588, 2023. ISSN: 0139-3006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/066.2023.00139>
IF: 1.1 (2022)

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

2. **Adácsi, C.**, Kovács, S., Pócsi, I., Pusztahelyi, T.: Elimination of Deoxynivalenol, Aflatoxin B1, and Zearalenone by Gram-Positive Microbes (Firmicutes).
Toxins. 14 (9), 1-12, 2022. EISSN: 2072-6651.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins14090591>
IF: 4.2
3. **Adácsi, C.**, Kovács, S., Pócsi, I., Győri, Z., Dombrádi, Z. R., Pusztahelyi, T.: Microbiological and Toxicological Evaluation of Fermented Forages.
Agriculture-Basel. 12 (3), 1-11, 2022. EISSN: 2077-0472.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture12030421>
IF: 3.6

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (5)

4. Pusztahelyi, T., Kovács, S., **Adácsi, C.**, Miklós, I., Dobos, A., Győri, Z., Nampoohiri, K. M., Pócsi, I.: Biological control and elimination of mycotoxins in food and feed.
In: Biotechnology at the University of Debrecen - 2022 International Symposium : Abstract Book, Debreceni Egyetem, Printart-Press Kft., Debrecen, 17, 2022. ISBN: 9789634904687
5. **Adácsi, C.**, Pusztahelyi, T.: Detoxification potential of lactic acid bacteria originated from silage.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 68, 4, 2021. ISSN: 1217-8950.





6. **Adácsi, C.**, Pusztahelyi, T., Kovács, S.: Mycotoxin resistance and elimination capability of *Klebsiella pneumoniae*.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 68 (Suppl.1), 53, 2021. ISSN: 1217-8950.
7. Pusztahelyi, T., **Adácsi, C.**: Non-lactic acid bacteria for biological control of mycotoxin contamination in commodities.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 68 (Supplement-1), 107, 2021. ISSN: 1217-8950.
8. **Adácsi, C.**, Pusztahelyi, T.: Investigation of Aflatoxin M1 Binding Capacity of Probiotic Bacterial Cultures And Their Preparations.
In: 4th National Conference of Young Biotechnologists : Abstract Book "FIBOK 2020". Ed.: Tünde Pusztahelyi, Levente Czeglédi, Éva Domokos-Szabolcsy, Tamás Emri, University of Debrecen, Debrecen, 72-72, 2020. ISBN: 9789634902720

További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

9. Molnár, K., Rácz, C., Dövényi-Nagy, T., Bakó, K. I., Pusztahelyi, T., Kovács, S., **Adácsi, C.**, Pócsi, I., Dobos, A.: The effect of environmental factors on mould counts and AFB1 toxin production by *Aspergillus flavus* in maize.
Toxins. 15 (3), 1-18, 2023. EISSN: 2072-6651.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins15030227>
IF: 4.2 (2022)
10. Horváth, E., Pusztahelyi, T., **Adácsi, C.**, Tanyi, E., Pócsi, I.: Optimization and Validation of ELISA for Aflatoxin B1 Detection in Fermented Forages and Feeds.
Scientifica. 2022, 1-6, 2022. EISSN: 2090-908X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2022/6059880>
IF: 3.2
11. Sipos, P., Horváth, M., **Adácsi, C.**, Horváth, B., Babka, B., Györi, Z.: Enrichment of pasta products using beetroot.
Food and Environment Safety. 16 (4), 209-215, 2017. ISSN: 2068-6609.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (4)

12. Pusztahelyi, T., Kovács, S., **Adácsi, C.**, Miklós, I., Pócsi, I.: Biological elimination of *Fusarium* mycotoxins: yeasts and bacteria in work.
In: International Conference on New Horizons in Biotechnology: Abstract book, CSIR - National Institute For Interdisciplinary Science and Technology (NIIST), Trivandrum, India, 144, 2023.





13. Pusztahelyi, T., **Adácsi, C.**, Kovács, S., Dobos, A., Pfliegler, V. P., Nampoothiri, K. M., Pócsi, I.:
Micotoxins in food chain-climate effect and elimination studies.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 70 (Suppl.), 77-78, 2023. ISSN: 1217-8950.
14. Pócsi, I., Murvai, K., Horváth, E., Bodnár, V., Mondok, Á., **Adácsi, C.**, Molnár, K., Dobos, A.,
Leiter, É., Pfliegler, V. P., Pusztahelyi, T.: Recent Results in Aflatoxin Research at the
University of Debrecen.
In: International Conference on New Horizons in Biotechnology: Abstract book, CSIR -
National Institute For Interdisciplinary Science and Technology (NIIST), Trivandrum, India,
110, 2023.
15. **Adácsi, C.**, Kovács, S., Miklós, I., Pócsi, I., Pusztahelyi, T.: Resistance of yeasts against
Fusarium mycotoxins.
In: "FIBOK 2022" : Fiatal Biotechnológusok V. Országos Konferenciája = 5th National
Conference of Young Biotechnologists : Program és angol nyelvű összefoglalók = Program
and abstracts. Szerk.: Bánfalvi Zsófia, Gócza Elen, Olasz Ferenc, Pál Magda, Posta Katalin,
Várallyay Éva, MATE Genetika és Biotechnológia Intézet, Gödöllő, 84-84, 2022. ISBN:
9789632699998

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,3

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,9**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2024.01.29.

