

DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:

Dr. Szilvássy Zoltán
egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezető:

Dr. Pusztahelyi Tünde
egyetemi tanár

MIKOTOXIN ELIMINÁCIÓ SILÓ ÉS ÉLELMISZERIPARI EREDETŰ MIKROORGANIZMUSOKKAL

Készítette:

Adácsi Cintia
doktorjelölt

Debrecen

2024

**MIKOTOXIN ELIMINÁCIÓ SILÓ ÉS ÉLELMISZERIPARI EREDETŰ
MIKROORGANIZMUSOKKAL**

**Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az
élelmiszertudományok tudományágában**

Írta: **Adácsi Cintia** okleveles táplálkozástudományi szakember

Készült a Debreceni Egyetem Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskolája
(élelmiszertudományi programja) keretében

Témavezető: Dr. Pusztahelyi Tünde

Az értekezés bírálói:

név	fokozat	aláírás
.....
.....

A bírálóbizottság:

név	fokozat	aláírás
elnök:.....
tagok:.....
.....
.....
titkár:

Az értekezés védésének időpontja: 2024.

Tartalom

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1. Fermentáció	11
2.2. Silózás	12
2.3. Mikotoxinokról általában	15
2.3.1. Aflatoxinok	17
2.3.2. Zearalenon	21
2.3.3. Deoxinivalenol	23
2.3.4. Ochratoxin A	25
2.3.5. Fumonizin B1	27
2.4. A klímaváltozás és a mikotoxinok előfordulása	28
2.5. Módosult mikotoxinok	29
2.6. Mikotoxinokra vonatkozó jogi szabályozások	31
2.7. Erjesztett takarmányokban előforduló mikroba közösség	31
2.8. Baktériumok mikotoxin rezisztenciája és elimináló képessége	33
3. Anyag és Módszer	36
3.1. Felhasznált anyagok	36
3.1.1. Vizsgált erjesztett takarmányminták	36
3.1.2. Tejminták	37
3.1.3. Mikroorganizmusok	37
3.1.4. <i>In vitro</i> szilázs készítésnél felhasznált kukorica növény	37
3.2. Mikrobiológiai analízis	37
3.2.1. Mintaelőkészítés	37
3.2.2. Összes mikrobaszám meghatározása	38
3.2.3. Tejsavbaktériumok száma	38
3.2.4. Penészgombák száma	38
3.2.5. Mezofil szulfitredukáló <i>Clostridium</i> szám	38
3.3. Mikotoxin kimutatás	38
3.3.1. Mikotoxin kimutatás HPLC módszerrel	38
3.3.2. Mikotoxin kimutatás ELISA rendszerben	40
3.4. Baktériumtörzsek izolálása	41

3.5. Izolált baktériumok azonosítása MALDI-TOF MS módszerrel	41
3.6. Izolált baktériumok 16S rRNS alapú azonosítása	41
3.6.1. A genomi DNS izolálása	41
3.6.2. DNS tisztítási protokoll	42
3.6.3. PCR reakció	42
3.6.4. PCR termék tisztítása	42
3.6.5. Az izolált baktériumok azonosítása	43
3.7. Baktériumok mikotoxin rezisztenciája	43
3.8. Bakteriális sejtfrakciók készítése	44
3.9. Baktériumok mikotoxin eliminációs képességének vizsgálata	44
3.10. Észteráz aktivitás	45
3.11. Szilázs készítés	45
3.12. Szárztömeg meghatározása	46
3.13. pH érték meghatározás	46
3.14. Tejsav tartalom meghatározása	46
3.15. Illósav tartalom meghatározása	46
3.16. Statisztikai analízis	47
4. EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁSUK	48
4.1. Az ipari erjesztett takarmányminták jellemzése	48
4.2. Erjesztett takarmány eredetű baktériumok azonosítása	53
4.3. Erjesztett takarmány eredetű izolált baktériumok mikotoxin rezisztenciája	55
4.4. Erjesztett takarmány eredetű baktériumok élő sejtjeinek és sejtfrakcióinak mikotoxin eliminációja	57
4.5. Észteráz aktivitás	62
4.6. Tejipari mikroorganizmusok vizsgálata	63
4.6.1. Tejipari mikroorganizmusok aflatoxin M1 rezisztenciája	63
4.6.2. Tejipari mikroorganizmusok aflatoxin M1 eliminációja	64
4.7. Mikotoxin elimináció kísérleti silóban	67
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	69
5.1. Erjesztett takarmányok mikrobiológiai állapotának és mikotoxin szennyezettségének jellemzése	69
5.2. Mikroorganizmusok jellemzése	70
5.3. Mikotoxin eliminációs eredmények	73
5.3.1. Általánosan	73
5.3.2. Dezinivalenol	73

5.3.3. Zearalenon	74
5.2.3. Aflatoxinok.....	75
5.4. Javaslatok	78
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	80
7. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK	81
8. ÖSSZEFOGLALÁS	82
9. SUMMARY.....	85
10. IRODALOMJEGYZÉK (felhasznált irodalom).....	87
11. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN	114
12. NYILATKOZATOK	117
13. MELLÉKLETEK.....	118
14. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	120

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AF-aflatoxinok

AFB1-aflatoxin B1

AFB2-aflatoxin B2

AFG1-aflatoxin G1

AFG2-aflatoxin G2

AFM1-aflatoxin M1

AFM2-aflatoxin M2

BPW-pufferolt peptonvíz

CDC-Center for Disease Control and Prevention (USA)

CGA- kloramfenikol-glükóz-agar

DON-deoxinivalenol

EFSA-European Food Safety Authority

ELISA-enzyme linked immunosorbent assay (enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálat)

FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations (Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete)

FDA-Food and Drug Administration (USA)

GC-gázkromatográfia

HPLC-High Performance Liquid Chromatography (nagynyomású folyadékkromatográfia)

IARC-International Agency for Research on Cancer (Nemzeti Rákkutató Ügynökség)

IPCC-Intergovernmental Panel on Climate Change

JECFA-Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LAB-tejsavbaktérium

LOD-alsó detektálási határ

LPS-lipopoliszacharid

MALDI-TOF MS-matrix-assisted laser desorption ionization coupled to time-of-flight mass spectrometry (mátrixszal segített lézer deszorpciós ionizációval kapcsolt tömegspektrometria)

MRS- De Mann-Rogosa-Sharp

NAG- N-acetil-glükózamin

NAM- N-acetilmuramil diszacharid

OTA-ochratoxin A

PBS-phosphate-buffered saline; foszfát-pufferelt sóoldat

PCA- Plate Count Agar

PCR-polymerase chain reaction (polimeráz-lánreakció)

PG-peptidoglükán

SDS-sodium dodecyl sulfate (nátrium-dodecil-szulfát)

TCA-triklórecetsav

ZEA-zearalenon

WHO-World Health Organization

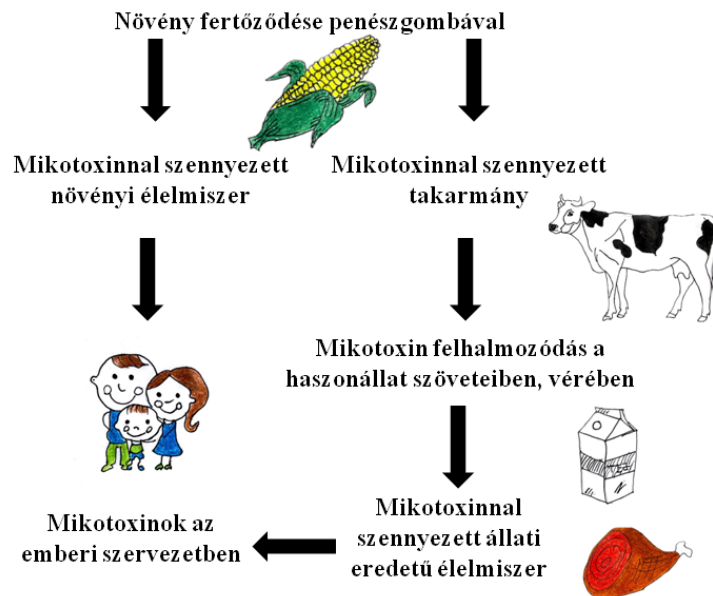
1. BEVEZETÉS

A biztonságos élelmiszer-ellátás iránti igény kielégítésével kapcsolatos elvárás egyre jobban nő. Egészségügyi kockázatuk mellett az egyes gombák által termelt mikotoxinok nagy gazdasági valamint állat- és humán-egészségügyi veszélyt jelentenek, és negatív hatással lehetnek az élelmiszer-ellátás fenntarthatóságára (Bashiry és mtsai, 2021; de Souza és mtsai, 2021; Khaneghah és mtsai, 2021). Az emberek és az állatok az élelmiszerekben, és a takarmányokban előforduló természetes mérgező anyagok miatt biológiai veszélynek vannak kitéve (Heshmati és mtsai, 2021).

A mikotoxinok az élelmiszerlánc minden lépésénél jelen vannak (előfordulásuk már a mezőgazdasági termelés első szintjén jellemző), mert képesek áthaladni a tápláléklánc különböző szintjein. A mikotoxinok bekerülési esélye az élelmiszerláncba egyszerű, a gabonafélék révén direkt módon, és közvetve is kerül mikotoxin a humán szervezetbe (1. ábra). Negatív hatásai a mezőgazdasági haszonnövény alapú termékek fogyasztásával, illetve a mikotoxinnal szennyezett állati takarmány révén és közvetve az állati termékek fogyasztásával az emberben közvetlenül kimutathatók (Abdolmaleki és mtsai, 2021). A mikotoxinnal szennyezett állati eredetű ételek, az aflatoxin M1 (AFM1) tartalmú tej és tejtermék, és a húsból felhalmozódott ochratoxin A (OTA) az emberi szervezet egészségét veszélyeztetik.

A növények fogékonyságával összefüggő biotikus tényezők (betegségek), szélsőséges abiotikus tényezők (termikus és ozmotikus stressz), és a nem megfelelő mezőgazdasági és élelmiszeripari gyakorlat fokozzák a különböző mikotoxinok jelenlétét (Chulze, 2010; Neme és Mohamed, 2017).

A takarmányokban és takarmány alapanyagokban a mikotoxinok jelenléte kettős aggodalomra ad okot: Jelenlétük káros hatással lehet az állatok egészségére, és termelési veszteségeket okozhat, és hajlamosak az állati eredetű élelmiszerek biztonságának kockáztatására (Richard, 2007; Driehuis és mtsai, 2008).



1. ábra Mikotoxinok az élelmiszerláncban (saját szerkesztés)

Az egészség szempontjából legnagyobb jelentőséggel az aflatoxin B1 (AFB1) bír, és részben AFM1-é alakulva bizonyos százalékban kiválasztódik a tejben (Kemboi és mtsai, 2020). Az AFM1 jelenléte a tejben, és tejtermékekben világszerte aggodalomra ad okot, mivel ezeket az élelmiszereket főleg gyermekek fogyasztják, akik sokkal érzékenyebbek a mikotoxinok káros hatásaira (Boudra és mtsai, 2007).

Sajnos a legtöbb mikotoxin kémiai, és termikus stabilitást is mutat a hagyományos élelmiszer-feldolgozás során (Mohsen és mtsai, 2020). Az emberi egészséget és a gazdaságot veszélyeztető AFM1 ellenőrzése ezért kulcsfontosságú. Ezért szükséges a megfelelő megközelítés, és technika a mikotoxinok élelmiszerekben való jelenlétének csökkentésére/megszüntetésére.

Számos takarmánytartósítási módszerrel biztosítható az alacsonyabb mikotoxin-szennyezettség bejutása az élelmiszerláncba. A takarmánynövények nedves tartósítási módja a silózás. Azok a baktériumok, melyek a fermentáció során életképesek, és magas mikotoxin rezisztenciával rendelkeznek, biotechnológiai előnyökkel járhat alkalmazásuk.

A növényi anyagok nem sterilek, így a növényi anyag fermentációja különböző mikroorganizmusokat tartalmazhat, a baktériumoktól a toxintermelő gombákig (Ávila és Carvalho, 2020). A nem megfelelő fermentációs folyamatban a kórokozó gombák, és

a mikotoxinok szintje magas lehet (Carvalho és mtsai, 2016). Ha mikotoxinok vannak jelen a silótakarmányban, azok csökkentett takarmányfelvételt és/vagy tejtermelést, és szennyezett tejet eredményezhet (Bahrami és mtsai, 2016).

A detoxifikáció a legalkalmasabb módszer az élelmiszerek mikotoxin szintjének csökkentésére, mely során ezeket a toxinokat eltávolítják a termékből a fogyasztás előtt. A mikotoxinok biológiai detoxifikációja nagyon ígéretes megoldásnak tűnik, amely lehetővé teszi a mikroorganizmusok felhasználását, a mikotoxin mennyiségének csökkentését, vegyszerek nélkül.

Ezen értekezés célja, hogy kiemelje a biológiai detoxifikáció értékét, a baktériumok hasznosíthatóságát, ezen folyamatokban.

Dolgozatomban célul tűztem ki magam elé:

-a fermentált takarmányok mikrobiológiai állapotának (összes 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. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Fermentáció

A fermentációból származó élelmiszerek, és italok, valamint takarmányok tartósítása évezredek óta hatékony módja az eltarthatóság meghosszabbításának. A fermentáció a mikroorganizmusok biológiai aktivitásától függő folyamat, mely során olyan metabolitok is keletkeznek, melyek képesek visszaszorítani a nemkívánatos mikroflóra növekedését, és túlélését a termékben. Szakirodalmi adatok alapján elmondható, hogy a fermentációnak a mikotoxinszintekre gyakorolt hatása ellentmondásos, a negatív hatásoktól a hatástalanságon át, egészen a pozitív hatásig terjed. Például, az olasz Moscato bor alkoholos erjesztése során a *Saccharomyces cerevisiae* élesztők jelentős csökkenést okoztak az OTA tartalomban (Meca és mtsai, 2010). A kefir készítése során használt *Lactiplantibacillus casei* a tej AFM1 tartalmát távolította el (Sani és mtsai, 2014). Ma és mtsai (2017) arról számoltak be, hogy a LAB-ok alkalmazásától függetlenül a szilázsban lévő mikrobák biztonságos szintre csökkentették az AFB1 kugró koncentrációját a kukoricaszilázs készítése során.

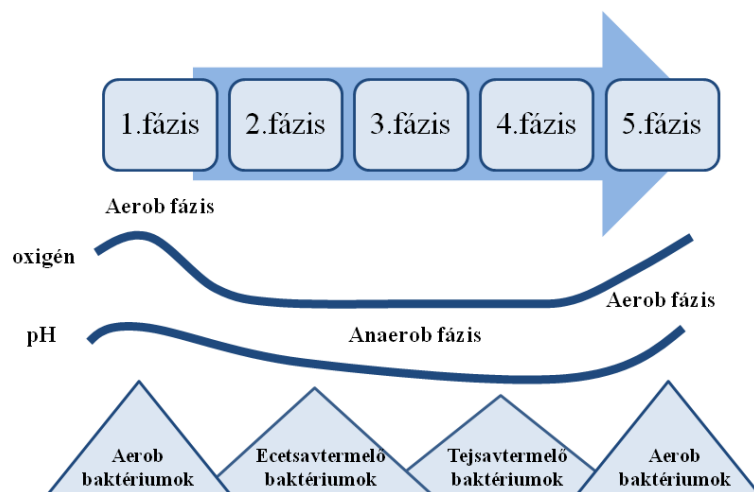
A fermentációs folyamat közben a mikotoxin kontrollja többféle mechanizmusokon keresztül történik, amely magába foglalja a mikotoxin molekula kémiai szerkezetének módosítását, degradálását vagy inaktiválását, ezáltal csökkentve a toxicitást. Richter és mtsai (2002) és Boudra és Morgavi (2008) a dezoxinivalenol (DON) és zearalenon (ZEA) csökkenését bizonyították a silózás során. Ezzel szemben Jensen és mtsai (2020), akik felmérték a silóban történő folyamat hatását a takarmánykukorica *Fusarium* mikotoxinjaira, megállapították, hogy a silózás nem megfelelő módszer a betakarításkor jelen lévő *Fusarium* mikotoxinok csökkentésére, sőt egyes tanulmányok a DON vagy ZEA tartalom növekedését dokumentálták silózás alatt (Pereyra és mtsai, 2008; Keller és mtsai, 2013). Schaarschmidt és Fauhl-Hassek (2018) szerint a DON tartalom növekedésének lehetséges magyarázata a növényi mátrixhoz kapcsolódó DON felszabadulása a sejtfal komponenseiből, enzimek (pl. xilanázok, cellulázok) hatására.

2.2. Silózás

A továbbiakban az állatok számára legfontosabb fermentációs folyamatot a silózást tárgyalom. A silózás egy takarmánytartósítási módszer, amelyben a természetben előforduló LAB-ok anaerob körülmények között a vízben oldódó szénhidrátokat tejsavvá, kisebb mértékben ecetsavvá, és etanollá fermentálják (Driehuis és Elferink, 2000). A fermentációs folyamat során az állatállomány takarmányának tartósítása történik, lehetővé válik a takarmány konzerválása, minimális tápanyagvesztéssel (Rodríguez-Blanco és mtsai, 2021). A világ számos részén az erjesztett takarmány a kérődző háziállatok fő eledele abban az időszakban, mikor nem áll rendelkezésre friss takarmány. A szilázs a legelterjedtebb takarmány Európában, és erre a célra a kukorica a leginkább használt gabonanövény (Alonso és mtsai, 2013), mivel könnyen erjeszthető.

A silóban zajló takarmányerjesztési folyamat öt fő fázisra osztható (2. ábra).

A szilázs készítésénél a legnagyobb hangsúlyt a termés megfelelő érettségi szakaszban történő betakarítására helyezik. A takarmány darabolása, finom aprítása (1-3 cm) lehetővé teszi a szilázs jobb csomagolását, valamint levegőmentessé tételét. Fontos, hogy elkerüljük a takarmány talajjal történő szennyeződését. Szilázként a növény hosszabb ideig tárolható, tápanyagvesztése kisebb, mint szénaként (Gouhis és mtsai, 2017).



2. ábra A silázási folyamat öt fő fázisa. A silázás első fázisa (önmelegedés) a növény betakarításától kezdődik, és addig tart, amíg az oxigén jelen van a silóban. A növényi légzés során a cukrok CO_2 -ra és vízre bomlanak, miközben hő szabadul fel. A második fázisban (ecetsavképződés) az anaerob baktériumok a növényi cukrokat alkohollá, szerves savakká, CO_2 -dá és nitrogénvegyületekké fermentálják. A szerves savak a szilázs pH értékét csökkentik. A harmadik fázisban (tejsavképződés) a tejsavtermelő baktériumok gyors pH csökkenést okoznak. A negyedik fázisban (lecsillapodás) a pH 4-nél alacsonyabb pH értéknél a szilázs stabilabb lesz, és a nem kívánatos mikróbák elszaporodása akadályozottá válik. Az ötödik fázisban (utóerjedés) a siló megbontásakor, a levegő bejutásával az élesztőgombák, penészgombák, és aerob baktériumok elkezdik működésüket, és mérgező molekulák (pl. mikotoxinok) keletkezhetnek, melyek szárazanyag veszteséget okoznak a szilázsban, és csökkentik a szilázs minőségét (Adesogan és Newman, 2010 alapján)

A megfelelő szilázs kialakításánál fontos a növény érettsége, nedvessége, a vágási hossza, szénhidrátartalma, szárazanyag tartalma, és a megfelelő tömörítés. Az érettség biztosítja a fermentálható cukrokat a szilázs baktériumainak. A nedvesség a baktériumok számára elengedhetetlen az erjesztés során, hiszen segít kizárni az oxigént a szilázsból. Ehhez az alapanyag tömörítése is hozzájárul (Schroeder, 2004).

A jó erjesztésű szilázs nem erős illatú, mert a tejsavas erjesztés során a tejsav szinte szagtalan, színe sárga, sárgászöld. A legtöbb szilázs viszont ecetes illatú. Az ecetsav a tejsav után a második legnagyobb mennyiségben képződik, és nagyon illékony. Nagy mennyiségben ecetsavat tartalmazó szilázs sárga színű, különösen a siló alján, mert a tömörítés növeli a nedvességtartalmat (Kung és mtsai, 2018).

Az édes illatú szilázst az alkohol (etanol) a felelős, melyet főleg az élesztők, de sok baktérium is termel (McDonald és mtsai, 1991). Az alkohol reakcióba léphet a silóban lévő savakkal észtereket képezve, ezzel gyümölcsös aromát adva a szilázsnak. Szilázs földes illatáért a *Bacillus*-ok elszaporodása a felelős. A penész illatú szilázs fekete, melyen fehér foltok jelenhetnek meg és mikotoxinnal szennyezett lehet, amely egészségügyi, termelési, és termékenységi problémákat okozhat (Korosteleva és mtsai, 2009).

A *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum* cukrot, és szerves savat felhasználva ecetsavat és vajsavat termel, melynek erős rohadt vaj illata van. A *Clostridium* szennyezett szilázs nyálkás, és olivazöld színű. A dohány illatú szilázs nagy szárazanyag tartalommal rendelkezik. A Maillard-reakció eredményeként a reakcióban fehérjék magas hőmérsékleten cukrokkal kötődnek, az oxigén serkenti a növényi légzést, és az aerob mikroorganizmusok anyagcseréjét, ami hőtermeléshez vezet. Ezek száraz, barna színű takarmányok (Goering és mtsai, 1973). A tapintásra viszkózus szilázs a vajsavas erjedés miatt rossz minőségű, színe sötétzöld vagy fekete, ez a szilázs nem fogyasztható.

A nagyon jó minőségű szilázs pH-ja 3,5 és 4,2 között van. A közepesen jó minőségű szilázs 4,3 és 4,5 közötti pH-val rendelkezik. 4,6-nál magasabb pH-nál rossz minőségű szilázsról beszélünk (Gouhis és mtsai, 2017).

A magas pH érték okai lehetnek, hogy a szilázs szárazanyag tartalma nagyobb 50%-nál, esetleg trágyát tartalmaz, penészes, vagy rosszul tárolták. Ritkán előfordul, hogy a kukorica szilázs pH-ja alacsonyabb 4,2-nél (száraz szilázs miatt, 42%-nál magasabb

szárazanyagtartalomnál). Ebben az esetben nátrium-hidrogén-karbonátot adnak az etetés előtt a szilázshoz, hogy semlegesítse a savasságot (Kung és Shaver, 2001).

2.3. Mikotoxinokról általában

A US Center for Disease Control and Prevention (CDC) szerint 4,5 milliárd ember van kitéve a mikotoxinoknak az élelmiszerek fogyasztása révén, ami súlyos következményekhez vezet (Emmott, 2013).

A mikotoxinok alacsony molekulásúlyú szerves anyagok, a penészgombák által termelt másodlagos metabolitok, melyek bejutva az állati, vagy emberi szervezetbe súlyos megbetegedéseket okoznak (Weidenbörner, 2001). A mikotoxinok gazdasági- és egészségkárosító hatása jelentős, ezért nagy figyelmet igényelnek.

Több mint 300 mikotoxint azonosítottak világszerte (Zain, 2011). A mezőgazdaságban fontos növényeket és élelmiszereket (kukorica, búza, árpa, rizs, füge, tej, sajt) szennyező mikotoxinok közé tartoznak az: aflatoxinok (AF), OTA, DON, ZEA, fumonizinek (FUM) és a patulin (Marin és mtsai, 2013).

A mikotoxinok kedvezőtlen körülmények között is stabilak, és nehezen távolíthatók el az élelmiszerekből (Jard és mtsai, 2011). A mikotoxinokkal kapcsolatos magas kockázat a főzési folyamat során fenálló hőstabilitásuknak köszönhető, valamint abból, hogy a szokásos ételkészítési eljárásokkal nem lehet eltávolítani őket. A szakirodalomban találunk kivételt képező példákat, a DON-ról kiderült, hogy a kekszek készítése során részlegesen lebomlik, és a bomlástermékek kevésbé mérgezők, mint a kiindulási toxin (Stadler és mtsai, 2019).

A mikotoxinok szervezetbe történő bejutása (lenyelés, belélegzés, bőrrel való érintkezés) okozhat akut, és krónikus toxicitást: az akut toxicitás gyors fellépését, esetleg halált okozhat, a krónikus toxicitást a mikotoxinok alacsony dózisu, lassu, hosszú ideig tartó expozíciója okozza (James és mtsai, 2007). A mikotoxinok által előidézett megbetegedés a mikotoxikózis (Richard, 2007). Rákkeltő, neurotoxikus, immunotoxikus, hepatotoxikus, nefrotoxikus hatással rendelkeznek, szaporodásbiológiai defektust is okozhatnak ezek a vegyületek.

Az IARC (International Agency for Research on Cancer) a veszélyes anyagokat öt csoportra osztja, az 1. csoport - emberi rákkeltők, melyekről elegendő bizonyíték áll rendelkezésre hogy rákot okoznak, a 2. A. és 2. B. csoport a valószínűleg emberi rákkeltők, melyek emberi, kísérleti állatokból, származó bizonyítékok alátámasztják,

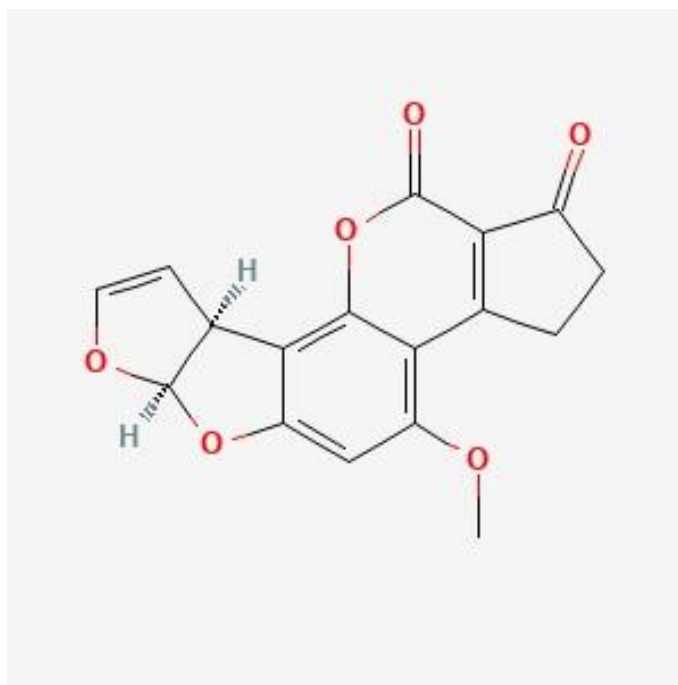
hogy rákot okozhatnak emberben, de ezek az adatok továbbra sem elegendőek. A besorolás különbsége az anyagok rákkeltő hatásának bizonyítottságán alapszik. Az IARC 2 A. csoportba tartozó veszélyes anyagokra meggyőző bizonyíték áll rendelkezésre, hogy az emberben rákot okozhatnak, de nem elegendő ahhoz, hogy biztosan rákot is okoznak. Az állatkísérletekből származó bizonyítékok erősek. Az IARC 2 B. csoportba tartozó anyagok kevésbé erős, korlátozott bizonyítékokkal rendelkeznek arra vonatkozóan, hogy rákot okoznak az emberben. Az állatkísérletek sem olyan meggyőzőek, mint a 2 A. csoportban. A 3. csoport - az emberre gyakorolt rákkeltő hatása miatt nem sorolható be, a 4. csoport - valószínűleg nem rákkeltő az emberre (IARC). A természetben előforduló AF-at az emberi rákkeltő anyagok közé sorolják (1. csoport), az OTA-t, FUM-et és az AFM1-et a lehetséges humán rákkeltő anyagok közé sorolják (2 B. csoport), míg a trichotecének és a ZEA nem ismert humán rákkeltő anyagokként (3. csoport) ismerik el (IARC).

A mikotoxinokat főleg *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps*, vagy *Alternaria* nemzetségbe tartozó gombák termelik. A termények szennyeződése többnyire a szántóföldről származik, és rossz kezelés, tárolás esetén terjed (O'Brien és mtsai, 2007). Az AFB1 és az OTA elsősorban úgynevezett raktári penészgombák (pl. *Aspergillus* és *Penicillium*) által termelt mikotoxinok. Egyéb fonalagombák, amelyek magasabb vízkaktivitás igényűek, a szántóföldön tudják megtámadni a növényeket pl. *Alternaria* és *Fusarium* fajok. A *Fusarium* gombák által termelt mikotoxinok közé soroljuk a ZEA-t, a trichotecénaváz toxinokat és a FUM-et.

A BIOMIN Mycotoxin Survey az eddigi leghosszabb ideig futó világszintű felmérés a mikotoxinok feltérképezésére. A legfrisebb felmérések alapján 2023 első negyedében a leggyakrabban előforduló mikotoxinok a DON és a ZEA voltak Közép-Európában (BIOMIN, 2023). Mivel a legtöbb gomba képes egyidejűleg több mikotoxint termelni, és a mátrixokat egyszerre több gomba is fertőzheti, az állatok több gabonából álló takarmányt fogyasztanak, a legtöbb elfogyasztandó termék több mikotoxinnal szennyezett. A legfrisebb BIOMIN felmérés alapján Európában, a pozitív minták 58% - a egynél több mikotoxint tartalmazott (BIOMIN, 2023). A mikotoxin kombinációk miatt a kialakult toxicitást nem lehet megjósolni, így előfordulhat szinergizmus, és antagonizmus egyaránt (Nesic és mtsai, 2013).

2.3.1. Aflatoxinok

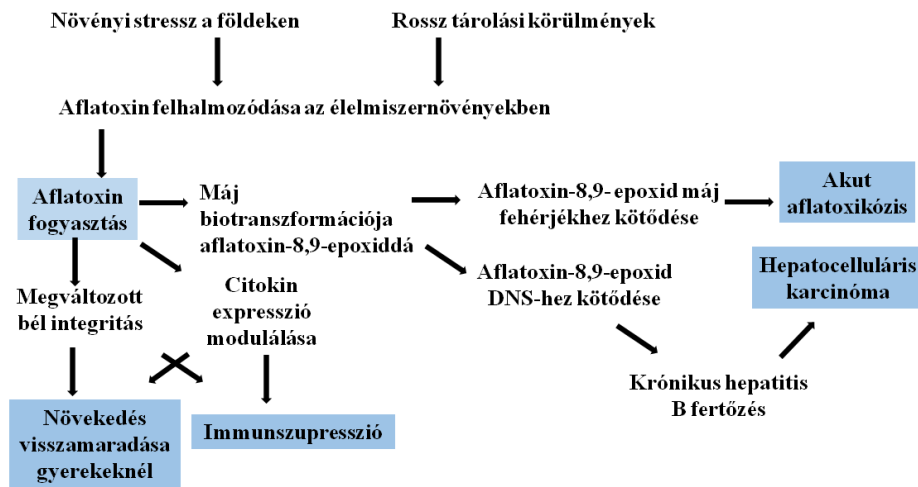
Az AF számos formája létezik, a leggyakrabban előforduló az AFB1, aflatoxin B2 (AFB2), aflatoxin G1 (AFG1), aflatoxin G2 (AFG2), AFM1, és az aflatoxin M2 (AFM2), a legveszélyesebb az AFB1 (3. ábra), mely rákkeltő tulajdonságokkal rendelkezik, és gyakran fordul elő számos élelmiszerben. Az AF-at elsődlegesen az alábbi fajok termelik: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, és az *Aspergillus nomius*. Az AF-at először 1960-ban, Angliában azonosították, amikor több mint százezer pulyka pusztult el. A vizsgálatok kimutatták, hogy *Aspergillus flavus* penészgomba által szennyezett földimogyoró lisztet tartalmazott a pulykák takarmánya (Lancaster és mtsai, 1961).



3. ábra Aflatoxin B1 kémiai szerkezete. Forrás: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (Bolton és mtsai, 2008) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/186907#section=2D-Structure>)

Az emberek AF-kal szennyezett élelmiszerek, vagy AF-nak kitett állati termékek fogyasztása révén kerülhetnek kapcsolatba az AF-kal (4. ábra). Az AFB1 mutagén, teratogén, toxikus, karcinogén, immunotoxikus emberre és állatra egyaránt, ezért az IARC az 1. csoportba, a rákkeltő anyagok közé sorolta (Ostry és mtsai, 2017). Lenyeléssel, belélegzéssel vagy a bőrön keresztül felszívódva az AF-ok, még nagyon

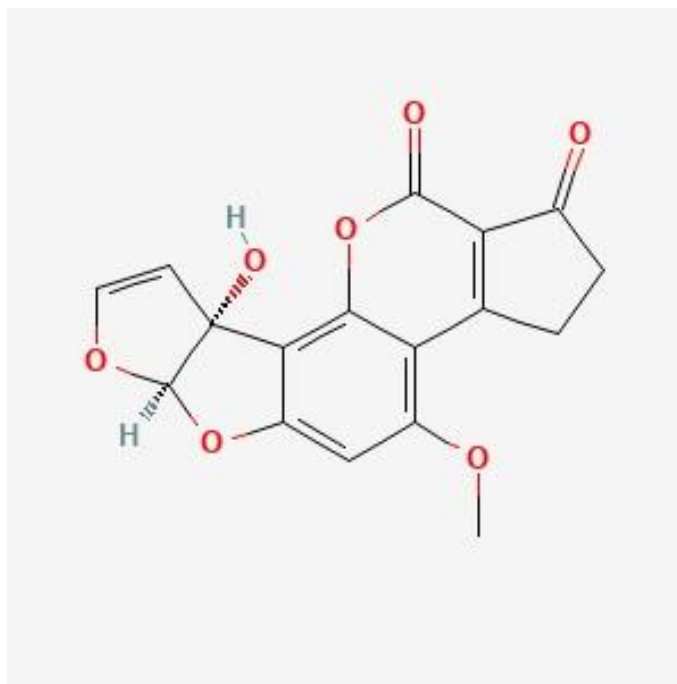
kis koncentrációban is károsak az emberi egészségre (Wen és mtsai, 2014; Makun és mstai, 2011).



4. ábra Aflatoxin szennyezés útja, és hatása az emberi szervezetre. (Szerkesztve: Wu és Khlangwiset, 2010 alapján)

A klímaváltozásnak köszönhetően az AF termelő gombák megjelentek a mérsékelt égövi országokban, így hazánkban is (Dobolyi és mtsai, 2011). Magyarország különböző részeiről gyűjtött kukoricaszemekben azonosítottak *Aspergillus flavus* toxintermelő gombát. Borbély és mtsai (2010) kelet-magyarországi gabona mintákban találtak AFB1-et, melynek határértéke meghaladta az EU határértéket. 2004-ben Magyarországon az örölt fűszerpaprika pótlására külföldről importált paprikát kevertek. Az import paprika azonban magas AF tartalommal rendelkezett, így a toxinmentes paprika összekeverésével is, határérték feletti toxintartalommal került a piacra (Fazekas és mtsai, 2005).

Az AFB1-et tartalmazó takarmányt elfogyasztó tehének tejében AFM1 (5. ábra) jelenik meg (Campagnollo és mtsai, 2016). A takarmány elfogyasztását követően az AFM1 már 3-4 óra múlva mérhető a bélsárban, majd 20-22 óra múlva a tejben is megjelenik (Seid és Mama, 2019).



5. ábra Aflatoxin M1 kémiai szerkezete

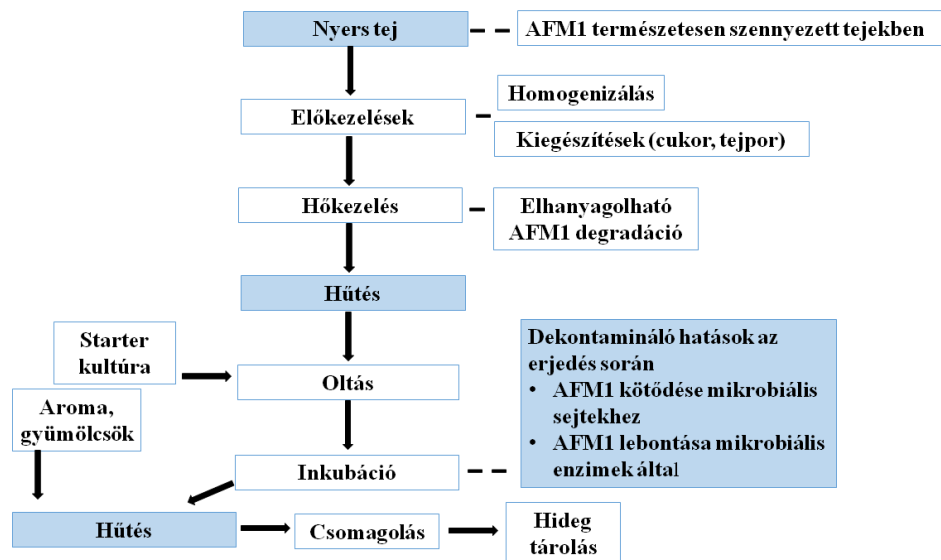
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15558498#section=2D-Structure>)

Az AFM1, az AFB1 hidroxilált metabolitja emlősökben részben az AFB1-el együtt kiválasztódik a tejbe. A takarmányból származó AFB1 körülbelül 0,3–6,2% - a alakul át AFM1-vé az állati májban, és kiválasztódása számos tényezőtől függ, mint például az állati genetika, a szezonális változások, a fejési folyamat és egyéb környezeti feltételek (Unusan, 2006).

Az IARC a toxicitási vizsgálatokat követően az AFM1-t a 1. csoportba tartozó humán rákkeltő anyagokhoz sorolta. Az AFM1 szerkezetileg (5. ábra) hasonló az AFB1-hez, de alacsonyabb citotoxicitással, karcinogenitással, genotoxicitással, mutagenitással és teratogén hatással jár (IARC, 2012).

A tejet és tejtermékeket minden korosztály fogyasztja, különösen a gyerekek. A tej a legfontosabb tápanyagforrás. A tejben és tejtermékekben előforduló AFM1 természetesen egészségbiztonsági probléma minden korosztály esetében a kémiai szerkezet stabilitása és a tej, és tejtermékek rendszeres fogyasztása miatt (Benkerroum, 2016). Az AFM1 a szoptatás miatt az újszülötteket is fenyegeti (Saad és mtsai, 1995; Maleki és mtsai, 2015). Mivel a tejet, és tejterméket különböző technológiával dolgozzák fel, az egyes feldolgozási lépések hatása a végtermék mikotoxin-szintjére változó lehet (6. ábra). Az AF stabil vegyületek, melyek általában nem bomlanak le az

élelmiszerfeldolgozás során (Bullerman és Bianchini, 2007, 2014; Kamyar és Movassaghghazani, 2017). A tejszínkészítésnél csökkenhet az AFM1 koncentrációja a tejben, mivel az AFM1 a tej kazeinjéhez képes kötődni (Prandini és mtsai, 2009). Az aflatoxin jelenléte a tejtermékekben olyan negatív hatásokkal jár, mint az erjedési idő növekedése, íz- és állageltérés, a starter kultúrák szaporodásának, aktivitásának csökkenése (Arab és mtsai, 2012).

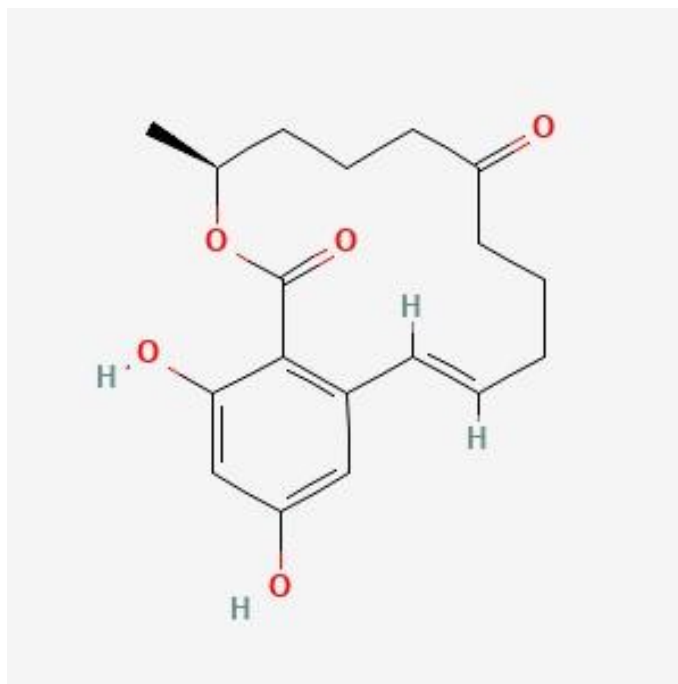


6. ábra A tej általános feldolgozási folyamatábrája a gyártás során, és a lépések hatása a tej AFM1 tartalmára. (Szerkesztve: De Souza és mtsai, 2021 alapján)

Az AFM1 stabilitása függ a termék pH-jának változásától, a kazein fizikai-kémiai jellemzőitől, az eredeti AFM1 koncentrációjától, az alkalmazott fermentációs körülményektől, analitikai módszerektől. Összességében elmondható, hogy az AFM1 a vegyület stabilitása miatt a tejfeldolgozás során a végtermékben marad (Campagnollo és mtsai, 2016).

2.3.2. Zearalenon

A ZEA toxint az alábbi gombafajok termelik: *Fusarium crookwellense*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum* és *Fusarium culmorum*. Ezen *Fusarium* fajokról ismert, hogy világszerte szennyezik a gabonaféléket (Dänicke és Winkler, 2015). A *Fusarium* penészgombák főleg mérsékelt, és melegebb éghajlaton termelnek ZEA toxint (Mally és mtsai, 2016). A ZEA hőstabil, és nem bomlik le melegítés, őrlés, extrudálás, tárolás során sem (Gromadzka és mtsai, 2008).

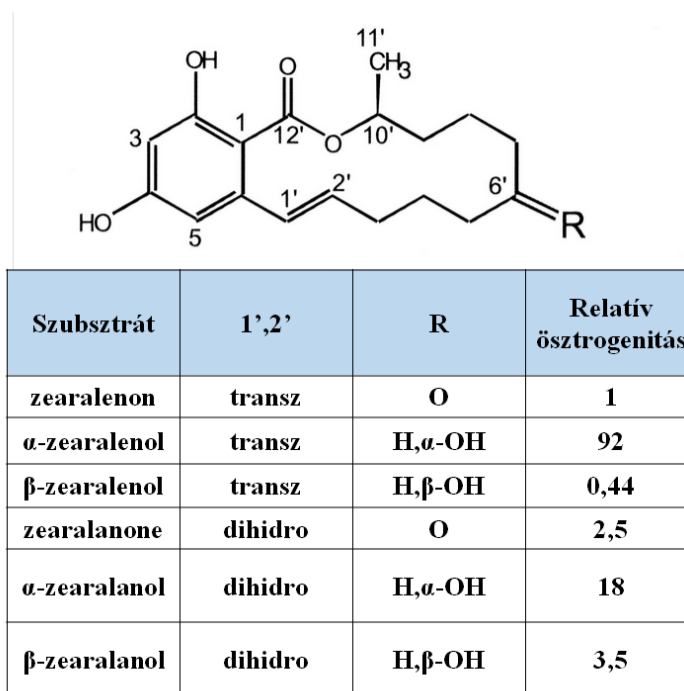


7. ábra Zearalenon kémiai szerkezete

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zearalenone#section=2D-Structure>)

A ZEA szteroidvázis szerkezetéből (7. ábra) fakadóan az egyetlen ismert mikro-ösztrogén. Hatásának köszönhetően származékaival együtt főként szaporodásbiológiai, és ivarzási zavarokat okoz (Gromadzka és mtsai, 2008). Haszonállatok közül a sertések a legérzékenyebbek a ZEA-ra, melynek következménye a halvaszületés, a termékenység csökkenése, a sárgatestek perzisztenciája, a petefészkek-sorvadása (Fink-Gremmels és Malekinejad, 2007). Hím sertésekben csökken a spermatogenezis, a herék tömege, és a tesztoszteronszint (Zinedine és mtsai, 2007). A ZEA egy másik *Fusarium* mikotoxinnal a DON-nal együtt gyakran fordul elő (Grenier és Applegate, 2013) élelmiszeralapanyagokban.

A ZEA a belsejtekben metabolizálódik, két fő metabolitja, az α -zearalenol (α -ZEL) és β -zearalenol (β -ZEL) (Ueberschär és mtsai, 2016) (8. ábra). A ZEA további formái az α -zearalanol (α -ZAL) és β -zearalanol (β -ZAL) (8. ábra) (Takahashi-Ando és mtsai, 2004; Minervini és mtsai, 2006). Láthatóan az α formák ösztrogén hatása jelentősen megnövekedik a ZEA-hoz viszonyítva (8. ábra).



8. ábra A ZEA és származékainak kémiai szerkezete
(Szerkesztve: Takahashi-Ando és mtsai, 2004 alapján)

Az állatkísérletek a ZEA gyors felszívódását mutatták a gyomor-bél traktusból orális bevitt követően (Dailey és mtsai, 1980). A szervezetbe kerülő ZEA főként a májban metabolizálódott (Zinedine és mtsai, 2007; Jiang és mtsai, 2012; Koraichi és mtsai, 2012).

Az Európai Bizottság rendeletben szabályozta az élelmiszerekre vonatkozó ZEA határértékeket (European Commission No. 1881/2006 és European Commission No. 2006/576/EC).

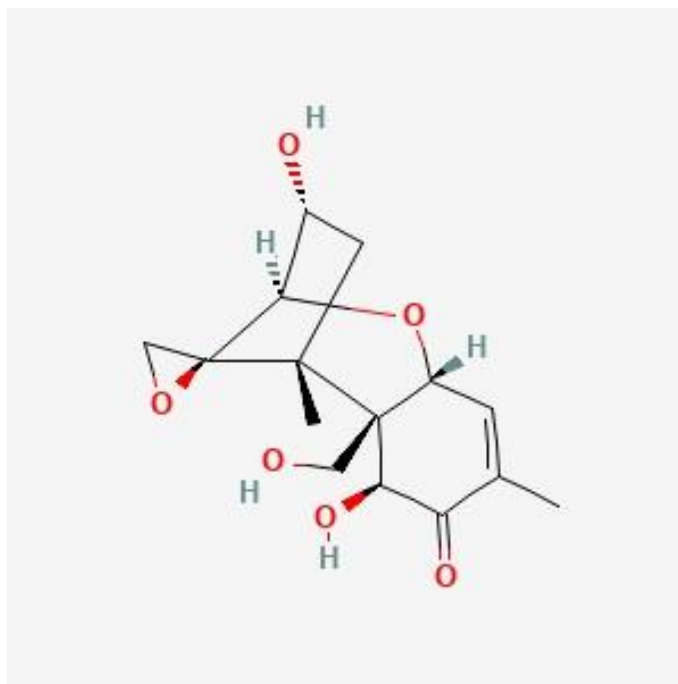
A ZEA toxikussága miatt az élelmiszerekben való jelenlétét többen tanulmányozták. A mikotoxint kimutatták búzában, árpában, kukoricában, cirokban, rozsban (Zinedine és mtsai, 2007; André és mtsai, 2022), rizsben (Tralamazza és mtsai, 2021), kukoricaszilázsban (Sebaei és mtsai, 2022), szójában (De Boevre és mtsai, 2012), és

sörben (Zinedine és Ruiz, 2014), továbbá kimutatták kenyérben (Fink-Gremmels és Malekinejad, 2007), reggeli gabonapehelyben (Mally és mtsai, 2016) és haltakarmányban (Mwihia és mtsai, 2020). A táplálékkal bevitt ZEA és metabolitjai felszívódnak a szervezetben, ezért megjelenhetnek a biológiai folyadékokban: vérben, vizeletben és a ZEA-nal szennyezett takarmányt fogyasztó tehenek tejében is (Coffey és mtsai, 2009). A ZEA tejjel történő kiválasztása csekély, ami alátámasztja, hogy az állati eredetű élelmiszerekkel való emberi expozíció alacsonyabb, mint a szennyezett takarmány és gabona miatti expozíció (Fink-Gremmels és Malekinejad, 2007). Ugyanakkor ZEA származékokat találtak különböző élelmiszerekben (Dänicke és Winkler, 2015), pl. α -ZEL-t csirkeszívben és zúzában (3,60-4,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Wang és mtsai, 2018). Ugyanakkor anyatejben (2,1–14,3 ng/ml ; Rubert és mtsai, 2014) és emberi vizeletben (0,65–5,0 ng/ml ; Ediage és mtsai, 2013) is detektálható volt. Németországi férfiak vizeletében 100 ng/l ZEA szintet mértek (Föllmann és mtsai, 2016). A szoptatott csecsemők vizeletében 784 ng/l ZEA-t, míg a nem szoptatott csecsemők vizeletében 678 ng/l ZEA-t találtak (Ezekiel és mtsai, 2022). Ez is azt mutatja, hogy a csecsemők számára a ZEA nagyobb kockázatot jelent a tejalapú táplálkozás miatt (Ropejko és Twaruzek, 2021).

2.3.3. Dezinivalenol

A DON (9. ábra), vagy más néven vomitoxin a trichotecének nagy családjába tartozik, elsősorban a *Fusarium graminearum* és *F.culmorum* termeli, amely az árpa, búza, zab, és kukorica gyakori szennyezője az egész világon (Mankevičienė és mtsai, 2006; Del Ponte és mtsai, 2022).

A DON kémiaiilag stabil, hőálló, így nehéz eliminálni a szennyezettséget, mind az élelmiszer, mind a takarmány termelés során. A DON-t kimutatták számos emberi fogyasztásra szánt élelmiszerben, tésztában (González-Osnaya és mtsai, 2011), kenyérben (Savi és mtsai, 2016) és sörben (Varga és mtsai, 2013).



9. ábra Deoxinivalenol kémiai szerkezete

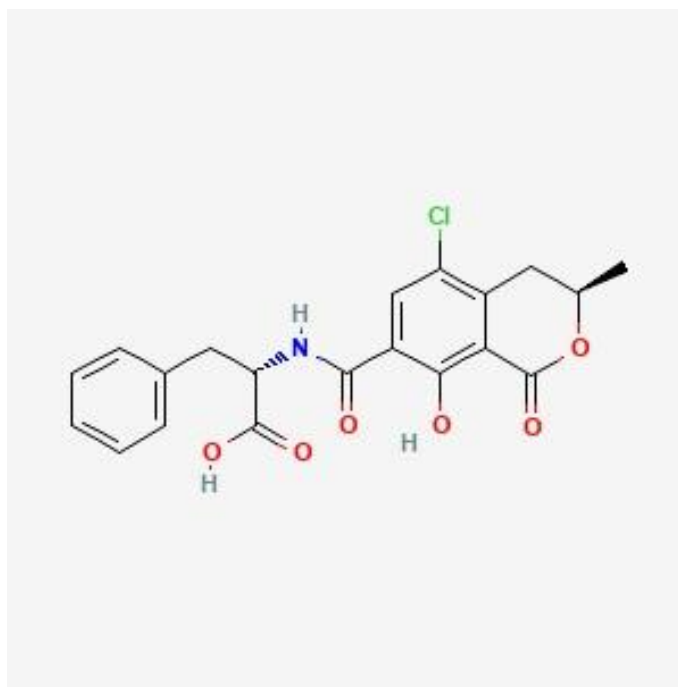
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40024#section=2D-Structure>)

A DON toxin nem rákkeltő, viszont huzamosabb ideig történő fogyasztása esetén immunrendszer károsodást, valamint gasztrointesztinális (hasmenés, hányás) zavarokat okozhat (Sohár, 2007). A vomitoxin név, a sertéseknél a hánytató, embereknél gyomor - bélrendszeri panaszokat okozó hatására utal (Zhou és mtsai, 2020). A DON jelenléte a sertések takarmányában csökkenti a takarmányfelvételt, valamint takarmány visszautasítást is okoz (Čonková és mtsai, 2003).

A DON-ra érzékenyebbek a sertések, őket követik a rágcsálók, kutyák, macskák, baromfik és a kérődzők (Pestka és Smolinski, 2005). A DON szennyeződés gyenge utódokat, vetélést, a baromfi tojások minőségének és mennyiségének romlását, valamint a szarvasmarhák szaporodási teljesítményének romlását okozza (Bracarense és mtsai, 2012). A DON elsősorban DNS-károsodást okoz és apoptózist indukál oxidatív stresszen keresztül, mivel a peptidil-transzferázhoz kötődik, ami gátolja a fehérjeszintézist (Wu és mtsai, 2020).

2.3.4. Ochratoxin A

Az ochratoxinokat kémiai szerkezetük alapján három csoportba sorolhatjuk: OTA (10. ábra), ochratoxin B (OTB), és ochratoxin C (OTC). Az OTA a legelterjedtebb, és legmérgezőbb (El Khoury és Atoui, 2010). Az ochratoxinok szerkezete egy dihidro-izokumarin részt tartalmaz, amely amidkötésen keresztül kapcsolódik a fenilalaninhoz, ezenkívül az OTA és az OTC paraklór-fenol részt is tartalmaz.



10. ábra Ochratoxin A kémiai szerkezete

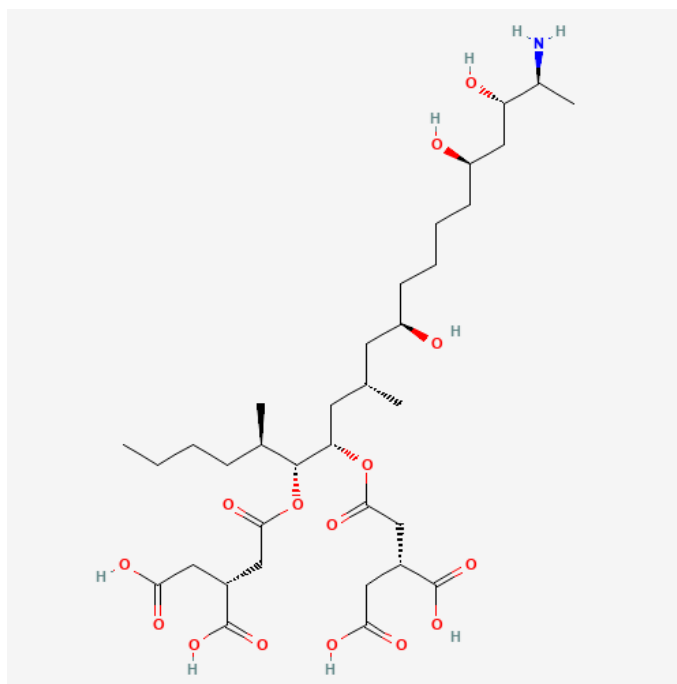
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442530#section=2D-Structure>)

A *Penicillium*, *Fusarium* és *Aspergillus* fajok által termelt ochratoxinok megtalálhatók gabonafélékben, kávéban, babban, hüvelyesekben és szárított gyümölcsökben egyaránt (Duarte és mtsai, 2010), valamint kimutatták élelmiszerszínezékekben (Solfrizzo és mtsai, 2015), és a palackozott vízben (Mata és mtsai, 2015). Az OTA-t nem csak a szennyezett növényi élelmiszerek fogyasztásával tudjuk bevinni a szervezetünkbe, hanem állati eredetű élelmiszerekkel is. A sajtokban és a húskészítményekben az OTA szennyeződés közvetlen módon is előfordulhat, az OTA-t termelő penészgombák növekedéséből az érlelés, feldolgozás során (Camardo Leggieri és mtsai, 2020). Például horvát húskészítményekből származó kolbászban, felszáraz kolbász, száraz hústermékekben OTA-t mutattak ki (Markov és mtsai, 2013).

Az OTA képes a szérumalbuminhoz kötődni, ezért a szervezet minden részébe eljut, például az izomszövetbe is. Számos toxikus hatása van, melynek célszerve a vese (Duarte és mtsai, 2011), vesekárosító, rákkeltő, immunotoxikus, teratogén tulajdonságokkal rendelkezik (Zhong és mtsai, 2014). Az ochratoxin káros hatással lehet a magzatra az anyaméhben, mivel képes átjutni a placentán, és a központi idegrendszer fejlődési rendellenességeit, az agy károsodását okozhatja (Soleas és mtsai, 2001). Az IARC az emberre nézve valószínűsítette a rákkeltő hatást és a 2 B csoportba sorolta ezt a vegyületet. Az Európai Unió által megállapított OTA maximális szint a gabonafélékben, és gabonatermékekben 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, borban és szőlőben 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, bébiételekben 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (European Commission, 2006).

Az OTA-val szennyezett takarmány kevésbé veszélyes a kérődző állatokra, mint a monogasztrikus állatokra, ugyanis a kérődző állatok jobban ellenállnak az OTA toxicitásának (Denli és Perez, 2010). A bendő mikróbák kevésbé toxikus OTA-vá bontják az OTA-t, ami a vizelettel ürül. Az OTA-val szennyezett takarmányt elfogyasztó állatok nemkívánatos OTA származékokat vihetnek az állati eredetű élelmiszerekbe (carry-over), a húsba, tojásba, és a tejbe (Battacone és mtsai, 2010).

2.3.5. Fumonizin B1



11. ábra Fumonizin B1 kémiai szerkezete

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2733487#section=2D-Structure>)

A FUM-ek a *Fusarium verticillioides*, és a *Fusarium proliferatum* metabolizmusa során keletkeznek. Az *Aspergillus niger* fumonizint termel olyan növényekben, mint a földimogyoró, kukorica, és a szőlő (Frisvad és mtsai, 2007; Mogensen és mtsai, 2010). A természetben előforduló FUM B csoportba tartozó molekulák: a fumonizin B1 (FB1), fumonizin B2 (FB2), és a fumonizin B3 (FB3) egy hosszú hidroxilezett szénhidrogén láncból állnak, amelyhez trikarbalilsav, metil és amino csoportok társulnak (11. ábra). Az eddig talált számos FUM közül a FB1 a leggyakoribb szennyező, mely nagy veszélyt jelent az állati, és az emberi egészségre egyaránt (Ahangarkani és mtsai, 2014).

A fumonizinek előfordulhatnak búzában, árpában, rozsban, rizsben (Ortiz és mtsai, 2013), de főként a kukoricát, és kukorica termékeket szennyezik (Hanvi és mtsai, 2019; Stoev, 2015). A FB1 befolyásolja a takarmány tápértékét, és érzékszervi karakterisztikáját, ami a táplálékfelvétel csökkenéséhez vezet, és komoly gazdasági veszteséget okozhat (Deepthi és mtsai, 2017). A *Fusarium* fajokkal fertőzött gabonafélék, és egyéb növények, amelyek az FB1 gazdag forrásai súlyos betegséget, például nyelőcsőrakat okozhatnak az emberben (Alizadeh és mtsai, 2012), lovaknál leukoencephalomaláciát (Boonen és mtsai, 2012), sertéseknél tüdőödémát okozhat

(Stockmann-Juvala és mtsai, 2008). A terhesség korai szakaszában elfogyasztott fumonizint tartalmazó élelmiszerek növelik a kockázatát annak, hogy a gyermek agyi, vagy gerincvelői rendellenességgel születik (Gelineau-van Waes és mtsai, 2005).

2.4. A klímaváltozás és a mikotoxinok előfordulása

A bolygónk éghajlata a 20. század közepe óta jelentős változáson megy keresztül, amit a globális légköri, és az óceánok hőmérséklet változása, valamint a tengerszint emelkedése jellemez, és a jégtakarók zsugorodása mutat (Masson-Delmotte és mtsai, 2021). Feltehetően az erdők nagymértékű kiirtása, a fosszilis anyagok égetése, és sok más emberi tevékenység a klímaváltozás mozgatórugója. A metán, és a CO₂ koncentrációja növekszik a légkörben, ami környezetkárosodást eredményezett (Chakraborty és mtsai, 1998).

Az élelmiszerbiztonság szempontjából az éghajlatváltozás okozta legnagyobb veszélyt a mikotoxinok okozzák. Az élelmiszer- és takarmánybiztonság szempontjából leginkább aggasztó mikotoxinokat számos gombafaj termeli, melyek közül az *Aspergillus*, *Penicillium*, és a *Fusarium*, amelyek világszerte jelentősek. Ezek a gombák alkalmazkodhatnak a környezeti feltételek széles köréhez. Mivel az éghajlat jelentősen befolyásolja a gombák növekedését, eloszlását, és mikotoxin termelését, az éghajlatváltozás potenciálisan növelheti a gombák élelmiszer- és takarmánybiztonsági kockázatait (Medina és mtsai, 2017). A gabonafélék gyakran a legsúlyosabban érintett növények, mivel az emberiség nagy részének táplálékát képezi. Valójában a gabonafélék a mikotoxin szennyezés fő forrásai az emberi táplálékláncban, akár közvetlenül a szennyezett élelmiszer fogyasztásával, vagy közvetett módon a tej vagy állati termékek bevitelével. Ezen felül nagy figyelmet kell fordítanunk a természetes ökoszisztémában élő vadon élő állatok mikotoxin szennyezettségére is.

Az éghajlat (hőmérséklet, rendelkezésre álló víz, fény minőség, mennyiség, aszály, elsivatagosodás, nedves és száraz ciklusok ingadozása) a legfontosabb tényező, amely befolyásolja a gombák életciklusának szakaszait, túlélésre való képességüket, és toxintermelésüket (Paterson, 2006). A mikotoxin kiterjedtség az egész világon előfordul, annak ellenére, hogy előfordulásukat az éghajlat és a földrajzi elhelyezkedés határozza meg. A megemelkedett CO₂ szint miatt pedig a növények gombapatogénekkal szembeni érzékenysége megnövekszik (Vaughan és mtsai, 2016). A mikotoxinok termelése függ az időjárási körülményektől: hőmérséklet, csapadék, ezeket pedig az éghajlatváltozás

befolyásolja. A globális felmelegedésnek köszönhetően kialakuló környezeti hatások (pl: hőmérséklet, csapadék) ezért veszélyeztethetik az élelmiszerbiztonságot (Miraglia és mtsai, 2009). Emellett az emelkedő átlaghőmérséklet kedvez a rovarok növekedésének, fejlődésének, és szaporodásának, ezáltal fokozza a gabonafélék elleni kártevők támadásait, ami közvetve a gombás szennyeződés növekedéséhez, és a mikotoxintermelés szintjének növekedéséhez vezet (Paterson és Lima, 2010).

Az AF-ok és a FUM-ek trópusi, szubtrópusi régiókban termelődnek jelentősen, Ázsiában, Afrikában, Európa egyes részein, és a mérsékelt égövi övezetekben. A DON és a ZEA az északi mérsékelt égövi régiókban, nedves és hűvös körülmények között fordul elő: Európában, Amerikában, és Ázsia egyes részein (Smith és mtsai, 2016). A *Penicillium verrucosum* OTA termelése mérsékelt égövi hűvös éghajlaton, az *Aspergillus ochraceus* általi termelése pedig forró éghajlatú trópusi területeken fordul elő (Laitila, 2015). Ugyanakkor, a globális felmelegedésnek köszönhetően, egyes mikotoxinogén gombák földrajzi elterjedése megváltozhat (Medina és mtsai, 2017), így más területeken is megjelenhetnek bizonyos mikotoxinok is. Battilani és mtsai (2016) szerint a következő 50 éven belül az AFB1 élelmiszerbiztonsági problémává válik Kelet-Európában, a Balkán-félszigeten, és a mediterrán régiókban. Tirado és mtsai (2010) illetve Paterson és Lima (2010) szerint az éghajlatváltozás miatt az aflatoxinogén (aflatoxin termelésre képes) törzsek megjelenését okozhatja a mérsékeltövi országokban. A mérsékelt égövön, így hazánkban is a DON, T2, HT2, ZEA és FUM mikotoxinok fordulnak elő gyakrabban. Azonban a kutatási eredmények alapján, AFB1 szennyezettséggel is számolni kell. Tabuc és mtsai (2009) Romániában határérték feletti AF értéket mértek kukoricán. A termotoleráns gombák, mint, például az *Aspergillus* törzsek a melegebb éghajlathoz könnyebben alkalmazkodnak (Paterson és Lima, 2010) és átvehetik a vezető szerepet a mikotoxin termelésben.

2.5. Módosult mikotoxinok

A gombák szekunder metabolit képzési-útvonalain képződő vegyületek a mikotoxinok. Ha szerkezetükben valamiféle kémiai változás következik be, már módosított mikotoxinokról beszélünk. A módosított mikotoxin kifejezést nemrégiben alkották meg, a kifejezés a mikotoxinokból származó összes formát jelöli, amely növényi enzimek vagy más gombák által módosul („lost” mycotoxins), és gyakran polárisabb anyagokhoz, például cukrokhoz konjugálódnak („masked” mycotoxins) (Berthiller és

mtsai, 2013). Az első ilyen módosult szerkezet az AFM1 volt, amelyet AFB1-el szennyezett takarmányt fogyasztó állatok tejében fedeztek fel (Masri és mtsai, 1967). A biológiailag módosított maszkolt mikotoxinok a növények védekező mechanizmusai által képződött mikotoxinok (Berthiller és mtsai, 2013), melyek hagyományos analitikai technikával nem mutathatók ki (Tran és Smith, 2011).

A módosított mikotoxinok a szennyezett élelmiszer feldolgozás során is keletkezhetnek, majd az állatok és emberek anyagcseréjével az eredeti mikotoxinná alakulhatnak (Berthiller és mtsai, 2013). A módosított mikotoxinok szabad formává való alakulása feltehetően növeli a mikotoxin szintet és potenciális kockázatot jelenthet az emberi egészségre nézve (Kowalsky Paris és mtsai, 2014; Freire és Sant'Ana, 2018).

A maszkolt mikotoxinok csoportja magába foglalja az extrahálható konjugált, és a nem extrahálható kötött formákat is. A megkötött mikotoxinok kovalensen, vagy nem kovalensen kötődnek polimer szénhidrát vagy fehérjemátrixhoz (Berthiller és mtsai, 2009). Az extrahált konjugált mikotoxinok megfelelő analitikai módszerekkel kimutathatók. A megkötött mikotoxinok azonban közvetlenül nem hozzáférhetőek, és a kémiai elemzés előtt kémiai, vagy enzimes kezeléssel fel kell őket szabadítani a mátrixból.

2.6. Mikotoxinokra vonatkozó jogi szabályozások

A mikotoxinok előfordulásuk és toxicitásuk miatt számos országban jogi szabályozás alatt állnak. A JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), WHO (World Health Organization), és FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) értékeli a mikotoxinok kockázatát. Az Európai Unióban az FDA (Food and Drug Administration) és EFSA (European Food Safety Authority) tanácsával az Európai Bizottság bocsájt ki ajánlásokat.

A hatóságok szerte a világon határértékeket határoztak meg az élelmiszerekhez kapcsolódó mikotoxinok megengedett legmagasabb szintjére, és ezek eléggé eltérő értékek. Hazánkban az Európai Bizottság 1881/2006. számú rendelete szabályozza az élelmiszerekben megtalálható mikotoxinok elfogadható értékét.

Az Európai Bizottság 1881/2006/EK rendelete (illetve ezek módosításai: 1126/2007/EK, 565/2008/EK) az élelmiszerekre vonatkozó megengedett mikotoxin határértékekről szól ([Rendelet - 1881/2006 - EN - EUR-Lex \(europa.eu\)](#)). A szabályozás AFB1, OTA, DON, ZEA határértékeket ír elő különböző termékekben. Állati eredetű élelmiszerekből csak a tejre vonatkozó AFM1 határértéket (50 ng/l) láthatunk.

Az Európai Unióban és hazánkban a takarmányokra előírt AFB1 határértékeket a 2003/100/EK irányelv határozza meg. Az Európai Bizottság 2006/576/EK rendelete a DON, ZEA, OTA, T-2, HT-2, és a fumonizinek állati takarmányokra vonatkozó szabályozásait foglalja össze ([EUR-Lex - 32006H0576 - EN - EUR-Lex \(europa.eu\)](#)).

2.7. Erjesztett takarmányokban előforduló mikroba közösség

Az erjesztés során keletkezett termékekben megtalálható biológiai kockázatok a patogén mikroorganizmusok, és mikotoxinok mellett a kialakuló különböző mikrobacsoportok szerepének megértése fontos a termékek biztonságának javítása érdekében. A fermentációhoz felhasznált alapanyagok aerob és anaerob mikroorganizmusokat, baktériumokat és gombákat tartalmazhatnak, amelyek befolyásolják a termék minőségét.

A LAB-okat négy fő nemzetségbe sorolják: *Lactococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc* és *Pediococcus*. Gram pozitív baktériumok, melyek jellemző tulajdonsága a tejsavas erjesztés. A homofermentatív *Lactiplantibacillus*-ok esetében a piroszőlősav közvetlenül tejsavvá alakul. A heterofermentatív LAB-ok végterméke viszont változó,

ugyanis tejsav mellett ecetsav és etanol is keletkezik. A *Lactiplantibacillus* és *Carnobacterium* nemzetségbe tartozó baktériumok pálcika alakúak, a többi törzsbe tartozó baktériumok coccusok, melyek láncokba (*Streptococcus*) vagy egyéb alakzatokba (*Pediococcus*) rendeződnek (Holzapfel és mtsai, 2014). A szilázsban megtalálható LAB-ok számos nemzetségből származnak (*Lactiplantibacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, és *Leuconostoc*) (Pahlow és mtsai, 2003). Antimikrobiális hatásuk a szerves savak, és az antagonista vegyületek termelésével magyarázható (Magnusson és mtsai, 2003).

A LAB-ok fontos szerepet játszanak az élelmiszerek fermentációjában, és megtalálhatók az emberi és az állati bélesatornában, és nyálkahártyában (Holzapfel és mtsai, 2014). Ezen baktériumokat a romlás megelőzésére használják, valamint a takarmányok és élelmiszerek eltarthatóságának növelésére (Dalié és mtsai, 2010). A LAB-ok a legnépszerűbb probiotikus mikroorganizmusok, melyek kedvező egészségügyi hatással rendelkeznek (Zoghi és mtsai, 2014). A különböző funkcionális tulajdonságokkal rendelkező LAB-ok kiváló mikrobiális erőforrások a fermentációs ipari termelés számára (Cretenet és mtsai, 2011).

A LAB-ok élelmiszerekben való felhasználása nagyon biztonságos, hiszen az emberi bélrendszerben természetesen szaporodnak. A fermentált élelmiszer-előállításban használt starter kultúrák elsődleges összetevőjeként a LAB-ok tagjai kiemelt ipari jelentőségűek (McAuliffe, 2018).

Erjesztés szempontjából káros mikroorganizmusok lehetnek az aerob *Bacillus* fajok, a vajsavbaktériumok, az élesztőgombák és a penészgombák. Az aerob *Bacillus* fajok csak az erjesztés kezdetén, vagy a rosszul lezárt silóban tudnak működni, az erjeszhető szénhidrátokat fogyasztják. A vajsavbaktériumok obligát anaerobok és a szénhidrátból, tejsavból és aminosavból vajsavat állítanak elő. Az élesztőgombák anaerob viszonyok között fermentálnak, aerob körülmények között légzéssel szaporodnak. A cukrokat, és a tejsavat alkohorra és CO₂-ra bontják. A penészgombák aerobok, melyek csak a rosszul lezárt vagy nem megfelelően tömörített silókban jelentkeznek, ezek másodlagos anyagcseretermékeik a mikotoxinok. Ezért nagy jelentőségű a fermentáció megfelelően oxigénmentes közegének a fenntartása a silózás során.

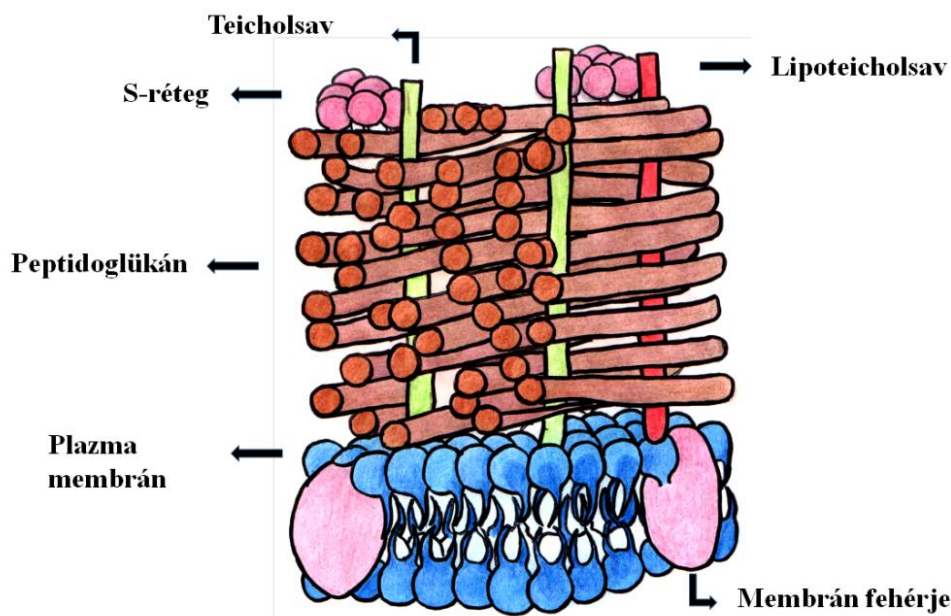
2.8. Baktériumok mikotoxin rezisztenciája és elimináló képessége

A mikotoxinokkal szembeni védekezés egyik lehetséges módja a biológiai méregtelenítés, ezek biodegradációs és bioszorpciós folyamatokat foglalnak magukban (Ji és mtsai, 2016; Peles és mtsai, 2021). A mikotoxinok baktériumok általi eliminációja történhet biopolimerekhez (pl. peptidoglikán, PG) történő adszorpcióval, enzimekkel (pl. észteráz; Wang és mtsai, 2017) történő lebontással, vagy különböző molekulákhoz való enzimatisz konjugáció révén, ami maszkolt mikotoxinokat eredményezhet (Freire és Sant'Ana, 2018). Ugyanakkor lehetséges, hogy a mikrobák egyszerűen gátolják a penészgombák szaporodását különböző metabolitok, például bakteriocinok és savtermelés által (Kim és mtsai, 2021) és így közvetve, a mikotoxinok termelését is.

A bakteriális sejtfal védelmet nyújt a környezeti hatásokkal szemben, egyedi összetevőkből áll, felelős az eltérő alakért, receptorhelyet biztosít. A baktériumok sejtfala számos biopolimerből áll, melyek képesek a mikotoxinok adszorpciójára. Ezért fontos megismernünk a Gram-pozitív, és negatív sejtfal sajátosságait, az eltérő vastagságú PG réteg, és a külső membrán jelenléte okozta különbségeket. A Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok sejtfala közötti különbségek lehetővé teszik a különböző szintű mikotoxin eliminációt.

A LAB-ok sejtfalában a PG szerkezete ismétlődő N-acetil-glükózamin (NAG) és N-acetilmuramil diszacharid (NAM) egységből áll, melyekben peptidek kapcsolódnak az egyes NAM-ok D-laktül frakciójához (Meroueh és mtsai, 2006). A PG szerkezete megváltozhat egyes kezelések, különösen hő és sav hatására. Hő hatására a fehérje lebomlik, a sav pedig lebontja a glikozidos kötéseket a poliszacharidban valamint feltöri az amid kötéseket (Lili és mtsai, 2018). A PG réteg és a keresztkötések vastagsága csökkenhet, a pórusméret kitágulhat.

A Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok között a PG réteg vastagsága eltérő (12. - 13. ábra). A Gram-pozitív baktériumok vastagabb PG réteggel rendelkeznek, mint a Gram-negatívok. A Gram-pozitív baktériumok sejtfalában teicholsav, és lipoteicholsav kapcsolódik (12. ábra). A teicholsav a PG-hoz, a lipoteicholsav pedig a citoplazmamembránhoz kapcsolódik, így rögzíti a PG réteget.

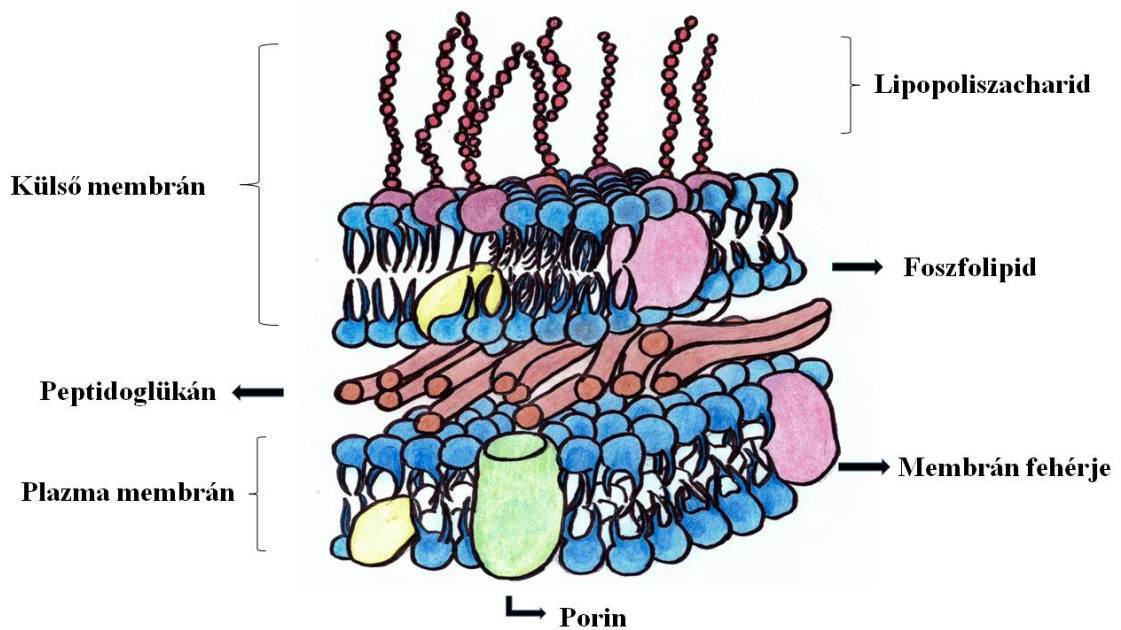


12. ábra Gram-pozitív sejtfa strukturális felépítése (saját szerkesztés)

A Gram-pozitív LAB-ok gyakran vannak említve a mikotoxinok eliminációjával kapcsolatban. Három lehetséges eliminációs mechanizmus ismert: mikotoxinok LAB enzimek általi lebontása, a sejtek általi adszorpciója, és a LAB metabolitok mikotoxinokkal történő kölcsönhatása (Muhialdin és mtsai, 2020).

A LAB-ok metabolikus hatásuk segítségével képesek eltávolítani a mikotoxinokat az élelmiszerekből (Arab és mtsai, 2012). A LAB törzsek csökkentik az élelmiszerekkel kapcsolatos gazdasági veszteségeket, azáltal, hogy meghosszabbítják az eltarthatóságukat, és megakadályozzák a mikotoxin termelést (Hatab és mtsai, 2012). A LAB törzsek tenyészetként alkalmazhatóak élelmiszerekben, például tejtermékekben található mikotoxinok eltávolítására (Mousavi Khaneghah és mtsai, 2017).

A Gram-negatív baktériumok sejtfa lipopoliszacharidot (LPS), lipoproteint, és fehérjéket tartalmaz (13. ábra).



13. ábra Gram-negatív sejtfa strukturális felépítése (saját szerkesztés)

Az S-réteg fehérje szerepet játszik a permeabilitás szabályozásában, a burok biogenezisében, a mozgékonyágban, és a ragadozók elkerülésében (Beeby, 2020). A csillós *Tetrahymena* esetében, a *Synechococcus* sejtjeinek rezisztenciáját a mikrobiális S-réteg védő funkciójának tulajdonították (Matz és Kjelleberg, 2005). A Gram-negatív baktériumok S-rétege az LPS-hez kötődik. Az LPS megvédi a baktériumokat a kis molekuláktól, a fagocitózistól, O-antigénje leköti az S-réteget (Beeby, 2020). A lipopoliszacharidok eltérőek a különböző Gram-negatív baktériumokban, és az alábbi részekből állnak: egy lipidrész (Lipid A), egy glikozid rész (kb. 10 monoszacharid magból áll), és egy O lánc (1-8 monoszacharid ismétlődő alegységéből áll) (Caroff és Karibian, 2003).

3. Anyag és Módszer

3.1. Felhasznált anyagok

3.1.1. Vizsgált erjesztett takarmányminták

Kutatásom során a következő silótakarmány mintákat használtam fel: kukorica szilázs (14 A. ábra), lucerna szilázs, lucerna szenázs (14 B. ábra), tritikálé szenázs, rozs szilázs, rozs szenázs (14 C. ábra).



14. ábra Kukorica szilázs minta (A), Lucerna szenázs minta (B), Rozs szenázs minta (C) (saját forrás)

Az erjesztett takarmányokat az erjesztés utolsó szakaszában (4-6 hét elteltével) gyűjtöttem be 2019-2020-ban, Magyarországon, Hajdú-Bihar vármegye különböző tejelő szarvasmarha telepeiről. A termelők telephelyenként tíz párhuzamos mintát gyűjtöttek frissen nyitott silókból és bálákból, ezeket steril tépőzáras zacskókba (min. 5 kg) egyesítve, polisztírol dobozokban hűtőgéssel szállítottam a laboratóriumba (Adácsi és mtsai, 2022a). Az elemzésig minden mintát -20 °C-on tároltam.

3.1.2. Tejminták

A nyerstej minták random, különböző telepekről származtak. 100 ml nyerstej került begyűjtésre a tartálykocsikról az Alföldi Tej Kft. (Debrecen) átvevő helyén. A tejminta hűtve került beszállításra, ahol a vizsgálatig -20 °C-on tároltam.

3.1.3. Mikroorganizmusok

Dolgozatom során az alábbi mikroorganizmusokat alkalmaztam: *Lactococcus lactis ssp. lactis* R703, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12, *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* 431 (Chr. Hansen A/S, Dánia), *Lactiplantibacillus plantarum* NCAIM B01074. Az utóbbi törzset a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (MATE Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet) biztosította.

A 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 µl-es aliquot részekben Eppendorf-csővekbe osztottam a kezelésekhez. A sejtkoncentrációt telepképző egység (TKE)/ minta tömeg (térfogat) dimenzióban fejeztem ki (10^9 TKE/ml). A mosott, újraszuszpendált tenyészetet PBS-ben (Sigma-Aldrich) hígítottam, és a koncentrációkat MRS agar táptalajon lemezszámláló módszerrel ellenőriztem. Az aliquot részeket -18 °C-on tároltam.

3.1.4. *In vitro* szilázs készítésnél felhasznált kukorica növény

A kukorica növényi anyag a DE MÉK Bemutatókertben termesztett Sy Orpheus kukorica volt, a termesztésében a DE MÉK Precíziós Növénytermesztési Kutatás-fejlesztési Szolgáltató Központ segített. A tejes érésénél a teljes növény begyűjtésre került, a növény anyag aprítását követően száraztömeg került meghatározásra, és silótakarmányt készítettem.

3.2. Mikrobiológiai analízis

3.2.1. Mintaelőkészítés

Mikrobiológiai mintaelőkészítés során 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. Ezt követően a szuszpenziókból további decimális hígításokat készítettem.

3.2.2. Összes mikrobaszám meghatározása

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.

3.2.3. Tejsavbaktériumok száma

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

3.2.4. Penészgombák száma

A penészgombákat felületi szélesztéses módszerrel határoztam meg kloramfenikol-glükóz-agar (CGA) (Scharlab) táptalajon. Az inkubálás 25 °C-on öt napig tartott.

3.2.5. Mezofil szulfitredukáló *Clostridium* szám

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

3.3. Mikotoxin kimutatás

3.3.1. 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 acetonnitril: víz (10:90) eluenssel.

A DON mikotoxin eliminációs vizsgálatnál a DON 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, 2022) 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 aflatoxin 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 µm) fluoreszcencia detektorral (ex274 nm, em440 nm) használtam, acetonitril-víz-metanol (46: 46:8) eluenssel.

A ZEA-nak kitett mintákban a felülúszók és a pellett mikotoxintartalmát 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 ZearalaTest™ (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 µg/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.

3.3.2. 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 vájaitaiba 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 ($n = 4$, $CV\% \leq 5\%$).

3.4. Baktériumtörzsek izolálása

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.

3.5. Izolált baktériumok azonosítása MALDI-TOF MS módszerrel

Az MRS, és a PCA táptalajról 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 legmagasabb pontszámú baktériumokat taxonómiaileg azonosnak tekintettük az izolátumokkal. Csak az 1,95 feletti pontszámokat tekintettük érvényes eredményeknek.

3.6. Izolált baktériumok 16S rRNS alapú azonosítása

3.6.1. A genomi DNS izolálása

A baktériumtenyészetek egyedi kolóniáit izoláltam tápagar lemezekről, és Nutrient Broth-ba (Scharlab, Barcelona, Spanyolország) oltottam.

A DNS extrakciós protokoll (Wilson, 2001) a következő volt: 16 órás tenyészetből 200 µl-t összekevertem 1000 µl CTAB (Biochemica) lízis pufferrel {2% w/v Cetrimonium bromid CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 8,0} (Appllichem 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), Precellys 24 homogenizálóval (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Németország) végeztem, majd 10 perc 18600 g (centripetális gyorsulás) centrifugálás következett. 600 µl felülúszóhoz 240 µl kloroformot adtam, 30 másodpercig kevertem, 20 percig centrifugáltam, 18600 g (centripetális gyorsulás)

alkalmazásával. 400 µl felső vizes fázist 400 µl izo-propanollal kevertem, majd 10 percig 18600 g (centripetális gyorsulás) alkalmazásával centrifugáltam. A felülúszó leöntését követően 500 µl 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 eltávolítottam, és a pelletet szobahőmérsékleten száradni hagytam. A száraz DNS pelletet 500 µl steril vízben oldottam.

3.6.2. DNS tisztítási protokoll

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.

3.6.3. PCR reakció

A PCR reakciót iProof High-Fidelity PCR Kit-el (BIO-RAD Ltd., Hercules, CA, USA Litvánia) végeztem. A genomi DNS-t a polimeráz láncreakció 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.

3.6.4. PCR termék tisztítása

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 a megismételtem a mosási lépést. Centrifugáltam 1 percig 11000 g 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.

3.6.5. Az izolált baktériumok azonosítása

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.

3.7. Baktériumok mikotoxin rezisztenciája

Minden rezisztencia vizsgálathoz Biopure mikotoxin oldatokat (Romer Labs, Tulln, Ausztria) alkalmaztam megfelelő hígításban. Az izolátumokat LAB-ok esetében MRS táplevesbe (Scharlab) más baktériumok esetében Nutrient táplevesbe (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 mikrotiterlemezre 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 mikrotiterlemezleolvasóban (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. órás 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.

3.8. Bakteriális sejtfrakciók készítése

A baktériumtörzseket Nutrient Broth/MRS táplevesben (Scharlab, Barcelona, Spanyolország) tenyésztettem (16 óra, 30 °C), és az exponenciális fázisú tenyészeteket centrifugáltam (6100 g, 10 perc, 4 °C). Ezt követően a felülúszókat eltávolítottam, és a pelletet háromszor mostam 200 µl steril PBS-el (Sigma-Aldrich). Mosást követően a pelleteket (100 µl) különböző vegyszerekkel (200 µl) kezeltem (Niderkorn és mtsai, 2009; Goh és mtsai, 2009), mely során különféle frakciókat kaptam (1. táblázat). A kezeletlen, életképes sejteket csak PBS-el (Sigma Aldrich) mostam. A kezeléseket követően a mintákat centrifugáltam (18600 g, 10 perc), a felülúszót leöntöttem, és a pelletet 3x 200 µl PBS-el (Sigma-Aldrich) mostam. A baktériumsejteket és a sejtfalfrakciókat -20 °C-on tároltam.

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 frakció
1 M LiCl 100 °C, 15 perc	S-réteg fehérje
1 M HCl 100 °C, 15 perc	teicholsav frakció

3.9. Baktériumok mikotoxin eliminációs képességének vizsgálata

A DON, ZEA, AFB1, OTA illetve AFM1 (BIOPURE, Romer Labs, Tulln, Ausztria) toxinokat megfelelő hígításban alkalmaztam a mikotoxin eliminációs tesztekhez.

A mikotoxinokat PBS-el (Sigma-Aldrich) 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.

Az alkalmazott toxinkoncentrációk a szakirodalmi kutatásokban megtalálható takarmányminták átlagos toxintartalmán, és előzetes mikotoxin tolerancia vizsgálatokon alapultak (Adácsi és mtsai, 2022b).

Minden mikotoxinnal kiegészített mintát PBS-ben (Sigma-Aldrich) 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 3.3.1 fejezetben leírtak szerint. Minden vizsgálatot három párhuzamosban végeztem, pozitív (sejtek, vagy sejtfalfrakciók nélkül) és negatív (mikotoxin nélkül) kontrollokat is alkalmaztam.

3.10. Észteráz aktivitás

Az enzimaktivitást spektrofotometriásan mértem Castillo és munkatársai (1999) módszere szerint.

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.

3.11. Szilázs készítés

A begyűjtött, szecskázott nedves kukorica növény 0,1 v/v% hangyasavval kezeltem. A hangyasav csökkenti a szilázs pH értékét, gátolja a rothasztó mikrobák növekedését, az erjedési folyamat így hatékonyabb. A *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 volt. Beoltott törzsként *Lactiplantibacillus plantarum* NCAIM B01074 16 órás tenyészetét használtam. Összesen négyféle összetételű szilázs volt 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.

3.12. Szárztömeg meghatározása

Az erjesztett takarmánymintákat (kukorica, lucerna, rozs) vagy a kukoricát három párhuzamosban szárítottam ($60\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) szárítószekrényben (UN55, Memmert GmbH, Németország). Szárítás előtt és után a minták tömegét lemértem, amiből szárztömeget számítottam ($n = 3$; a CV%, a variációs koefficiens $\leq 10\%$). 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).

3.13. pH érték meghatározás

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

3.14. Tejsav 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. Ezt követően szűrtem {redős szűrőpapír, majd $0,45\text{ }\mu\text{m}$ pórusú Spartan fecskendőszűrő (Merck)}. Az átszűrt mintát Phenomenex (Torrance, CA, USA) RP-C18 oszlopot ($125 * 4\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) DAD detektorral használtam UV 218 nm-en, acetonitril: víz (10:90) eluenssel. Az alsó detektálási határ (LOD) $0,1\text{ mg/kg}$.

3.15. Illósav tartalom meghatározása

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. Ezt követően redős szűrőpapír, majd $0,45\text{ }\mu\text{m}$ -es Spartan fecskendőszűrővel (Merck) történt a minták szűrése. Az alábbi komponenseket gázkromatográfia segítségével Békési Ádám (DE MÉK Agrárműszerközpont) mérte: ecetsav, propionsav, i-vajsav, n-vajsav, n-vajsav, i-valeriánsav, n-valeriánsav, i-kapronsav, n-kapronsav, heptánsav. A

gázkromatográfia körülményeit a 2. táblázat mutatja be. A standard Fatty Acid Methyl Esters (FAME) mix volt (Sigma-Aldrich). LOD= 0,002 m/m%, n = 3.

2. táblázat: A gázkromatográfia körülményei

Készülék	Varian CP 3800 (Varian Inc, Walnut Creek, CA, USA)
Kolonna	Varian CP-Wax 52 CB, 30 m * 0.25 mm ID; 0,25 µm
Vivőgáz	2,0 ml/min hélium, constant flow
Mintatérfogat	1 µl
Injektor	240 °C, split: 1:10
Hőmérséklet program	95 °C, 14,5 °C/min, 185 °C (hold: 2,5 min)
Detektor	lángionizációs detektor (FID), 230 °C

3.16. Statisztikai analízis

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

4. EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁSUK

4.1. Az ipari erjesztett takarmányminták jellemzése

A vizsgált erjesztett takarmányok száraztömege 19% és 71% között mozgott, a nagy különbséget a fermentált takarmányok kora és összetétele magyarázta (3. táblázat).

3. táblázat: Az erjesztett takarmányminták száraztömege (n = 3)

Sorszám	Erjesztett takarmányok	Szárazanyag tartalom (%)
1	Kukorica szilázs	71
2	Kukorica szilázs	32,5
3	Kukorica szilázs	29
4	Kukorica szilázs	19
5	Kukorica szilázs	38
6	Kukorica szilázs	46
7	Kukorica szilázs	44
8	Kukorica szilázs	30
9	Kukorica szilázs	51
10	Kukorica szilázs	40
11	Kukorica szilázs	44
12	Kukorica szilázs	39
13	Kukorica szilázs	31
14	Kukorica szilázs	26
15	Lucerna szilázs	30
16	Lucerna szilázs	36
17	Lucerna szilázs	46
18	Lucerna szenázs	33
19	Rozs szilázs	29
20	Rozs szenázs	27
21	Tritikálé szenázs	68
22	Tritikálé szenázs	32

Az erjedés végén többnyire savtűrő szervezetek és spórák maradnak életben. A fermentált takarmányok mikrobaszáma nagyon változó volt, mivel az összes aerob telepszám logaritmikus értéke 3,265 és 7,254 log₁₀ TKE/g között mozgott. Az MRS agar táptalajból származó telepszámok logaritmikus értéke 1,778 és 6,167 log₁₀ TKE/g között volt. Mezofil szulfiteduláló *Clostridium*-ok számban változóan voltak jelen a

mintákban ($1-5,4 \log_{10}$ TKE/g). A legtöbb mintát alacsony penészszám jellemezte ($1 \log_{10}$ TKE/g), de néhány minta magas penészszennyeződést ($3,00 - 6,079 \log_{10}$ TKE/g) tartalmazott (4. táblázat).

4. táblázat: A vizsgált fermentált takarmányok mikrobiális összetételének jellemzése. A PCA, az MRS agar és a CGA agaron számolt telepszámot logaritmikus formában fejeztem ki ($n = 3$; $CV\% \leq 10\%$)

Sorszám	Erjesztett takarmányok	Összcsíraszám (\log_{10} TKE/g)	Tejsavbaktérium szám (\log_{10} TKE/g)	Penészszám (\log_{10} TKE/g)
1	Kukorica szilázs	3,265	2,041	2,204
2	Kukorica szilázs	6,068	6,000	1,000
3	Kukorica szilázs	6,740	6,176	1,000
4	Kukorica szilázs	6,526	4,176	1,000
5	Kukorica szilázs	3,397	2,000	1,000
6	Kukorica szilázs	5,247	3,813	1,000
7	Kukorica szilázs	5,656	3,756	3,477
8	Kukorica szilázs	6,830	5,079	1,602
9	Kukorica szilázs	4,991	3,279	1,000
10	Kukorica szilázs	6,755	5,415	6,079
11	Kukorica szilázs	6,884	4,079	1,699
12	Kukorica szilázs	4,341	2,908	1,000
13	Kukorica szilázs	4,235	1,845	1,000
14	Kukorica szilázs	5,965	5,176	4,146
15	Lucerna szilázs	6,522	5,041	3,176
16	Lucerna szilázs	7,254	4,851	1,000
17	Lucerna szilázs	6,377	4,000	1,301
18	Lucerna szenázs	4,289	1,778	1,000
19	Rozs szilázs	5,886	4,322	1,000
20	Rozs szenázs	4,170	2,398	1,477
21	Tritikálé szenázs	6,715	5,362	2,903
22	Tritikálé szenázs	5,705	2,544	1,000

A fermentált takarmányokból 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, AFB1-et és AFG2-t, és bizonyos esetekben a ZEA-t is

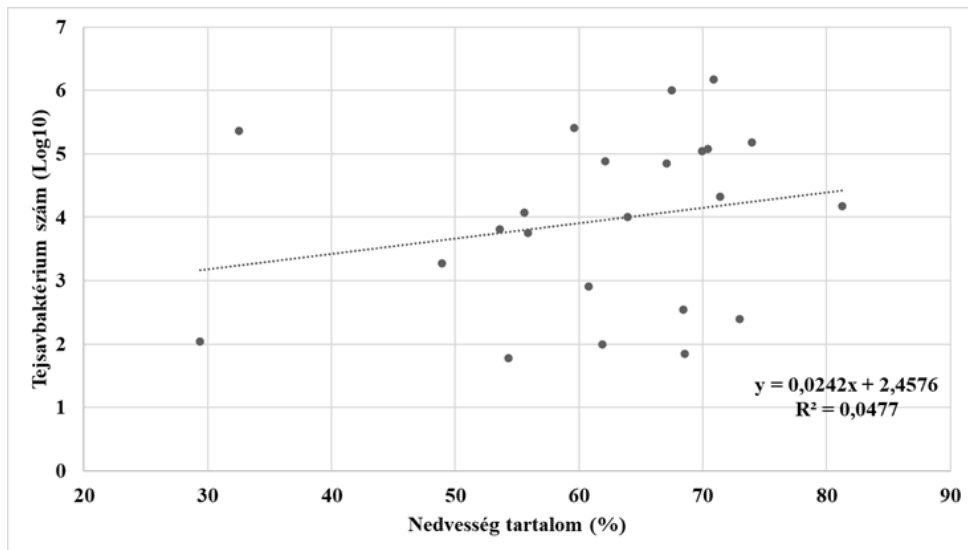
mértem a fermentált takarmányokban. Az erjesztett lucerna termékekben az OTA, és az AF szennyezés jellemző volt mind a szilázs, mind a szenázs mintákban, és a szilázsban a DON is kimutatható volt (5. táblázat).

5. táblázat: A erjesztett takarmányminták toxikológiai jellemzése. Az AF-at, az OTA-t, a DON-t és a ZEA-t HPLC technikával mértem szárított mintákból, és a fermentált takarmányok száraz tömegére vonatkozó mikotoxin-tartalomban fejeztem ki (n = 3, CV% ≤ 10%).

Sorszám	Erjesztett takarmányok	AF (µg/kg)	OTA (µg/kg)	DON (mg/kg)	ZEA (mg/kg)
1	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	<0,1	<0,1
2	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	<0,1	<0,1
3	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	<0,1	<0,1
4	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	<0,1	<0,1
5	Kukorica szilázs	B1 1,15	<0,5	3,25	<0,1
6	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	1,07	<0,1
7	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	1,35	<0,1
8	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	0,47	<0,1
9	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	1,03	<0,1
10	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	2,57	0,42
11	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	1,19	<0,1
12	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	1,24	<0,1
13	Kukorica szilázs	G2 0,045 B1 <0,01	<0,5	<0,1	<0,1
14	Kukorica szilázs	<0,01	<0,5	<0,1	<0,1
15	Lucerna szilázs	<0,01	<0,5	0,45	<0,1
16	Lucerna szilázs	<0,01	0,80	<0,1	<0,1
17	Lucerna szilázs	<0,01	2,52	<0,1	<0,1
18	Lucerna szenázs	G2 24,23 B1 <0,01	27,57	<0,1	<0,1
19	Rozs szilázs	<0,01	<0,5	<0,1	<0,1
20	Rozs szenázs	G2 0,301 B1 <0,01	<0,5	<0,1	<0,1
21	Tritikálé szenázs	<0,01	<0,5	<0,1	<0,1
22	Tritikálé szenázs	<0,01	<0,5	<0,1	<0,1

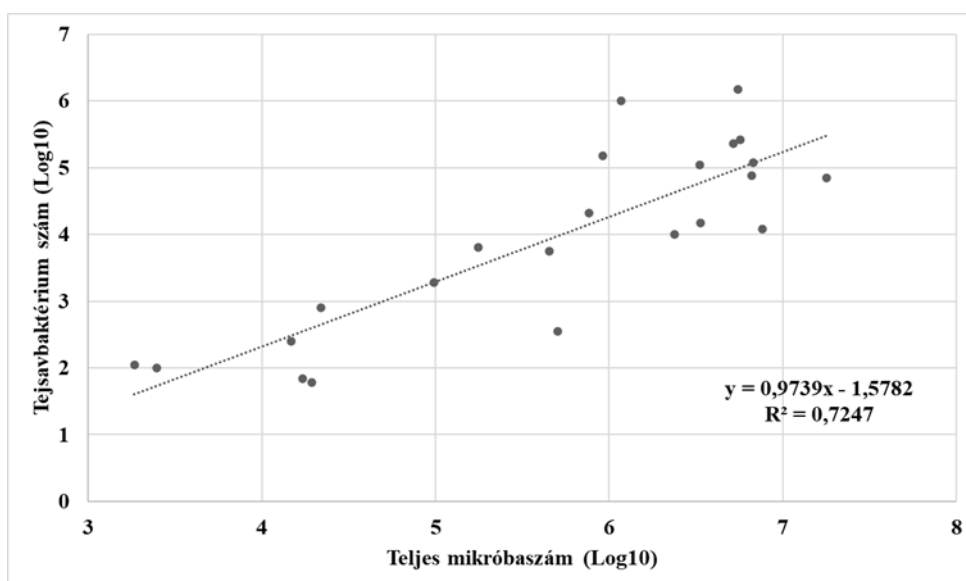
A végső összes mikrobaszám nagyrészt LAB-ból állt, és életképes sejtszámuk nem függött a takarmány végső víztartalmától, mivel a Pearson-féle korrelációs együttható

csak 0,219 volt, a fermentált takarmányok nedvességtartalma (29-81%), és az életképes LAB szám között (15. ábra).



15. ábra A víztartalom és a tejsavbaktérium szám Pearson-féle korrelációja a fermentált takarmányokban

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 (16. ábra, 6. táblázat). A mezofil szulfitredukáló *Clostridium*-ok száma nem korrelált sem az összes mikrobaszámmal, sem a LAB számmal.



16. ábra A teljes mikróbaszám és a tejsavbaktérium szám Pearson-féle korrelációja a fermentált takarmányok végső szakaszában

A tritikálé szenázs mintákat alacsony mikotoxintartalom mellett viszonylag magas LAB szám jellemezte (2,5-5,3 log₁₀ TKE/g) (4. és 5. táblázat).

A magas penészszenyeződés semmilyen esetben sem mutatott összefüggést a magas mikotoxintartalommal. A 10. minta esetében magasabb DON (2,57 mg/kg) értéket lehet tapasztalni magasabb penészs szám (6,079 (log₁₀ TKE/g) mellett, de markáns korreláció nincs. Ez köszönhető volt a penészsporák eltérő perzisztenciájának, illetve a mikotoxinok degradációjának. A LAB-oknak csak nagyon gyenge negatív korrelációja volt a mikotoxinokkal (AF: -0,360; OTA: -0,339), (6. táblázat).

6. táblázat: A fermentált takarmányokból mért mikrobaszámok és mikotoxinok Pearson-féle korrelációs együtthatói

	összes mikrobaszám	LAB	penészgomba szám	AF	OTA	DON	ZEA
összes mikrobaszám	1						
LAB	0,848	1					
penészgomba szám	0,268	0,363	1				
AF	-0,271	-0,360	-0,144	1			
OTA	-0,226	-0,339	-0,148	0,993	1		
DON	-0,196	-0,123	0,316	-0,112	-0,158	1	
ZEA	0,208	0,240	0,707	-0,050	-0,053	0,490	1

4.2. Erjesztett takarmány eredetű baktériumok azonosítása

Az 7. táblázat szemlélteti a fermentált takarmányokból MALDI TOF MS-sel azonosított baktériumokat.

A kukoricaszilázsban leggyakoribb talált LAB a *Lactiplantibacillus plantarum* volt. A lucerna szilázs mikroba közösségének nagy százalékát (78%) a *Lactiplantibacillus pentosus* jellemezte, míg a rozsszilázs- és szenázsmintákban a *Pediococcus*-ok voltak a tipikus baktériumok. Az aerob spóráképző baktériumok egy részét (pl. *Lysinibacillus spp.*, *Rummeliibacillus spp.*, és *Bacillus spp.*), valamint egy enterobaktériumot, a *Klebsiella pneumoniae*-t is izoláltam, és jellemeztem az erjesztett takarmányokból (7. táblázat).

7. táblázat: Fermentált takarmányokból származó baktérium izolátumok azonosítása. Az izolátumok azonosítása a baktériumok fehérjeprofilja alapján két ismétlésben történt MALDI-TOF MS technikával. Az 1,950 alatti pontszámú azonosítást bizonytalan azonosításként határoztam meg, és az elemzést megismételtem

Eredet	Azonosított organizmus	Azonosító	Izolátumonkénti legmagasabb MALDI-TOF érték
kukorica szilázs	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	AMKB1/3	2,292
		AMKT9/3	2,261
		AMK5/1	2,317
		AMK5/2	2,295
		AMK5/3	2,343
		AMK7/13	2,297
		AMK7/15	2,242
		AMK8/5	2,379
		AMK10/3	2,382
lucerna szilázs	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	AMK6/1	2,377
		AMK6/4	2,211
		AMK6/15	2,235
		AMK6/9	2,181
		AMK6/16	2,271
		AMK6/17	2,283
		AMK6/18	2,273
kukorica szilázs		AMK7/14	2,338
		AMK11/1	2,391
kukorica szilázs	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	AMK12/2	2,327
kukorica szilázs	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	AMKB4/3	2,473
kukorica szilázs	<i>Levilactobacillus brevis</i>	AMK11/3	2,226
		AMKT3/3	2,226
kukorica szilázs	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AMK12/1	2,214
rozs szilázs	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AMK13/1	2,21
		AMK13/2	2,207
kukorica szilázs	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	AMKB6/3	2,239
kukorica szilázs	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMK8/2	2,39
kukorica szilázs	<i>Bacillus thuringiensis</i>	AMK10/1	2,137
kukorica szilázs	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	AMK10/2	1,959
lucerna szenázs	<i>Rummeliibacillus suwonensis</i>	AMK9/2	1,956
lucerna szenázs	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	AMK9/1	2,258

A fermentált takarmányokból származó bakteriális izolátumokat 97%-nál magasabb homológiával azonosítottam 16S rRNS génszekvenciák segítségével is. Négy Gram-pozitív endospóráképző organizmust is izoláltam, ezek taxonómiaiilag a *Firmicutes* törzshöz tartoztak. A *Rummeliibacillus suwonensis* (*Planococcaceae*) kivételével minden izolátum a *Bacillaceae* családba tartozott (Vos és mtsai, 2011; Federhen, 2015; Schoch és mtsai, 2020).

4.3. Erjesztett takarmány eredetű izolált baktériumok mikotoxin rezisztenciája

A tiszta baktériumtenyészetek mikotoxin rezisztenciáját tanulmányoztam, hogy megtudjam, van-e a bakteriális szaporodásra gátló hatása a mikotoxinoknak, ami esetleg jelentősen akadályozhatná a fermentációs eljárásokat. A mikotoxinnal kezelt és kezeletlen bakteriális tenyészetek növekedési görbéi alapján azt állapítottam meg, hogy a vizsgált mikotoxin koncentrációk esetében a szervezetek általában erős rezisztenciát mutattak (8. táblázat).

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* AMKT3/3 esetében (2. melléklet). Az izolált spóráképző baktériumok (*Lysinibacillus spp.*, *Rummeliibacillus suwonensis* és *Bacillus thuringiensis*) és a *Klebsiella pneumoniae* növekedését 100 µg/l értékig az AFB1 nem befolyásolta (8. táblázat).

A DON (1000 µg/l) és a ZEA (500 µg/l) nem gátolta a sejtek szaporodását (3. és 4. melléklet).

Ugyanakkor általánosan kijelenthető, hogy az OTA a baktériumok szaporodásának gátlását okozta, 33-86%-os gátlás volt megfigyelhető 1000 µg/l OTA koncentráció mellett (8. táblázat), (1. melléklet).

8. táblázat: Fermentált takarmányokból származó baktériumizolátumok AFB1 és OTA rezisztenciája. A baktériumok növekedésének gátlását 24 µg/l AFB1-el, illetve 1000 µg/l OTA-val teszteltem (n = 4).

Eredet	Azonosított organizmus	Azonosító	AFB1 általi növekedésgátlás (24 µg/l)	OTA általi növekedésgátlás (1000 µg/l)
kukorica szilázs	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	AMKB1/3	0%	43%
		AMKT9/3	0%	45%
		AMK5/1	0%	66%
		AMK5/2	0%	67%
		AMK5/3	0%	33%
		AMK7/13	0%	48%
		AMK7/15	0%	69%
		AMK8/5	0%	52%
lucerna szilázs	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	AMK10/3	0%	64%
		AMK6/1	0%	64%
		AMK6/4	0%	61%
		AMK6/15	0%	58%
		AMK6/9	0%	47%
		AMK6/16	0%	57%
		AMK6/17	0%	65%
		AMK6/18	0%	61%
kukorica szilázs		AMK7/14	0%	80%
		AMK11/1	0%	39%
kukorica szilázs	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	AMK12/2	13%	77%
kukorica szilázs	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	AMKB4/3	0%	41%
kukorica szilázs	<i>Levilactobacillus brevis</i>	AMK11/3	0%	57%
		AMKT3/3	24%	25%
kukorica szilázs	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AMK12/1	0%	57%
rozs szilázs	<i>Pediococcus acidilactici</i>	AMK13/1	0%	53%
		AMK13/2	0%	53%
kukorica szilázs	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	AMKB6/3	12%	64%
kukorica szilázs	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMK8/2	0%	86%
kukorica szilázs	<i>Bacillus thuringiensis</i>	AMK10/1	0%	65%
kukorica szilázs	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	AMK10/2	0%	73%
lucerna szenázs	<i>Rummeliibacillus suwonensis</i>	AMK9/2	0%	54%
lucerna szenázs	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	AMK9/1	0%	46%

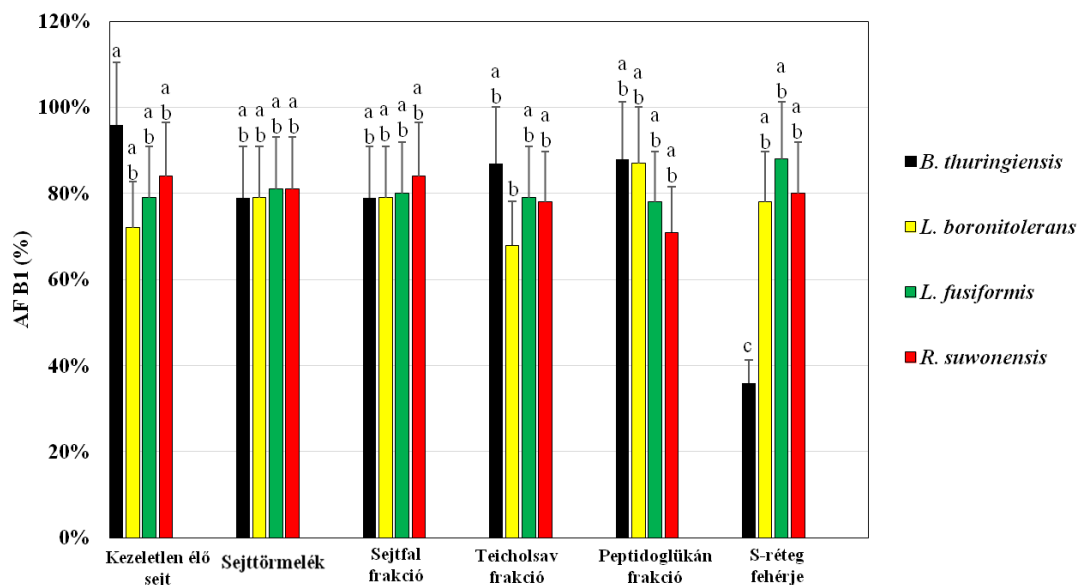
4.4. Erjesztett takarmány eredetű baktériumok élő sejtjeinek és sejtfalfrakcióinak mikotoxin eliminációja

Mivel ezen vizsgálat esetében, a VICAM módszer módosítására volt szükség, és nem használtam immunaffinitás kromatográfiát a tisztításnál, a HPLC méréseket ezért validálni kellett, így kivitelezéséhez kimértem a vizsgált mikotoxinokra jellemző analitikai értékeket (9. táblázat). Az ismétléseken belüli variációs együtthatókat kiszámítva, azok minden esetben 10% alattiak voltak.

9. táblázat: Vizsgált mikotoxinok HPLC kimutatási határa és retenciósi ideje

Mikotoxin	Kimutatási határ (LOD)	Retenciósi idő
AFB1	0,02 µg/l	10,3 perc
DON	0,05 mg/l	3,2 perc
ZEA	2,6 µg/l	8,9 perc

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 (17. ábra).



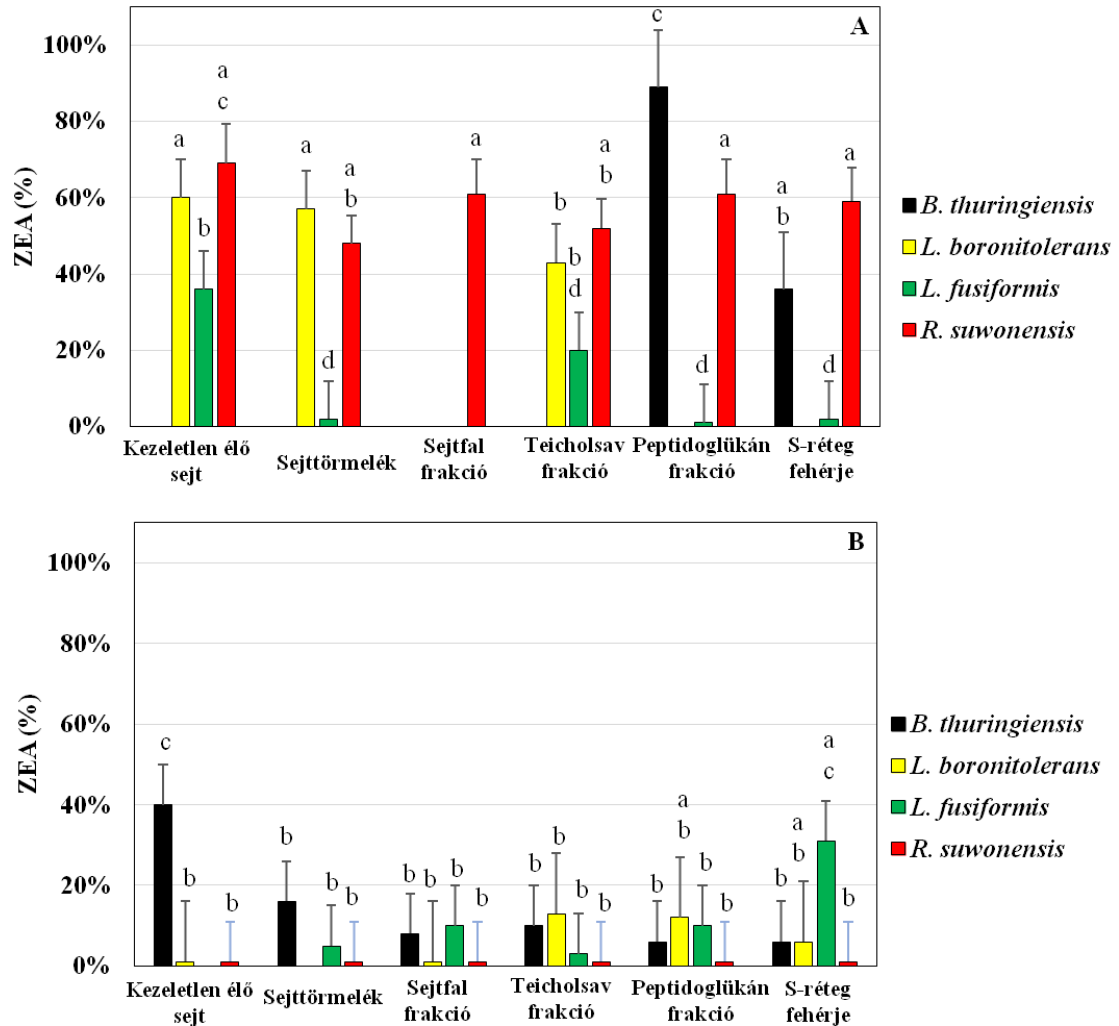
17. ábra *Bacillus thuringiensis* AMK10/1, *Lysinibacillus boronitolerans* AMK9/1, *Lysinibacillus fusiformis* AMK10/2 és *Rummeliibacillus suwonensis* AMK9/2 életképes sejtjeivel, és ezek baktériumpreparátumaival végzett AFB1 eliminációs tesztet követően a felülúszóból mért AFB1 (n = 3, CV% ≤ 15%). 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

A baktériumok élő sejtjei és sejtfal-preparátumai általi ZEA elimináció jelentős különbségeket mutatott (18. ábra). A baktériumsejtek és sejtfalpreparátumok kimagasló ZEA eliminációt mutattak (18. A. ábra). Az eliminált ZEA-t csak részben tudtam visszanyerni a baktériumokból, és a preparátumokból (18. B. ábra). Ezenkívül, az egyes baktériumok, és sejtfalkészítmények esetében a visszanyert ZEA mennyisége még a kimutatási határ (2,6 µg/l) alatt maradt. Ez felvetette a mikotoxin enzimes degradáció lehetőségét, ami viszont a preparátumok esetében a hőkezelés miatt alapvetően kétséges volt.

A 18. 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* AMK9/1 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 fehérjék: 6%) (18. ábra).

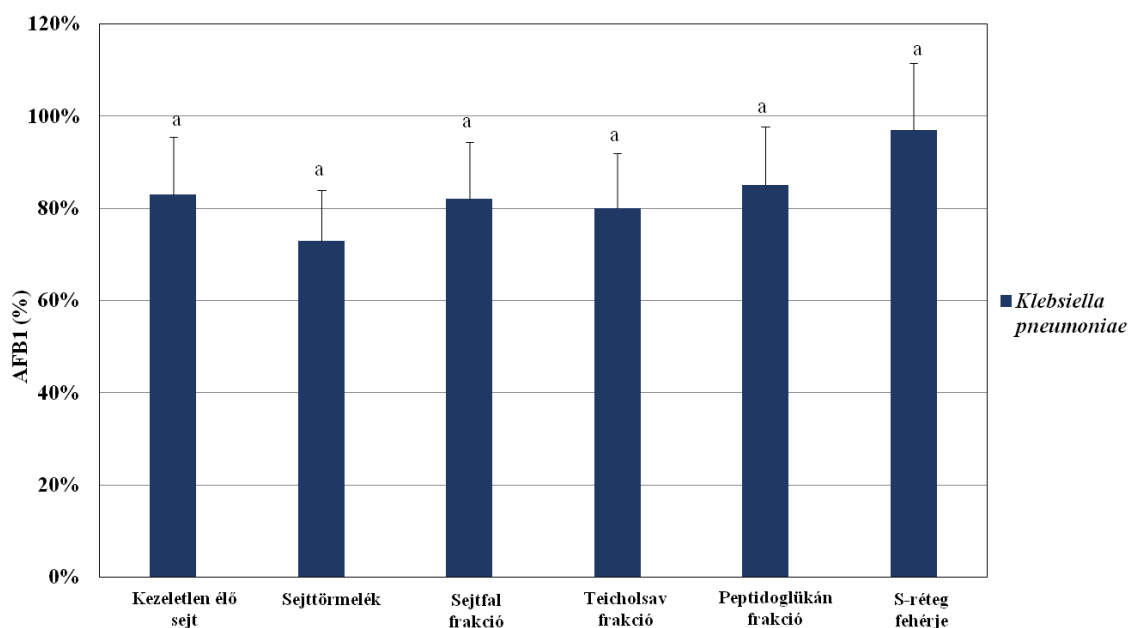


18. ábra *Bacillus thuringiensis* AMK10/1, *Lysinibacillus boronitolerans* AMK9/1, *Lysinibacillus fusiformis* AMK10/2 és *Rummelinibacillus suwonensis* AMK9/2 életképes sejtjeivel, és ezek baktériumpreparátumaival végzett ZEA eliminációs tesztet követően a felülúszóból (A), és a pelletből (B) mért ZEA 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, $p \leq 0,05$) egymástól

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 (18. 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 (18. B. ábra).

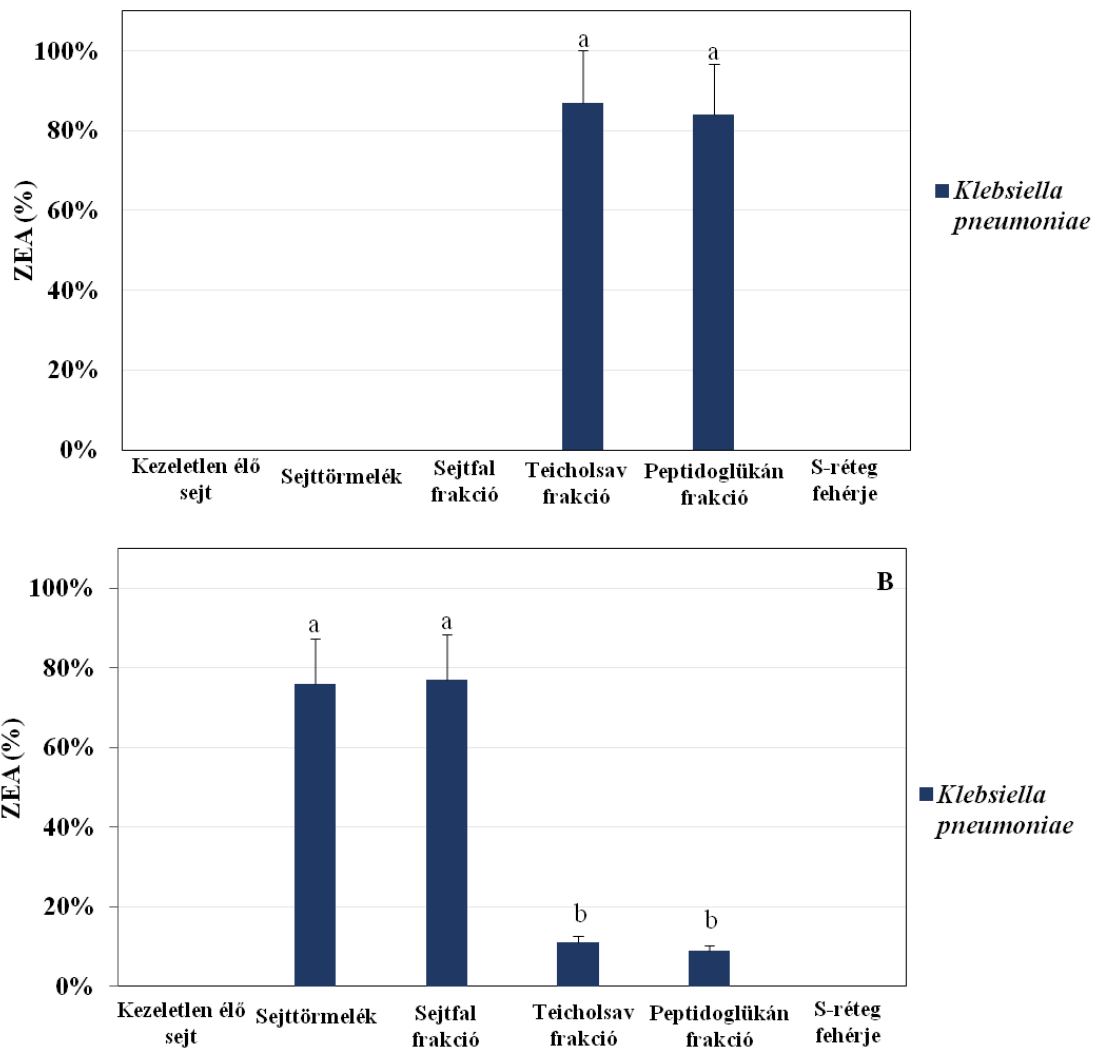
A *Bacillus thuringiensis* AMK10/1 esetében az életképes sejtek, sejtörmelék, a tisztított sejtfal, és a teicholsav frakció alkalmas volt a ZEA eltávolítására (18. A. ábra). A PG frakció esetében a ZEA elimináció elhanyagolható volt, míg a S-réteg fehérje frakciónál 38% volt. Az AMK10/1 sejtekből és sejtalfrakciókból ZEA szabadult fel az extrakció során (18. B. ábra).

A *Klebsiella pneumoniae* esetében DON eliminációt nem tapasztaltam. Az AFB1 eliminációja a PG (15%), tisztított sejtfal (18%), teicholsav (20%), és sejtörmelék (27%) frakcióknál szignifikáns volt (19. ábra).



19. ábra A *Klebsiella pneumoniae* életképes sejtjeivel, és ezek baktériumpreparátumaival végzett AFB1 eliminációs tesztet követően a felülrészéből mért AFB1 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 ZEA eliminációs vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a *Klebsiella pneumoniae* esetében a tisztított sejtfal (0%), S-réteg fehérje (0%), és a sejttörmelék (0%) felülúszójából nem mértem vissza ZEA-t, viszont a tisztított PG-nál (84%), és a teicholsav frakciónál (87%) jelentős mennyiségben kimutatható volt a ZEA toxin (20 A. ábra). A pelletből visszamért ZEA koncentráció alapján a tisztított sejtfalnál (77%), sejttörmeléknél (76%), nagy mennyiségben kimutatható volt a toxin, míg a tisztított PG (9%), teicholsav (11%), és S-réteg fehérje (0%), frakciónál nem volt jelentős a toxin mennyisége (20 B. ábra).



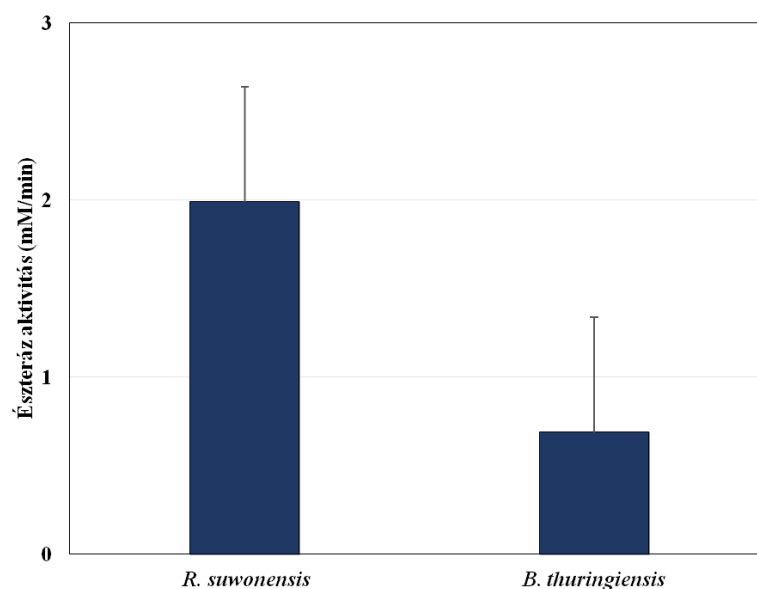
20. ábra *Klebsiella pneumoniae* életképes sejteivel, és baktériumpreparátumaival ZEA eliminációs tesztet követően a felülúszóból (A), és a pelletből (B) mért ZEA koncentráció (n = 3, CV% ≤ 15%). Az egyes oszlopok feletti betűk az összes minta

páronkénti összehasonlításának eredményét jelzik. Az azonos betűvel jelzett eredmények nem különböznek szignifikánsan (t próba, $p \leq 0,05$) egymástól

4.5. Észteráz aktivitás

Mivel az észteráz aktivitás az élő baktériumsejtekben a ZEA lebomlásához kapcsolódik (Wang és mtsai, 2017), ezt az enzimaktivitást mértem, és ez nagy változatosságot mutatott. Az *R. suwonensis* AMK9/2 és a *B. thuringiensis* AMK10/1 magasabb észteráz aktivitást produkált, mint az *L. boronitolerans* AMK9/1 és a *L. fusiformis* AMK10/2. A legmagasabb enzimaktivitást az *R. suwonensis* AMK9/2 sejtörmelékben mértem ($1,98 \pm 0,3$ mM p-nitrofenol felszabadulás/perc) (21. ábra).

A Pearson-féle korrelációs analízis 0,618-as korrelációs együtthatót mutatott ki az enzimaktivitás és a sejtörmelékből kivont ZEA között, valamint 0,748 az enzimaktivitás és a sejtek felülúszójában maradó ZEA között (10. táblázat). Az *R. suwonensis* AMK9/2 sejtek és az AMK9/2 sejtfrakciók azonos arányban távolították el a ZEA-t. Az észterázaktivitást azonban nem lehetett mérni a sejtfrakciókból, mivel ezeket a mintákat különböző vegyszerekkel és hőkezeléssel állítottam elő. Ezért az észteráz aktivitás nem magyarázta az AMK9/2 sejtfrakciókkal a ZEA eliminációját.



21. ábra Az észteráz aktivitás a *Rummeliibacillus suwonensis* AMK9/2 és *Bacillus thuringiensis* AMK10/1 lizált sejtörmelékéből

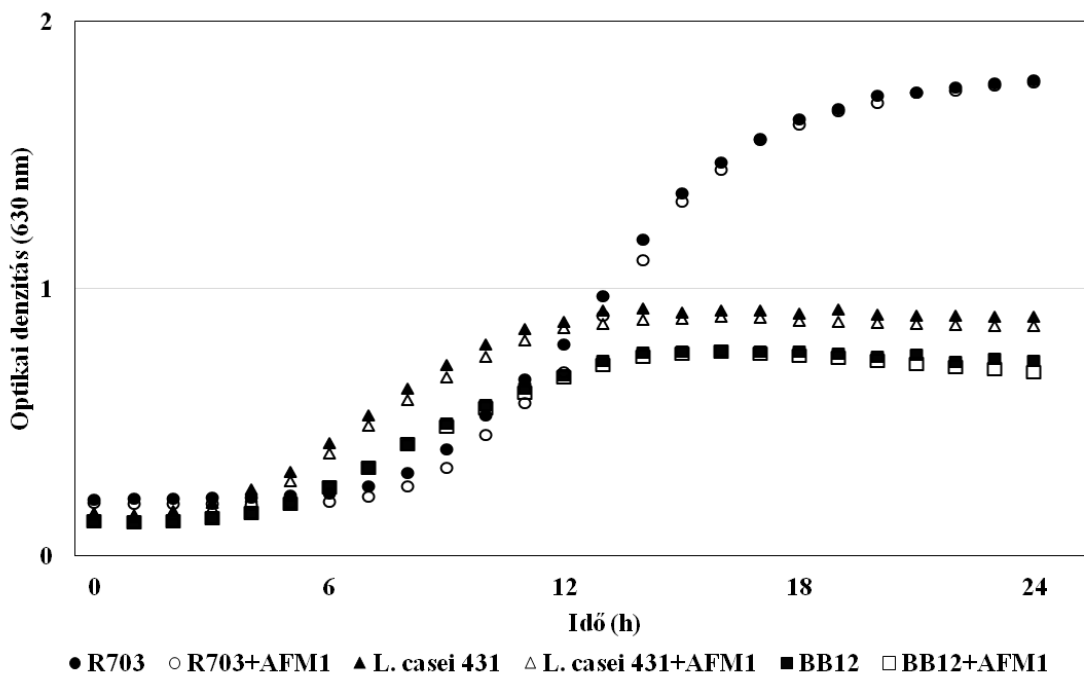
10. táblázat: Pearson féle korrelációs együtthatók az enzimaktivitás és a sejttörmelékéből kivont, valamint a felülúszóban maradó ZEA között.

	Pellet	Felülúszó	Enzim
Pellet	1		
Felülúszó	-0,805	1	
Enzimaktivitás	0,618	0,748	1

4.6. Tejipari mikroorganizmusok vizsgálata

4.6.1. Tejipari mikroorganizmusok aflatoxin M1 rezisztenciája

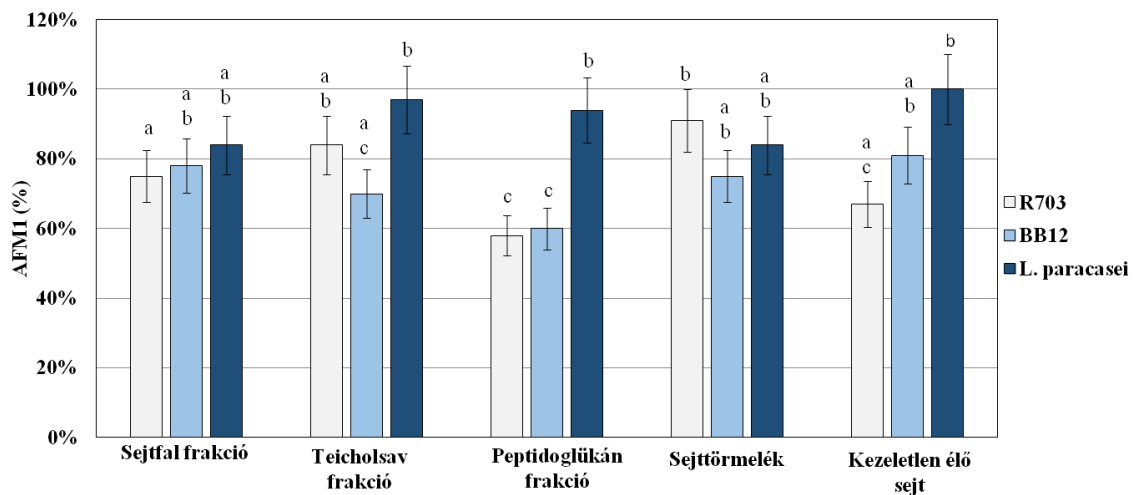
Az AFM1-et különböző koncentrációkban próbáltam ki a vizsgált probiotikus törzsekkel szemben. Az MRS tápvelesben az életképes sejtek AFM1 kezelése során nem észleltem szignifikáns változást a sejtek szaporodásában, kivéve az *L. lactis ssp. lactis* R703 tenyészetet, ahol a tenyészetek exponenciális növekedési fázisában (22. ábra) magas AFM1 koncentráció (1,47 µg/l) mellett a sejtsűrűség kismértékű, de szignifikáns csökkenését észleltem. A 4. órától a 13. óráig szignifikáns eltérés van a kezeletlen és az AFM1-el kezelt tenyészet között.



22. ábra AFM1-el kezelt *Lactococcus lactis ssp. lactis* R703, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12, *L. paracasei ssp. paracasei* 431 növekedése 24 óra alatt (n = 4, CV% ≤ 5%, t próba, p ≤ 0,05)

4.6.2. Tejipari mikroorganizmusok aflatoxin M1 eliminációja

A zsírtalanított, természetesen szennyezett tej AFM1 koncentrációja 30±5 ng/kg volt. A szennyezett tejből 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 (23. ábra). Ugyanakkor az AFM1 kezdeti koncentrációjának 67% -a a tejből maradt a kezeletlen, életképes sejtek alkalmazásakor.



23. ábra A tej visszamért AFM1 tartalma a bakteriális frakciók alkalmazásánál. A *Lactococcus lactis ssp. lactis* R703, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12, *L. paracasei ssp. paracasei* (*L. casei*) 431 biomassza eltávolítja az AFM1-et a szennyezett tejből. A tej visszamért AFM1 tartalma alapján tisztított PG, tisztított sejtfal, teicholsav, és a sejttörmelék eltérően távolította el a mikotoxint. Az egyes oszlopok feletti betűk az összes minta páronkénti összehasonlításának eredményét jelzik. Az azonos betűvel jelzett eredmények nem térnek el szignifikánsan egymástól ($n = 3$, $CV\% \leq 10\%$, t próba, $p \leq 0,05$)

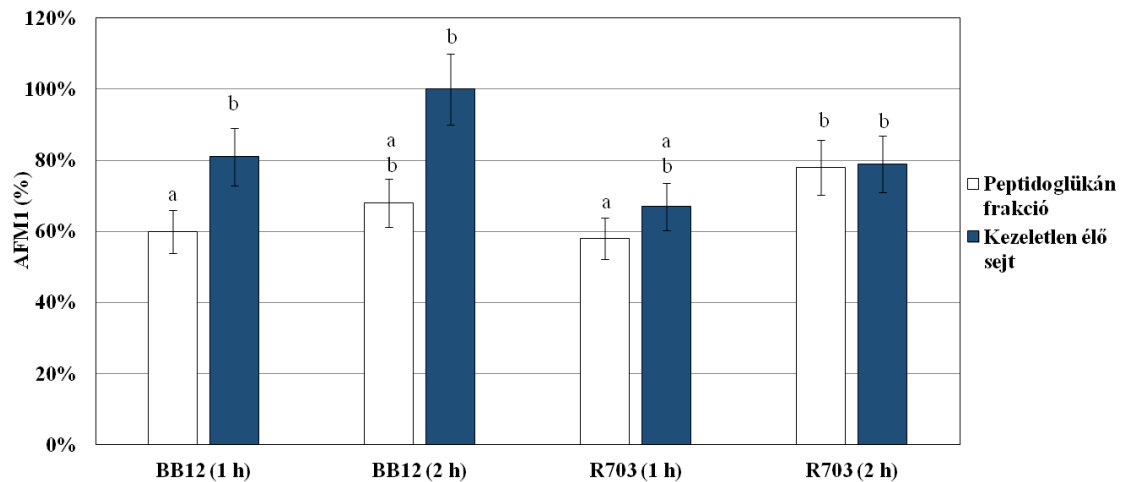
A *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12 PG frakció alkalmazásakor volt a legalacsonyabb a tejből visszamért AFM1 tartalom (60%). A PG frakciót követően a tej AFM1 tartalma a többi frakciónál magasabb volt: a tisztított sejtfal (78%), teicholsav frakció (70%), sejttörmelék (75%), életképes sejtek (81%), (23. ábra). 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. A kezeletlen, élő baktérium nem eliminálta az AFM1-et. Az AFM1 kezdeti

koncentrációjának 84% -a a tejben maradt, SDS-el és H₂O-val kezelt sejtfrakciók esetében (23. ábra).

Az R703 és BB12 sejtpreparátumok AFM1 eliminációs képességét megnövelt kezelési idővel is teszteltem. Kétórás kezelést követően a két sejtpreparátum AFM1 eliminációja nem nőtt az ugyanazon biomassza készítmények egyórás inkubációihoz képest (23. ábra és 24. ábra). Az R703 és a BB12 PG frakciók esetében 78%, illetve 68% -ban maradt a tejben AFM1 toxin. A kezetlen BB12 baktérium nem távolította el az AFM1 toxint a tejből. Az életképes R703 baktériumokkal az eredeti AFM1 79% -a mérhető volt (24. ábra).

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 BB12 törzs esetében (24. ábra).



24. ábra A tisztított peptidoglükán frakció és a kezetlen élő sejt tejből visszamért AFM1 tartalma 1 és 2 órás inkubációnál. *Lactococcus lactis ssp. lactis* R703 és *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12 tisztított peptidoglükán 1 és 2 órás inkubációnál eltérően eliminálta az AFM1-et. A kezetlen R703 baktérium esetében a tej mért AFM1 tartalma 79%. Az egyes oszlopok feletti betűk az összes minta páronkénti összehasonlításának eredményét jelzik. Az azonos betűvel jelzett eredmények nem térnek el szignifikánsan egymástól (n = 3, t próba, p ≤ 0,05)

4.7. Mikotoxin elimináció kísérleti silóban

Az elkészült kukoricaszilázs minták vizsgálati eredményeit a 11. táblázat szemlélteti. 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-ja 5,16 volt, míg a csak tenyésztéssel beoltott minta pH-ja 5,01 értéket mutatott.

A kiindulási szárazanyagtartalom 19,90% volt. A kész szilázs minták szárazanyag tartalma csökkenést mutatott, kivételt képezett a mikotoxinnal szennyezett szilázs minta, ahol enyhe növekedés volt megfigyelhető (11. táblázat), de ez nem volt szignifikáns.

11. táblázat: *In vitro* elkészített szilázs pH értéke, szárazanyaga és illósav tartalma szárazanyagra vonatkoztatva. Az eltérő betűjelzések szignifikáns eltérést mutatnak. ($p \leq 0,05$)

Vizsgálati paraméter	Kontroll minta	Sejttel beoltott minta	Mikotoxinnal szennyezett minta	Mikotoxinnal szennyezett és sejttel beoltott minta
pH	4,55±0,12 ^a	5,01±0,11 ^b	4,57±0,14 ^a	5,16±0,12 ^b
szárazanyag (m/m%)	16,3±0,26 ^a	15,1±1,19 ^a	20,1±1,09 ^b	16,8±0,60 ^a
tejsav (g/kg sz.a.)	127,6±5,6 ^a	97,6±1,52 ^b	122,5±2,12 ^a	108,3±1,23 ^c
ecetsav (g/kg sz.a.)	11,2±0,95 ^a	1,71±0,02 ^b	0,83±0,04 ^c	0,97±0,04 ^c
n-vajsav (g/kg sz.a.)	0,06±0,002 ^a	2,32±0,05 ^b	4,14±0,08 ^c	3,79±0,10 ^d

A tejsav tartalom a kontroll mintától jelentősen nem különbözött a mikotoxint tartalmazó minta esetében (11. táblázat) 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 (LOD) alatti koncentrációban volt jelen. Az izo-kapronsav 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 12. táblázat szemlélteti a kiindulási szecskezett kukorica növény, valamint az *in vitro* szilázs minták mikotoxin tartalmát. A kontroll minta esetében a szecskezett kukorica növényénél a DON mikotoxin nem volt mérhető, viszont a kész szilázsban detektálható volt. A mikotoxinnal szennyezett és sejttel beoltott mintánál a toxintartalom jelentős csökkenése figyelhető meg. A *L. plantarum* NCAIM B01074 sejttel beoltott minta esetében nem volt mérhető a DON, sem a szecskezett kukorica növény esetében, sem a kész szilázsban. ZEA toxint a kontroll szecskezett kukorica növényben kimutattam. Azonos mennyiségű ZEA toxin adása mellett, kevesebb a mikotoxinnal és sejttel beoltott minta esetében is kevesebb ZEA volt detektálható. Azonban egyik kész szilázs mintában sem volt kimutatható a ZEA toxin (12. táblázat).

12. táblázat: A silózás elején mért és a négy-hetes *in vitro* szilázs minták mikotoxin tartalma (mg/kg). Az eltérő betűjelzések szignifikáns eltérést mutatnak. A kísérletben *L. plantarum* NCAIM B01074 törzset alkalmaztunk.

Toxin	Mátrix	Kontroll minta	Sejttel beoltott minta	Mikotoxinnal szennyezett minta	Mikotoxinnal szennyezett és sejttel beoltott minta
DON	silózás eleje	<0,05	<0,05	0,68±0,02 ^a	0,68±0,06 ^a
	silózás vége	0,140±0,01 ^a	<0,05	0,42±0,06 ^b	0,20±0,02 ^c
ZEA	silózás eleje	0,038±0,005 ^a	<0,0026	0,048±0,007 ^a	0,027±0,005 ^b
	silózás vége	<0,0026	<0,0026	<0,0026	<0,0026

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

5.1. Erjesztett takarmányok mikrobiológiai állapotának és mikotoxin szennyezettségének jellemzése

A takarmánygyártók a növényi anyagok erjesztésével próbálnak tápanyagban gazdag takarmányhoz jutni, miközben próbálják eliminálni az állatot és embert egyaránt veszélyeztető mikotoxinokat.

Ezzel szemben Jensen és mtsai (2020), akik a silózási folyamat hatását a takarmánykukorica *Fusarium* mikotoxinjain mérték fel, megállapították, hogy a silózás nem megfelelő módszer a betakarításkor jelen lévő *Fusarium* mikotoxinok csökkentésére, sőt egyes tanulmányok a DON és a ZEA tartalom növekedését dokumentálták a silózás közben (Pereyra és mtsai, 2008; Keller és mtsai, 2013), hasonlóan az én kísérleteimhez, ahol a DON növekedése volt megfigyelhető (12. táblázat).

Feltételezhetjük, hogy a silózás során végbemenő pH változás, és az anaerob viszonyok nem kedveznek a *Fusarium* fajoknak (Ogunade és mtsai, 2018). Kutatásom során az élő mikroflóra nem mutatta a *Fusarium*-ok jelenlétét, ezért a kimutatott DON és ZEA *Fusarium* toxinok a betakarítás előtti gombás szennyeződést tükrözhatték (Driehuis és mtsai, 2008). Ugyanakkor Richard és mtsai (2007), a természetesen előforduló mikotoxinok mellett, a szilázsban további mikotoxin termelést irtak le. Szerintük a nem megfelelően lezárt, préselt szilázsban oxigén marad, melyben a *Fusarium* spórák életképessége lehetővé teszi a további mikotoxin termelést. Ezt alátámasztaná, hogy a DON az egyik leggyakrabban kimutatott mikotoxin a szilázsokban, és koncentrációja nagyon magas lehet a silózás végén (Ogunade és mtsai, 2018). Később megállapították, hogy a DON-származékokból a DON felszabadul a fermentáció során a konjugációs kapcsolatok felszakadásával, ami a mért koncentráció emelkedését jelenti, viszont a ZEA esetében ez nem tapasztalható (Jensen és mtsai, 2019). A közelmúltban mért DON koncentrációk (159,8–203,5 µg/kg, Richard és mtsai, 2007; 100–213 µg/kg, Garon és mtsai, 2006) sokkal alacsonyabbak voltak, mint a kukoricasilázsok átlaga a vizsgálatomban (901 µg/kg DON) (5. táblázat). Más források a DON és a ZEA csökkenését vagy teljes eltűnését publikálták a silózás során (Boudra és Morgavi, 2008).

A ZEA csökkenését vizsgálataimban én is tapasztaltam, ami a megfelelő bakteriális aktivitással, illetve adszorbciónal magyarázható (12 táblázat).

Az AF mennyisége a szilázsban megemelkedhet, ha a szilázs tartósítás közben, vagy a siló bontását követő szakaszban levegőnek van kitéve (Cavallarin és mtsai, 2011). Különböző országokból származó lucerna esetében is magas AF és OTA-szennyeződésről számoltak be (Rodrigues és mtsai, 2011; Huerta-Treviño és mtsai, 2016). A referenciák azonban azt állítják, hogy az OTA előfordulása és koncentrációja a szilázsban általában alacsony a *Fusarium* mikotoxinokhoz (elsősorban DON és ZEA) képest (Kosicki és mtsai, 2016). Vizsgálatomban az AFB1 és ZEA szennyeződések jelentéktelenek voltak a silótakarmányokban. Az alacsonyabb toxicitású AFG2 volt jelen, valószínűleg ennek eredete az AFB1-től eltérő lehetett (5. táblázat).

A fermentáció végén többnyire savtűrő szervezetek és spórák maradtak életben (Gallo és mtsai, 2021; Zachariasova és mtsai, 2014). A fermentált takarmányok számos, a tartósításhoz nélkülözhetetlen jótékony LAB-ot tartalmaztak, amelyek gombaellenes és mikotoxin ellenes tulajdonságokkal rendelkeznek. A szenázs és az erjesztett takarmányok természetes kiszáradása miatti víztartalom-csökkenés (Borreani és mtsai, 2018) nem befolyásolta az életképes LAB számot (15. ábra). A rozsszilázsban és a szenázsmintában viszonylag alacsony faj összetétel volt jellemző az erjedés utolsó szakaszára (Porto és mtsai, 2017), és ez a kukoricasilázsokban is kimutatható volt (Gallo és mtsai, 2021).

5.2. Mikroorganizmusok jellemzése

Összesen 31 baktérium izolátumot gyűjtöttem, amely meghatározásra került MALDI-TOF-MS segítségével. A LAB törzsek többsége *Lactiplantibacillus plantarum* volt. Ezt követte a *Lactiplantibacillus pentosus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactilactobacillus curvatus*, *Lactocaseibacillus paracasei* illetve a *Pediococcus* fajok (*P. pentosaceus* és *P. acidilactici*), (7. táblázat).

A silókban gyakran használnak LAB oltóanyagokat. Ezzel egyezően a leggyakoribb homofermentatív fajok a silókban a *L. plantarum*, a különböző *Lactiplantibacillus* vagy *Pediococcus* fajok és az *Enterococcus faecium* (Fabiszewska és mtsai, 2019). A *Lentilactobacillus buchneri* az aerob stabilitás javítására használt heterofermentatív faj (Zielińska és mtsai, 2015). Az aerob stabilitás az az időtartam, amely alatt a silózott

takarmány megőrzi minőségét a levegővel való érintkezés után, anélkül, hogy jelentős (+2 °C) hőmérséklet emelkedés vagy romlás következne be (Huisden és mtsai, 2009).

A *P. pentosaceus* és a *L. buchneri* növelte az aerob stabilitást és megakadályozta az AF-k termelését (Queiroz és mtsai, 2012) a silózásnál. A beoltott *L. buchneri* csökkentette az AF-értékeket, és nem befolyásolta a kukoricaszilázsok DON vagy ZEA koncentrációját (Iglesias és mtsai, 2005). A LAB-ot antibakteriális biológiai kontrollként is alkalmazzák, a patogén baktériumok növekedésének gátlására. A *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. brevis* és *L. buchneri* a leggyakoribb antimikrobiális bakteriocin termelők (Fabiszewska és mtsai, 2019). A bakteriocinek mellett a LAB metabolom szinergikus hatására a patogén baktériumok, élesztőgombák és penészgombák szaporodásának gátlása történik, ahol a tejsav, ecetsav, hidrogén-peroxid, laktát-peroxidáz, lizozim és reuterin befolyásolhatja a környező mikrobiomot (Schnürer és Magnusson, 2005) és csökkentheti az összcsíraszámot. A LAB a mikotoxinok elleni biológiai védekezés hatékony résztvevőjeként is jól ismert (Dogi és mtsai, 2013; Peles és mtsai, 2021; Ragoubi és mtsai, 2021). A *L. plantarum* és a *L. brevis* jól ismert a silótakarmány beoltására. Ezen törzsek használatának célja azonban általában az illékony szerves szén termelése, nem pedig biológiai védekezési képességük kihasználása (Kim és mtsai, 2021).

Az aerob spóráképző baktériumokat (pl. *Lysinibacillus spp.*, *Rummeliibacillus spp.* és *Bacillus spp.*), valamint egy enterobaktériumot, a *Klebsiella pneumoniae*-t is izoláltam és jellemeztem az erjesztett takarmányokból (7. táblázat).

A *Klebsiella* fajok fakultatív anaerob, Gram negatív, nem mozgékony egyenes, rúd alakú baktériumok, melyek képesek a nitrogén rögzítésére, ezért diazotrófoknak minősülnek (Van Dommelen és Vanderleyden, 2007). Opportunista baktériumok, melyek megtalálhatóak a környezetben, az állatok gasztrointesztinális traktusában, szennyezhetik a húst, a tejtermékeket, és hozzájárulhatnak a betegségek kialakulásához. Orvosi szempontból a *K. pneumoniae* a legelterjedtebb faj, mely súlyos kórházi fertőzéseket okozhat, de fellelhető szénhidrátban gazdag szennyvízben, felszíni vizekben, talajban, növényi termékekben, friss zöldségekben, cukornádban, és a gabonafélékben is egyaránt (Gundogan, 2014). A *Klebsiella* szám a silózás késői szakaszában növekszik meg, feltehetően azért, mert a pH-t tartósan nem sikerül 4,2 alá

csökkenteni (Lin és mtsai, 2021; Sun és mtsai, 2021). Mások negatív korrelációt írtak le a tejsav koncentráció és a *Klebsiella* jelenléte között (Hu és mtsai, 2018).

A *Lysinibacillus* a Bacillaceae család Gram-pozitív, rúd alakú és kerek spórát képző baktérium nemzetsége. A *Lysinibacillus* nemzetség lizint és aszpartátot tartalmaz a sejtfal PG-ban (Miwa és mtsai, 2009). A *Lysinibacillus* általában a talajban található (Ahmed és mtsai, 2007), de izolálták növényi szövetekből (Melnick és mtsai, 2011), fermentált növényi magtermékekből (Parkouda és mtsai, 2010), és még gömbhal-máj mintákból is (Wang és mtsai, 2010). Az *L. boronitolerans* bórtűrő biopeszticidként használt törzse is ismert (Miwa és mtsai, 2009).

A *L. fusiformis* Gram-pozitív, rúd alakú, nem mozgó baktérium. A *L. fusiformis* egy természetben előforduló baktérium, és különféle törzseket izoláltak számos környezetből, beleértve a mezőgazdasági talajt és a gyári szennyvizet (He és mtsai, 2011). Mivel a *L. fusiformis* ZC1 törzsről kimutatták, hogy kromát-rezisztens és képes csökkenteni a toxikus Cr(VI) nagyon magas koncentrációit, ez a baktérium nagy potenciállal bír a szennyvízből a Cr(VI) eltávolítására (He és mtsai, 2011), valamint sikeresen alkalmazzák az oldható kromáttal Cr(VI) szennyezett talaj bioremedációjában (Huang és Wang, 2016).

A *Rummeliibacillus suwonensis* Gram-pozitív, fakultatívan aerob, rúd alakú, nem mozgó, terminális spóraképző baktérium (Her és Kim, 2013). Genetikai analízis cellulolitikus képességeket tárt fel *Rummeliibacillus*-rokon szervezetben (celluláz, endoglükánáz és béta-glükánáz) (Opdahl, 2017). Mikotoxinokkal szembeni hatását idáig nem vizsgálták.

A *Bacillus thuringiensis*-t entomopatogénnek tekintik, amely számos virulenciafaktort képes termelni, beleértve a rovarölő parasporális kristály (Cry) toxinokat, a vegetatív inszekticid fehérjéket, a foszfolipázokat, az immungátlókat és az antibiotikumokat (Schnepf és mtsai, 1998). Ugyanakkor számos alkalmazásban, a mezőgazdaságban, élelmiszeriparban, szeretik a *Bacillus*-okat alkalmazni.

A sejtek mikotoxinokkal szembeni ellenálló képessége, és a mikotoxinok eliminálása jól alkalmazható az élelmiszer- és takarmányiparban (Peles és mtsai, 2021). A LAB jelentős szaporodás gátlása azonban akadályozhatja a fermentációt és a mikotoxinok eliminációját is. Megállapítható volt, hogy az OTA és az AFB1 gátolja az LAB

izolátumok növekedését; bár az AFB1 ebben az esetben csak mérsékelt hatást mutatott (8. táblázat).

5.3. Mikotoxin eliminációs eredmények

5.3.1. Általánosan

A ZEA, a DON és az AFB1 mennyiségének csökkentését céloztam meg a Gram-pozitív *R. suwonensis*, *L. boronitolerans*, *L. fusiformis* és *B. thuringiensis* izolátumainak felhasználásával.

Az *R. suwonensis* és az *L. boronitolerans* esetében tudomásom szerint eddig nem publikáltak mikotoxinok eliminációjával kapcsolatos vizsgálatokat. Az *L. fusiformis* esetében csak egy vizsgálat készült az AFB1 eliminációjáról (Adebo és mtsai, 2016), de a vizsgálatokat csak életképes baktériumokkal végezték, sejtfrakciókkal nem. A *B. thuringiensis* esetében számos tanulmány áll rendelkezésre a patulintermelő gombákra gyakorolt antagonisztikus hatásairól és laktonáz termeléséről, amely lebontja a patulin mikotoxint (pl. Chalivendra és Ham, 2019). Jelen vizsgálatban életképes sejteket, sejtfaltörmelék, tisztított sejtfalakat, teicholsavat, PG-t és S-réteg fehérje frakciókat állítottam elő hővel, és különböző kémiai kezelésekkel, és ezeket mikotoxin eliminációs kísérletekben teszteltem.

Mind a hő, mind a szerves savak befolyásolják a mikotoxinok sejtfalon keresztüli adszorpcióját, mivel mindkét tényező csökkenti a PG vastagságát, növelve a szerkezet pórusméretét. Ezenkívül a hőkezelés megzavarja a sejtfal poliszacharidok, például a PG glikozid kötéseit, és a szerves savak megszakítják az amid kötéseket a PG szerkezetében (El-Nezami és mtsai, 2002a és 2002b). Ezek a kezelések denaturálják a fehérjéket, és kisebb peptidekre bontják őket a peptidkötések megszakításával és több kötőhely feltárásával (Lili és mtsai, 2018). A magas hőmérséklet által okozott fehérje denaturáció szintén része a pórusképződésnek, ami fokozott permeabilitást eredményez az élő sejtekben (Abedi és mtsai, 2022).

5.3.2. Dezinivalenol

A kísérleti körülmények között a trichotecén mikotoxin DON-t baktériumsejtekkel és sejtfrakciókkal nem tudtam eltávolítani, ellentétben más Gram-pozitív sejtekkel (Niderkorn és mtsai, 2006; Yao és Long, 2020; Luo és mtsai, 2020). Az elmúlt néhány évben sikereket értek el a DON-termelő gombák mikrobiális antagonistákkal történő

szabályozásában és a DON mikrobákkal és enzimekkel történő méregtelenítésében (Tian és mtsai, 2022). El-Nezami és munkatársai (2002b) jelentős különbségekről számoltak be a baktériumok in vitro trichotecén megkötésére való képességében. A hő- és savkezelések ellenére, amelyek jelentősen növelték a Gram-pozitív LAB-ok azon képességét, hogy eltávolítsák a DON-t az MRS táptalajból (Zou és mtsai, 2012), ezek a paraméterek nem növelték a DON eliminációs hozamokat. A bemutatott Gram-pozitív baktériumok vagy sejtfalfrakciók eredményei a lebontó enzimek vagy az adszorpció hiányára utalnak.

5.3.3. Zearalenon

El-Nezami és mtsai (1998) beszámoltak a hővel és savval kezelt baktériumok ZEA-hoz való kötődéséről. Az *L. fusiformis* AMK10/2 életképes sejtjei kevesebb ZEA mikotoxint távolítottak el, mint a hővel előlt baktériumok, ami a sejtfal biopolimerek konformációjának masszív, hő által kiváltott változását jelzi, ami növelhette a ZEA kötőhelyek számát és elérhetőségét (El-Nezami és mtsai, 2022a). Hasonlóképpen, az *L. rhamnosus* sejtfal poliszacharid komponensei jó ZEA adszorpciós potenciált mutattak, és mind a hő-, mind a savas kezelés jelentősen növelte a frakciók ZEA adszorpciós képességét (El-Nezami és mtsai, 2022b, 2004). Érdekes módon az *R. suwonensis* AMK9/2 ZEA eliminációs képessége azonos volt mind az életképes, mind a hőkezelt baktériumsejteknel és frakcióiknál (18. ábra). Ezért feltételezhetjük, hogy a ZEA eliminációs hozamok módosítására alkalmazott kezelések nem befolyásolták a sejtfal szerkezetét.

Az enzimikus lebomlás szintén szerepet játszhat a ZEA eliminációjában. Tinyiro és munkatársai (2011) kimutatták, hogy a *Bacillus* törzs autoklávozott és savval kezelt sejtjei által kötött ZEA mennyiségek azonosak, miközben azt feltételezték, hogy a *Bacillus natto* metalloenzim felelős a ZEA lebontásáért. Számos közelmúltbeli tanulmány alátámasztotta azt a nézetet, hogy a bakteriális észteráz aktivitás hozzájárulhat a ZEA lebomlásához. Például Wang és munkatársai (2017) a ZEA-eltávolító baktériumokat az észteráz aktivitásuk alapján választották ki. Ebben a vizsgálatban az *R. suwonensis* AMK9/2 mutatta a legmagasabb sejtfalhoz kötött észteráz aktivitást, de az észteráz aktivitás nem korrelált a sejtfalfrakciókból mérhető ZEA-val. Azt is kimutatták, hogy a *L. plantarum* ZEA expozíciója alatt még a sokkal magasabb észteráz aktivitás sem eredményezett szignifikánsan jobb ZEA eliminációt

(törzstől függően 14–52%) (Chen és mtsai, 2018). A kérődzőkből származó baktériumok észteráz aktivitását a *Fusarium* T-2 toxin deacetilezésére is tesztelték, és változó sikert értek el (Westlake és mtsai, 1987). Ugyanakkor *L. rhamnosus* törzsek esetében a ZEA eliminációja adszorpció és nem enzimátikus lebomlás útján történt (El-Nezami és mtsai, 2022a). A *B. thuringiensis* AMK10/1 esetében a sejtfrakciók által eliminált ZEA mennyisége alacsonyabb volt, mint az életképes sejtek által eliminált mennyiség (18. ábra). A legjelentősebb ZEA visszanyerést szintén az életképes sejtekből értem el, ami enzimátikus lebomlás nélküli adszorpcióra utalt.

5.2.3. Aflatoxinok

Az AF-ok baktériumok általi kötése függ a LAB törzs jellemzőitől, az inkubációs időtől, hőmérséklettől, a pH-tól, és a mátrixtól (Ahlberg és mtsai, 2015; Adibpour és mtsai, 2016).

R. suwonensis AMK9/2, *L. boronitolerans* AMK9/1, *L. fusiformis* AMK10/2, *B. thuringiensis* AMK10/1 életképes sejtjeivel és, sejtfrakcióival: sejtfaltörmelék, tisztított sejtfal, teicholsav, PG és S-réteg fehérje frakciójával mikotoxin eliminációs kísérleteket végeztem.

Lahtinen és munkatársai (2004) hangsúlyozták a PG szénhidrát részeinek és más, a PG-hez szorosan kapcsolódó struktúráknak a kötődési folyamatban játszott jelentős szerepét. A *L. rhamnosus*-ban az aflatoxinkötés a sejtfal szénhidrát- és fehérjetartalmán keresztül történt (Haskard és mtsai, 2000). A különböző enzimátikus és kémiai kezeléseknek alávetett *L. rhamnosus* GG törzs azt mutatta, hogy az AFB1 a sejtfal PG-jához vagy a PG frakcióhoz szorosan kapcsolódó vegyületekhez kötődik (Lahtinen és mtsai, 2004).

A *B. thuringiensis* teicholsav frakciója szignifikánsabb AFB1 eliminációs potenciált mutatott, mint az intakt baktériumsejtek (Lahtinen és mtsai, 2004). Hasonló megfigyelésekről számoltak be Hernandez-Mendoza és munkatársai (2009) a *L. reuteri* NRRL14171 és a *L. casei* Shirota esetében, ahol a teicholsav-hiányos mikrobák szignifikánsan kevesebb AFB1-et kötöttek meg. Más LAB-ok azt mutatták, hogy minél magasabb a D-alanin vagy teicholsav tartalom, annál magasabb az AFB1 kötődés (Serrano-Niño és mtsai, 2015). A teicholsav a bakteriális sejtfal akár 50% -át is kiteheti (Brown és mtsai, 2013), de mennyisége fajspecifikus. Egyes kutatások azt jelezték,

hogy a teicholsav extrakcióját valószínűleg befolyásolja az extrakciós idő és az alkalmazott TCA koncentráció (Wicken és mtsai, 1972). Ezért az AF-ok teicholsav alapú eliminációját óvatosan kell értelmezni a különböző baktériumfajok összehasonlításakor.

Ma és munkatársai (2017) arról számoltak be, hogy a LAB-ok alkalmazásától függetlenül, a szilázsban lévő mikrobák biztonságos szintre csökkentették az AFB1 kiugró koncentrációját kukoricaszilázs készítése során. Silótakarmányokban a legalacsonyabb AFB1 koncentráció az *L. rhamnosus* LR7 és *L. plantarum* ATCC 8014 oltott szilázsokban volt (kb. 8–10 µg/kg száraztömeg), a legmagasabb koncentráció pedig a *L. brevis* DSMZ 20054 (34,2 µg/kg száraztömeg) oltóanyaggal volt mérhető (Gallo és mtsai, 2021). Tekintettel a *L. brevis* AFB1 érzékenységre, ez indokolható. Az AFB1 DNS kötő képessége mutációkat hozhat létre, illetve letális lehet (Bedard és Massey, 2006). A kevésbé érzékeny sejtek esetében a hatást az erősebb DNS-repair vagy az AFB1 eliminációs (adszorpciós vagy enzimes hidrolízis) képesség gyengítheti.

Adebo és munkatársai (2016) szintén felvetették az AFB1 enzimátikus lebontását egy *L. fusiformis* által termelt extracelluláris enzim által. Az enzimátikus reakciókat azonban 2200 ppb AFB1 koncentrációban hajtották végre (3–24 órás inkubáció), ami majdnem két nagyságrenddel magasabb, mint a vizsgálatomban alkalmazott AFB1 koncentráció, tehát nem volt összevethető a két kísérlet.

Tejipari LAB és preparátumainak AFM1 eliminációs képességét is teszteltük. A *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* R703 és *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 törzsek közül a TCA-kezelés, a felszabadult PG frakció bizonyult a legjobb sejtpreparátumnak. Az R703 és BB12 törzseket TCA-val és hővel (100 °C) kezeltem, ami hozzájárult az AFM1 iránti jelentős affinitásukhoz. A PG szerkezete azonban itt is befolyásolja a mikotoxin megkötő képességet (Niderkorn és mtsai, 2009). A PG-frakciók 40-50%-kal csökkentették a nyerstej AFM1-tartalmát (23.-24. ábra), amint azt számos más LAB esetében is kimutatták (Peles és mtsai, 2021). A preparátum készítésekor a közölt hő a fehérje lebomlását okozza, míg a savas kezelés megzavarja a poliszacharidok glikozid kötéseit és tönkreteszi az amidkötéseket, így a PG szerkezete megváltozik, lehetővé téve a baktériumsejt számára, hogy több aflatoxinhoz kötődjön (El-Nezami és mtsai, 1998).

A PG frakció mikotoxinnal való interakció idejének növelése nem növelte az AFM1 eliminációt az R703 és BB12 törzsek esetében (24. ábra). Zhao és munkatársai (2015) és Mahmood Fashandi és munkatársai (2018) szerint sem fokozta az inkubációs idő növekedése a LAB mikotoxin-kötő képességét. Életképes sejteknél az AFM1 kötődés részben reverzibilis, és a toxin az ismételt mosás után felszabadul (Ismail és mtsai, 2017; Assaf és mtsai, 2018). Azt feltételezték, hogy a toxin és a baktérium felszínén található hidrofób zsebek között nem-kovalens kölcsönhatás lép fel (Haskard és mtsai, 2001). Továbbá az interakció koncentráció-függő (Peltonen és mtsai, 2001; Hernandez-Mendoza és mtsai, 2009). A kísérletek azt mutatták, hogy a bakteriális biomassza növelése nem növelte tovább a LAB AFM1 eliminációs kapacitását a vizsgált körülmények között.

A bakteriális sejtfal PG-frakciójának szerepe vitathatatlan az AF eliminációban. A Gram-pozitív baktériumok sejtmembránja vastag PG réteggel van körülvéve, és figyelembe véve a PG-frakció által eliminált alacsony AFM1 toxinmennyiséget, más tényezők is módosíthatják ennek a szerkezetnek a hozzáférhetőségét. Úgy tűnt, hogy a hő- és a TCA-kezelés növeli a PG peptidrész szerkezetéhez kapcsolódó kötési kapacitást és hatékonyságot, mint például a fumonizin esetében is (Niderkorn és mtsai, 2009).

A *B. thuringiensis* AMK10/1 esetében az S-réteg frakció rendelkezett a legnagyobb potenciállal az AFB1 eliminációban (17. ábra). Ugyanakkor az S-réteg mikotoxin kötéséről nagyon kevés az információ.

A Gram-pozitív baktériumokban beszámoltak felszíni rétegfehérjék (S-réteg fehérjék) termeléséről (Åvall-Jääskeläinen és mtsai, 2005). Ezek a nem kovalens kötésű fehérjék (25-50 kDa) nagyon bázikusak, a számított pI érték pI 9,35 -10,88 közötti (Ventura és mtsai, 2002). A bakteriális S-réteg egy 5 - 25 nm vastagságú réteg, amely a legkülső sejtburkot képezi, amely az egész baktériumot lefedi (Schuster és mtsai, 2010). Ez a réteg fehérjékből vagy glikoproteinekből áll, amelyek különböző formákban ferde, négyzet vagy hatszögletű rácsszimmetriában vannak elrendezve (Sleytr és mtsai, 2014). Ezenkívül, az S-réteg pórusai 2-8 nm átmérőjűek (Schuster és mtsai, 2010). Lehetséges, hogy ez a réteg akadályt képez az AFM1 bejutása és a sejtfal PG-hoz vagy poliszacharidokhoz való kötődéssel szemben. A hő- és savas kezelések a felszíni

fehérjék denaturációját és a PG részleges lebomlását okozzák, ami új kötőhelyek expozíciójához vezethet (Haskard és mtsai, 2001).

Fontos megemlíteni, hogy nem minden sejt rendelkezik S-réteggel (Fagan és Fairweather, 2014). Jelenlétének vagy hiányának egyértelmű jelzése segít jobban megérteni a sejtfa szerkezetét, amely befolyásolhatja az AFM1 illetve az AF-ok kötődését. Azok a baktériumok, amelyek nem képesek S-réteg fehérjéket előállítani, semleges pH-n negatív felületi töltéssel rendelkeznek. Az S-réteg fehérjék alapvető természete ellenére az S-réteget termelő LAB felületi töltése szintén negatívnak bizonyult (Schär-Zammaretti és Ubbink, 2003). Ennek magyarázata az S-réteg fehérjék pozitív töltésű területeinek bevonása a PG-hoz való kötődésükbe (Smit és mtsai, 2001).

5.4. Javaslatok

Mind a szakirodalom, mind vizsgálataim alapján állítható, hogy a fő *Fusarium* mikotoxin DON okozhatja a silótakarmányokban a legtöbb minőségi problémát, különösen a kukoricaszilázsokban, ahol esetenként alacsony életképes LAB szám jellemezheti a rendszert. A másik probléma az OTA szennyezettség, mivel ennek a mikotoxinnak a nagy koncentrációja a baktériumszaporodás-gátló tulajdonsága miatt akadályozhatja a fermentációs folyamatokat.

A viszonylag alacsony LAB fajsám volt jellemző az erjedések utolsó szakaszára. Az ebben a szakaszban jelenlévő (tehát savtűrő, és mikotoxin-rezisztens) baktériumok izolálása és alkalmazása, általában alacsony számban, de jelentős antimikotikus és/vagy antimikotoxinogén aktivitással, új perspektíva. Itt 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. Ezeknek az organizmusoknak a mikotoxinok eliminációjában játszott lehetséges szerepe további kutatásokat igényel, hogy feltárjuk lehetséges felhasználásukat.

A gombatörzsek által termelt ZEA általában betakarítás után és tárolás közben szennyezi az alapanyagokat. Általában nem távolítják el, ha olyan termékeket gyártanak, mint a fűszerek, gabonafélék, szárított gyümölcsök, hús, bor, sör stb., amelyek élelmiszer növényekből vagy ahhoz kapcsolódó anyagokból származnak. Szerencsés, hogy a toxin jelenléte nem zavarja a LAB-ok szaporodását.

A tipikus raktári gombák által termelt mikotoxinként az OTA a szilázsokban szintén nem gyakori, amíg az anaerob körülmények fennállnak. Helyes tárolás mellett a LAB-okat ez a mikotoxin nem fogja gátolni a szaporodásukban.

Az AFM1 eliminációját előnyben részesítő és fokozó baktériumsejtek sejtfelszíni kötőhelyeinek, és vegyületeinek további vizsgálata kritikus fontosságú.

A probiotikus ipari törzsek kulcsfontosságúak a tejiparban, és egyéb hasznosításuk is jelentős. A xenobiotikumok esetében a LAB méregtelenítésben betöltött szerepe jól ismert. Az R703 és BB12 PG sejtfalfrakciói jelentős mennyiségű AFM1-et kötött meg a természetesen szennyezett tejből egy óráns 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. A BB12 PG további elemzést igényel a tejtermékekben történő biotechnológiai alkalmazáshoz.

A baktériumsejtek sejtfelszíni formáinak és vegyületeinek további vizsgálata szükséges. Ez biotechnológiai alkalmazások kifejlesztését eredményezheti, pl. AFM1 szennyeződés elleni molekuláris szűrések vagy fokozott mikotoxinkötési hatékonyságú probiotikumok kiválasztása.

Kutatásom során *Lysinibacillus* spp. és *Rummeliibacillus suvonensis* spóráképző Gram-pozitív aerob baktériumokat izoláltam, valamint a Gram negatív *Klebsiella pneumoniae*-t, amelyeknek tudomásom szerint nem volt különösebb szerepük a fermentációs folyamatokban. A *Lysinibacillus fusiformis* (Adebo és mtsai, 2016) kivételével, ezen baktériumok egyike sem volt ismert mikotoxin-rezisztenciájáról vagy eliminációjáról itt azonban megmutatkozott, hogy a LAB-hoz hasonlóan ezek is rendelkeznek ezzel a pozitív tulajdonsággal. Ezeknek az organizmusoknak a mikotoxin-eltávolításban betöltött szerepének megismeréséhez további kutatásokra van szükség, hogy feltárjuk biotechnológiai alkalmazási lehetőségeiket.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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.

7. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK

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 LAB 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-LAB-ot 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. Biológiai adszorbensként, takarmány-kiegészítőkbe bejuttatva, megelőzné a haszonállatok mikotoxinok által okozott megbetegedéseit.
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.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikotoxinok az élelmiszerlánc minden lépésénél jelen vannak, mert képesek áthaladni a táplálékpíramis különböző szintjein. A mikotoxinok bekerülési esélye az élelmiszerláncba egyszerű, gabonafélék révén egyenesen, és közvetve is kerül mikotoxin a humán szervezetbe. Negatív hatásaik a mezőgazdasági haszonnövény alapú termékek fogyasztásával, illetve a mikotoxinnal szennyezett állati takarmány révén az állati termékek fogyasztásával közvetve az emberben kimutathatók.

Munkámban célul tűztem ki a fermentált takarmányok mikrobiológiai állapotának és mikotoxin szennyezettségének jellemzését; magas mikotoxin rezisztenciával, és eliminációval rendelkező baktériumok izolálását, jellemzését; és silótakarmány és tejipari eredetű organizmusok mikotoxin eliminációs képességének vizsgálatát, a lehetséges jövőbeli alkalmazás szempontjából.

A viszonylag alacsony LAB fajsám volt jellemző az silózás utolsó szakaszára. A végső összes mikrobaszám nagyrészt LAB-ból állt, és életképes sejtszámuk nem függött a takarmány végső víztartalmától. Azok a baktériumok, melyek a fermentáció során életképesek, és magas mikotoxin rezisztenciával rendelkeznek, biotechnológiai előnyökkel járhatnak. A kukoricaszilázsban leggyakoribb talált LAB a *Lactiplantibacillus plantarum* volt. A lucerna szilázs mikrobióba közösségének nagy százalékát a *Lactiplantibacillus pentosus* jellemezte, míg a rozsszilázs- és szenázsmintákban a *Pediococcus*-ok voltak a tipikus baktériumok. Itt azonosítottam és jellemeztem néhány ismeretlen mikotoxin eliminációs lehetőséggel rendelkező nem-tejsav baktériumot is.

A vizsgált mikotoxinok esetében a szervezetek általában erős rezisztenciát mutattak. Mind a szakirodalom, mind a tanulmányom alapján megállapítottam, hogy a fő *Fusarium* mikotoxin DON okozhatja a silótakarmányokban a legtöbb minőségi problémát, különösen a kukoricaszilázsokban, ahol esetenként alacsony életképes LAB szám jellemezheti a rendszert. A másik probléma az OTA szennyezettség, mivel ennek a mikotoxinnak a baktériumszaporodás-gátló tulajdonsága nagy koncentrációban akadályozhatja a fermentációs folyamatokat. A tipikus raktári gombák által termelt mikotoxinoként az OTA a szilázsokban nem gyakori, amíg az anaerob körülmények fennállnak.

Kutatásom során *Lysinibacillus* spp. és *Rummeliibacillus suwonensis* spóráképző Gram-pozitív aerob baktériumokat izoláltam, valamint a Gram-negatív *Klebsiella pneumoniae*-t, amelyeknek tudomásom szerint nem volt különösebb szerepük a siló fermentációs folyamatokban. A *Lysinibacillus fusiformis* kivételével, ezen baktériumok egyike sem volt ismert mikotoxin-rezisztenciájáról vagy eliminációjáról, itt azonban megmutatkozott, hogy a LAB-hoz hasonlóan ezek is rendelkeznek ezzel a pozitív tulajdonsággal. Aktivitásuk gátolhatja a gombák szaporodását, és a mikotoxinok szennyeződését a silózás aerob kiindulási körülményei között vagy silónyítások után.

A *B. thuringiensis*, *L. boronitolerans*, *L. fusiformis*, *R. suwonensis* esetében a DON eliminációs képesség elhanyagolható volt. Az AFB1 eliminációs képesség a *B. thuringiensis* AMK10/1 S-réteg fehérje frakció esetében 64% volt. A *L. boronitolerans* AMK 9/1 tisztított sejtfal-, PG- és S-réteg fehérje-frakciói majdnem teljesen eliminálták a ZEA-t. A *Lysinibacillus fusiformis* AMK10/2 esetében a sejtörmelék, a tisztított sejtfal, a PG frakció, és az S-réteg frakció is kimagasló eredményeket mutatott a ZEA eliminációjában. A *Bacillus thuringiensis* AMK10/1 esetében a PG frakció esetében a ZEA elimináció elhanyagolható volt, míg a S-réteg fehérje frakciónál 38% volt.

Az *R. suwonensis* AMK9/2 és az *L. boronitolerans* AMK9/1 magasabb észterázaktivitást produkált. A korrelációs analízis 0,618-as korrelációs együtthatót mutatott ki az enzimaktivitás és a sejtörmelékből kivont ZEA között, valamint -0,748 az enzimaktivitás és a sejtek felülúszójában maradó ZEA között.

A *Klebsiella pneumoniae* esetében DON eliminációt nem tapasztaltunk. Az AFB1 eliminációja a sejtörmelékkal volt a legmagasabb. A ZEA elimináció a tisztított sejtfal, S-réteg fehérje frakció és a sejtörmelék esetében volt a legmagasabb.

A probiotikus ipari törzsek kulcsfontosságúak a tejiparban, és egyéb hasznosításuk is jelentős. A xenobiotikumok esetében a LAB méregtelenítésben betöltött szerepe jól ismert. Ugyanakkor ez a jellemző törzsfüggő. Az *L. paracasei* ssp. *paracasei* 431 LAB AFM1 eliminációja nem volt számottevő, míg az *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* R703 és *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 PG sejtfalfrakciói jelentős mennyiségű AFM1-et kötöttek meg a természetesen szennyezett tejből. Továbbá a PG-frakció jobb abszorbens volt az AFM1 esetében, mint a BB12 életképes sejtjei, míg a különbség jelentéktelen volt az R703 törzs esetében.

Silózási kísérletben a mikotoxinnal szennyezett és *Lactiplantibacillus plantarum* NCAIM B01074 sejttel beoltott mintánál a mikotoxintartalom 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.

9. SUMMARY

Mycotoxins are present at every step of the food chain because they can cross different levels of the food pyramid. The chance of mycotoxins entering the food chain is simple: Mycotoxins enter the human body both directly and indirectly through cereals. Their adverse effects can be directly detected in humans through agricultural crop-based products or animal products through mycotoxin-contaminated animal feed.

I aimed to characterise the microbiological state and mycotoxin contamination of fermented feeds, isolate and characterise bacteria with high mycotoxin resistance and elimination, and investigate the mycotoxin elimination potential of silage feed and dairy-derived organisms from the perspective of possible future application.

The relatively low number of LAB species was characteristic of the last stage of silage. The final total microbial count consisted mainly of lactic acid bacteria, and their viable cell count did not depend on the final water content of the feed. Bacteria viable during fermentation and have high mycotoxin resistance may have biotechnological benefits. The most common LAB found in corn silage was *Lactiplantibacillus plantarum*. A large percentage of the alfalfa silage microbiome community was characterised by *Lactiplantibacillus pentosus*, while *Pediococci* were typical bacteria in rye silage and hayage samples. I also identified and characterised some non-lactic acid bacteria with unknown mycotoxin elimination potential.

For mycotoxins tested, organisms generally showed robust resistance. Based on the literature and my study, the main *Fusarium* mycotoxin DON can cause the most quality problems in silage feed, especially in maize silages, where the system may sometimes have low viable LAB counts. Another problem is OTA contamination, as the mycotoxin's bacterial growth inhibitory properties can hinder fermentation processes at high concentrations. As a mycotoxin produced by typical warehouse fungi, OTA is not common in silages as long as anaerobic conditions persist.

During my research, I isolated Gram-positive aerobic bacteria *Lysinibacillus* spp. and *Rummeliibacillus suvonensis*, as well as Gram-negative *Klebsiella pneumoniae*, which, to our knowledge, had no particular role in silage fermentation processes. Except for *Lysinibacillus fusiformis*, none of these bacteria were known to have mycotoxin resistance or elimination. Still, they showed that, like LAB, they also possessed this

positive trait. Their activity may inhibit fungal growth and mycotoxin contamination under aerobic starting conditions of silage or after silage openings.

DON elimination was negligible for *B. thuringiensis*, *L. boronitolerans*, *L. fusiformis*, and *R. suwonensis*. The AFB1 elimination ability for *B. thuringiensis* AMK10/1 S-layer fraction was 64%. The purified cell wall, PG and S-layer protein fractions of *L. boronitolerans* AMK9/1 almost eliminated ZEA. In the case of *Lysinibacillus fusiformis* AMK10/2, cell debris, purified cell walls, PG fraction, and S-layer fraction also showed outstanding results in ZEA elimination. For *B. thuringiensis* AMK10/1, ZEA elimination was negligible for the PG fraction compared to 38% for the S-layer.

R. suwonensis AMK9/2 and *L. boronitolerans* AMK9/1 produced higher esterase activity. The correlation analysis showed a correlation coefficient of 0.618 between enzyme activity and ZEA extracted from cell debris and -0.748 between enzyme activity and ZEA remaining in the supernatant of cells.

No DON elimination was observed for *Klebsiella pneumoniae*. AFB1 elimination was highest with cell debris. ZEA elimination was highest in purified cell wall, S-layer protein fraction and cell debris.

Probiotic industrial strains are essential in the dairy industry and have other uses. In the case of xenobiotics, the role of LAB in detoxification is well known. At the same time, this characteristic is strain-dependent. AFM1 elimination of the lactic acid bacteria *L. paracasei* ssp. *paracasei* 431 was insignificant, while the PG cell wall fractions of R703 and BB12 absorbed substantial amounts of AFM1 from naturally contaminated milk. Furthermore, the PG fraction was better absorbent for AFM1 than viable cells for BB12, while the difference was insignificant for strain R703.

In a silage experiment, a significant reduction in mycotoxin content was observed in a sample contaminated with mycotoxin and inoculated with *Lactiplantibacillus plantarum* NCAIM B01074. In the samples inoculated with *L. plantarum* NCAIM B01074, no DON was measured, neither in the shredded maize crop nor in the finished silage. With the same amount of ZEA toxin, fewer samples inoculated with mycotoxins and cells were detected. However, none of the finished silage samples showed ZEA toxin.

10. IRODALOMJEGYZÉK (felhasznált irodalom)

Abedi E. - Mousavifard M. - Hashemi S. M. B.: 2022. Ultrasound-assisted detoxification of ochratoxin A: comparative study of cell wall structure, hydrophobicity, and toxin binding capacity of single and co-culture lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*. 15. 539-560.

Abdolmaleki K. - Khedri S. - Alizadeh L. - Javanmardi F. - Oliveira C. A. - Khaneghah AM.: 2021. The mycotoxins in edible oils: An overview of prevalence, concentration, toxicity, detection and decontamination techniques. *Trends Food Sci Technol*. 115. 500-511.

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.

Adebo O. A. - Njobeh P. B. - Mavumengwana V.: 2016. Degradation and detoxification of AFB1 by *Staphylococcus warneri*, *Sporosarcina sp.* and *Lysinibacillus fusiformis*. *Food Control*. 68. 92-96.

Adesogan A. T. - Newman Y. C.: 2010. Silage harvesting, storing, and feeding. University of Florida IFAS Extension SSAGR-177.

Adibpour N.- Soleimani-Zad S. - Sarabi-Jamab M. - Tajalli F.: 2016. Effect of storage time and concentration of aflatoxin M1 on toxin binding capacity of *L. acidophilus* in fermented milk product. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 18. 1209–1220.

Ahangarkani F. - Rouhi S. - Gholamour Azizi. I.: 2014. A review on incidence and toxicity of fumonisins. *Toxin Reviews*. 33. 95-100.

Ahlberg S. H. - Joutsjoki V. - Korhonen H. J.: 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*. 207. 87–102.

- Ahmed I. - Yokota A. - Yamazoe A. - Fujiwara T.: 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57. 1117-1125.
- Alizadeh A. M. – Roshandel G. – Roudbarmohammadi S. - Roudbary M. - Sohanaki H. - Ghiasian S. A. - Aghasi M.: 2012. Fumonisin B1 contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 13. 2625-2628.
- Alonso V. A. - Pereyra C. M. - Keller L. A. M. - Dalcero A. M. - Rosa C. A. R. - Chiacchiera S. M. - Cavaglieri L. R.: 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*. 115. 637-643.
- André A. - Müller N. - Chetschik I.: 2022. Occurrence of zearalenone and enniatin B in swiss wheat grains and wheat flours. *Applied Sciences*. 12. 10566.
- Arab M. - Sohrabvandi S. - Mortazavian A. M. - Mohammadi R. - Tavirani M. R.: 2012. Reduction of aflatoxin in fermented milks during production and storage. *Toxin Reviews*. 31. 44-53.
- Assaf J. C. - Atoui A. - Khoury A. E. - Chokr A. - Louka N.: 2018. A comparative study of procedures for binding of aflatoxin M1 to *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Brazilian Journal of Microbiology*. 49. 120-127.
- Åvall-Jääskeläinen S. - Palva A.: 2005. *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Reviews*. 29. 511-529.
- Ávila C. L. S. - Carvalho B. F.: 2020. Silage fermentation—updates focusing on the performance of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*. 128. 966-984.
- Bahrami R. - Shahbazi Y. - Nikousefat Z.: 2016. Aflatoxin M1 in milk and traditional dairy products from west part of Iran: Occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure. *Food Control*. 62. 250-256.
- Bashiry M. - Javanmardi F. - Sadeghi E. - Shokri S. - Hossieni H. - Oliveira CA. - Khaneghah AM.: 2021. The prevalence of aflatoxins in commercial baby food products:

A global systematic review, meta-analysis, and risk assessment study. *Trends Food Sci Technol.* 114. 100- 115

Battacone G. - Nudda A. - Pulina G.: 2010. Effects of ochratoxin A on livestock production. *Toxins.* 2. 1796-1824.

Battilani P. - Toscano P. - Van der Fels-Klerx H. J. - Moretti A. - Camardo Leggieri M. - Brera C. - Rortais A. - Goumperis T. - Robinson T.: 2016. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports.* 6. 24328.

Bedard L. L. - Massey T. E.: 2006. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters.* 241. 174-183.

Beeby M.: 2020. Toward organism-scale structural biology: S-layer reined in by bacterial LPS. *Trends in Biochemical Sciences.* 45. 549-551.

Benkerroum N.: 2016. Mycotoxins in dairy products: A review. *International Dairy Journal.* 62. 63-75.

Berthiller F. - Crews C. - Dall'Asta C. - Saeger S. D. - Haesaert G. - Karlovsky P. - Oswald I. P. - Seefelder W. - Speijers G. - Stroka J.: 2013. Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research.* 57. 165-186.

Berthiller F. - Schuhmacher R. - Adam G. - Krska R.: 2009. Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 395. 1243-1252.

BIOMIN 2023. World Mycotoxin Survey, The Global Threat, Q1 2023
<https://www.dsm.com/anh/products-and-services/tools/mycotoxin-contamination/biomin-mycotoxin-survey.html>

Bolton E. E. - Wang Y. - Thiessen P. A. - Bryant S. H.: 2008. PubChem: integrated platform of small molecules and biological activities. [In Ralph A. Wheeler, David C. Spellmeyer (eds.) *Annual Reports in Computational Chemistry*] Elsevier, 4. 217-241.

Boonen J. - Malysheva S. V. - Taevernier L. - Di Mavungu J. D. - De Saeger S. - De Spiegeleer B.: 2012. Human skin penetration of selected model mycotoxins. *Toxicology*, 301. 21-32.

- Borbély M. - Sipos P. - Pelles F. - Győri Z.: 2010. Mycotoxin contamination in cereals. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 16. 96-98.
- Borreani G. - Tabacco E. - Schmidt R. J. - Holmes B. J. - Muck R. E.: 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*. 101. 3952-3979.
- Boudra H. - Morgavi D. P.: 2008. Reduction in *Fusarium* toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 4523-4528.
- Boudra H. - Barnouin J. - Dragacci S. - Morgavi D. P.: 2007. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 90. 3197-3201.
- Bracarense A. P. F. - Luciola J. - Grenier B. - Pacheco G. D. - Moll W. D. - Schatzmayr G. - Oswald I. P.: 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *British Journal of Nutrition*. 107. 1776-1786.
- Brown S. - Santa Maria J. P. - Walker S.: 2013. Wall teichoic acids of Gram-positive bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. 67. 313-336.
- Bullerman L. B. - Bianchini A.: 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*. 119. 140-146.
- Bullerman L. B. - Bianchini A.: 2014. Good food-processing techniques: stability of mycotoxins in processed maize-based foods. [In John F. Leslie, Antonio F. Logrieco (Szerk.) Mycotoxin reduction in grain chains]. John Wiley & Sons, Ltd. 89-100.
- Camardo Leggieri M. - Pietri A. - Battilani P.: 2020. Modelling fungal growth, mycotoxin production and release in grana cheese. *Microorganisms*. 8. 69.
- Campagnollo F. B. - Ganey K. C. - Khaneghah A. M. - Portela J. B. - Cruz A. G. - Granato D. - Corassin C. H. - Oliveira C. A. F. - Sant'Ana A. S.: 2016. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control*. 68. 310-329.

- Caroff M. - Karibian D.: 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*. 338. 2431-2447.
- Carvalho B. F. - Ávila C. L. S. - Krempser P. M. - Batista L. R. - Pereira M. N. - Schwan R. F.: 2016. Occurrence of mycotoxins and yeasts and moulds identification in corn silages in tropical climate. *Journal of Applied Microbiology*. 120. 1181-1192.
- 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.
- Cavallarin L. - Tabacco E. - Antoniazzi S. - Borreani G.: 2011. Aflatoxin accumulation in whole crop maize silage as a result of aerobic exposure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91. 2419-2425.
- Chakraborty S. - Murray G. M. - Magarey P. A. - Yonow T. - O'Brien R. G. - Croft B. J. - Barbetti M. J. - Sivasithamparam K. - Old K. M. - Dudzinski M. J. - Sutherst R. W.: 1998. Potential impact of climate change on plant diseases of economic significance to Australia. *Australasian Plant Pathology*. 27. 15-35.
- Chalivendra S. - Ham J. H.: 2019. Bacilli in the Biocontrol of Mycotoxins. [In: Islam, M., Rahman, M., Pandey, P., Boehme, M., Haesaert, G. (eds) *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol. Bacilli in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting.*] Springer, Chambridge. 2. 49-62.
- Chen S. W. - Hsu. J. T. - Chou Y. A. - Wang H. T.: 2018. The application of digestive tract lactic acid bacteria with high esterase activity for zearalenone detoxification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98. 3870-3879.
- Chulze S. N.: 2010. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: A review. *Food Additives & Contaminants Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 27. 651-657.
- Coffey R. - Cummins E. - Ward S.: 2009. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. *Food Control*. 20. 239-249.
- Čonková E. - Laciakova A. - Kováč G. - Seidel H.: 2003. Fusarial toxins and their role in animal diseases. *The Veterinary Journal*. 165. 214-220.

- Cretenet M. - Laroute V. - Ulvé V. - Jeanson S. - Nouaille S. - Even S. - Piot M. - Girbal L. - Le Loir Y. - Loubière P. - Lortal S.: 2011. Dynamic analysis of the *Lactococcus lactis* transcriptome in cheeses made from milk concentrated by ultrafiltration reveals multiple strategies of adaptation to stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 77. 247-257.
- Dailey R. E. - Reese R. E. - Brouwer E. A.: 1980. Metabolism of [14C] zearalenone in laying hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28. 286-291.
- Dalié D. K. D. - Deschamps A. M. - Richard-Forget F.: 2010. Lactic acid bacteria—Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21. 370-380.
- Dänicke S. - Winkler J.: 2015. Invited review: Diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). *Food and Chemical Toxicology*, 84. 225-249.
- De Boevre M. - Di Mavungu J. D. – Landschoot S. - Audenaert K. - Eeckhout M. - Maene P. - Haesaert G. - De Saeger S.: 2012. Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotoxin Journal*, 5. 207-219.
- De Santis B. - Raggi M. E. - Moretti G. - Facchiano F. - Mezzelani A. - Villa L. - Bonfanti A. - Campioni A. - Rossi S. - Camposeo S. - Soricelli S.: 2017. Study on the association among mycotoxins and other variables in children with autism. *Toxins*, 9. 203.
- De Souza C. - Khaneghah A. M. - Oliveira C. A. F.: 2021. The occurrence of aflatoxin M1 in industrial and traditional fermented milk: a systematic review study. *Italian Journal of Food Science*, 33. 12-23.
- Del Ponte E. M. - Moreira G. M. - Ward T. J. - O'Donnell K. - Nicolli C. P. - Machado F. J. - Duffeck M. R. - Alves K. S. - Tessmann D. J. - Waalwijk C. - Van der Lee T.: 2022. *Fusarium graminearum* species complex: a bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotypes. *Phytopathology*, 112. 741-751.

- Deepthi B.V. - Somashekaraiiah R. - Poornachandra Rao K. - Deepa N. - Dharanisha N. K. - Girish K. S. - Sreenivasa M. Y.: 2017. *Lactobacillus plantarum* MYS6 ameliorates fumonisin B1-induced hepatorenal damage in broilers. *Front. Microbiol.* 8. 2317.
- Denli M. - Perez J.: 2010. Ochratoxins in feed, a risk for animal and human health: control strategies. *Toxins*, 2. 1065–1077.
- Dobolyi C. - Sebők F. - Varga J. - Kocsubé S. - Szigeti G. - Baranyi N. - Szécsi Á. - Lustyik G. - Micsinai A. - Tóth B. - Varga M.: 2011. Aflatoxin-termelő *Aspergillus flavus* törzsek előfordulása hazai kukorica szemtermésben. *Növényvédelem*, 47. 125-133.
- Dogi C.A. - Fochesato A. - Armando R. - Pribull B. - de Souza M.M. - da Silva Coelho I. - Araújo de Melo D. - Dalcerro A. - Cavaglieri L.: 2013. Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *Journal of Applied Microbiology*. 114. 1650–1660.
- Driehuis F. - Elferink S. J. W. H. O.: 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. *Veterinary Quarterly*, 22. 212–216.
- Driehuis F. - Spanjer M. C. - Scholten J. M. - Te Giffel M. C.: 2008. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Additives and Contaminants*, 1. 41-50.
- Duarte S. C. - Pena A. - Lino C. M.: 2011. Human ochratoxin A biomarkers—From exposure to effect. *Critical Reviews in Toxicology*, 41. 187-212.
- Duarte S. C. - Pena A. - Lino C. M.: 2010. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, 27. 187-198.
- Ediage E. N. - Di Mavungu J. D. - Song S. - Sioen I. - De Saeger S.: 2013. Multimycotoxin analysis in urines to assess infant exposure: a case study in Cameroon. *Environment International*, 57. 50-59.
- El Khoury A. - Atoui A.: 2010. Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins*, 2. 461-493.

- El-Nezami H. - Polychronaki N. - Lee Y. K. - Haskard C. - Juvonen R. - Salminen S. - Mykkänen H.: 2004. Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52. 4577–4581
- El-Nezami H. - Polychronaki N. - Salminen S. - Mykkanen H.: 2002a. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative-zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology*. 68. 3545–3549.
- El-Nezami H. S. - Kankaanpää P. - Salminen S. - Ahokas J.: 1998. Physiochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *Journal of Food Protection*, 61. 466–468
- El-Nezami H. S. – Chrevatidis A. - Auriola S. - Salminen S. - Mykkänen H.: 2002b. Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives & Contaminants*. 19. 680–686
- Emmott A.: 2013. Market-led aflatoxin interventions: Smallholder groundnut value chains in Malawi. [In Unnevehr, L. J. and Grace, D. (szerk.) *Aflatoxins: Finding solutions for improved food safety, 2020 Vision Focus brief*] 20. Washington, D.C.: International Food Policy Research Institute (IFPRI).
- European Commission, 2006. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC). *Official Journal of the European Communities*, 229. 7-9.
- European Commission, 2006. No 1881/2006 of 19 December 2006, as amended, on setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, 364. 5-24.
- Ezekiel C.N. - Abia W.A. - Braun D. - Šarkanj B. - Ayeni K.I. - Oyedele O.A. - Michael-Chikezie E.C. - Ezekiel V.C. - Mark B.N. - Ahuchaogu C.P. - Krska, R.: 2022. Mycotoxin exposure biomonitoring in breastfed and non-exclusively breastfed Nigerian children. *Environment International*, 158. 106996.

- Fabiszewska A.U. - Zielińska K.J. - Wróbel B.: 2019. Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: A minireview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 35. 1-8.
- Fagan R. P. - Fairweather, N. F.: 2014. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nature Reviews Microbiology*. 12. 211–222.
- Fazekas B. - Tar A. - Kovacs M.: 2005. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives and Contaminants*, 22. 856-863.
- Federhen S.: 2015. Type material in the NCBI Taxonomy Database. *Nucleic Acids Research*, 43. D1086-D1098.
- Fink-Gremmels J. - Malekinejad, H. J. A. F.: 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137. 326-341.
- Föllmann W. - Ali N. - Blaszkewicz M. - Degen G. H.: 2016. Biomonitoring of mycotoxins in urine: pilot study in mill workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79. 1015-1025.
- Freire L. - Sant'Ana A. S.: 2018. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology*, 111. 189-205.
- Frisvad J. C. - Smedsgaard J. - Samson R. A. - Larsen T. O. - Thrane U.: 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55. 9727-9732.
- Gelineau-van Waes J. - Starr L. - Maddox J. - Aleman F. - Voss K. A. - Wilberding J. - Riley R. T.: 2005. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: mechanisms in an in vivo mouse model. *Birth defects research part A: clinical and molecular teratology*. 73. 487-497.
- Gallo A. - Masoero F. - Bertuzzi T. - Piva G. - Pietri A.: 2010. Effect of the inclusion of adsorbents on aflatoxin B1 quantification in animal feedstuffs. *Food Addit. Contam. Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 27. 54–63

- Gallo A. - Ghilardelli F. - Atzori A. S. - Zara S. - Novak B. - Faas, J. - Fancello F.: 2021. Co-occurrence of regulated and emerging mycotoxins in corn silage: Relationships with fermentation quality and bacterial communities. *Toxins*, 13. 232.
- Garon D. - Richard E. - Sage L. - Bouchart V. - Pottier D. - Lebailly P.: 2006. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54. 3479-3484.
- Goering H.K. - Van Soest P.J. - Hemken R.W. 1973. Relative susceptibility of forages to heat damage as affected by moisture, temperature, and pH. *Journal of Dairy Science*, 56. 137-143.
- 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.
- González-Osnaya L. - Cortés C. - Soriano J. M. - Moltó J. C. - Manes J.: 2011. Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialised in Spain. *Food Chemistry*, 124. 156-161.
- Gouhis F. - Moujahed N. - Nefzaoui A. - Louhaichi M.: 2017. Successful silage: Keeping forages for a long time while maintaining good quality. Tunis, Tunisia: Office de l'Élevage et des Pâturages; Livestock and Pasture Authority (OEP).
- Grenier B. - Applegate T. J.: 2013. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins*, 5. 396-430.
- Gromadzka K. - Waskiewicz A. - Chelkowski J. - Golinski P.: 2008. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal*, 1. 209-220.
- Gundogan N.: 2014. Klebsiella. [In C. A. Batt és M. L. Tortorello (szerk.) *Encyclopedia of Food Microbiology*] Academic Press, pp. 383-388.

- Hanvi D. M. - Lawson-Evi P. - De Boevre M. - Goto C. E. - De Saeger S. - Eklugadegbeku K.: 2019. Natural occurrence of mycotoxins in maize and sorghum in Togo. *Mycotoxin research*, 35. 321-327.
- Haskard C. A. - El-Nezami H. S. - Kankaanpää P. E. - Salminen S. - Ahokas J. T.: 2001. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67. 3086-3091.
- Haskard C. - Binnion C. - Ahokas J.: 2000. Factors Affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*. 128. 39-49.
- Hatab S. - Yue T. - Mohamad O.: 2012. Removal of patulin from apple juice using inactivated lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 112. 892-899.
- He M. - Li X. - Liu H. - Miller S. J. - Wang G. - Rensing C.: 2011. Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *Journal of Hazardous Materials*, 185. 682-688.
- Her J. - Kim J.: 2013. *Rummeliibacillus suwonensis* sp. nov., isolated from soil collected in a mountain area of South Korea. *Journal of Microbiology*, 51. 268-272.
- Hernandez-Mendoza A. - Garcia H. S. - Steele J. L.: 2009. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 47. 1064-1068.
- Heshmati A. - Khorshidi M. - Khaneghah A M.: 2021. The prevalence and risk assessment of aflatoxin in sesame-based products. *Ital J Food Sci*. 33. 92-102.
- Holzappel W. H. - Wood B. J. szerk.: 2014. Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley & Sons
- Hu Z. - Chang J. - Yu J. - Li S. - Niu H.: 2018. Diversity of bacterial community during ensiling and subsequent exposure to air in whole-plant maize silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 31. 1464-1473.

Huang J. - Li J. - Wang G.: 2016. Production of a microcapsule agent of chromate-reducing *Lysinibacillus fusiformis* ZC1 and its application in remediation of chromate-spiked soil. *SpringerPlus*. 5. 1-10.

Huerta-Treviño A. - Dávila-Aviña J. E. - Sánchez E. - Heredia N. - García S.: 2016. Occurrence of mycotoxins in alfalfa (*Medicago sativa* L.), sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], and grass (*Cenchrus ciliaris* L.) retailed in the state of Nuevo León, México. *Agrociencia*, 50. 825-836.

Huisden C. M. - Adesogan A. T. - Kim S. C. - Ososanya T.: 2009. Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of dairy science*. 92. 690-697.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012. Pharmaceuticals. Volume 100 A. A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 100. 1.

Iglesias C. - Bach A. - Devant M. - Adelantado C. - Calvo M. A.: 2005. The effect of *Lactobacillus buchneri* inoculation on corn silages conservation. [In Proceedings of the XI Jornadas sobre Producción Animal, Gobierno de Aragón, Servicio de Investigación Agroalimentaria], Zaragoza, Spain, 11–12 May; pp. 611–613.

Ismail A. - Levin R. E. - Riaz M. - Akhtar S. - Gong Y. Y. - de Oliveira C. A.: 2017. Effect of different microbial concentrations on binding of aflatoxin M1 and stability testing. *Food Control*, 73. 492-496.

ISO, E., 2013. Microbiology of the food chain—Horizontal method for the enumeration of microorganisms—Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. ISO Norm, 4833. 1-2013. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

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

- James B. - Adda C. - Cardwell K. - Annang D. - Hell K. - Korie S. - Eдорh M. - Gbeassor F. - Nagatey K. - Houenou G.: 2007. Public information campaign on aflatoxin contamination of maize grains in market stores in Benin, Ghana and Togo. *Food Additives and Contaminants*, 24. 1283-1291.
- Jard G. - Liboz T. - Mathieu F. - Guyonvarc'h A. - Lebrihi A.: 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants*, 28. 1590-1609.
- Jensen T. - De Boevre M. - De Saeger S. - Preußke N. - Sönnichsen F. D. - Kramer E. - Klink H. - Verreet J-A. - Birr T.: 2020. Effect of ensiling duration on the fate of deoxynivalenol, zearalenone and their derivatives in maize silage. *Mycotoxin Research*, 36. 127-136.
- Jensen T. - De Boevre M. - Preußke N. - De Saeger S. - Birr T. - Verreet J. A. - Sönnichsen F. D.: 2019. Evaluation of high-resolution mass spectrometry for the quantitative analysis of mycotoxins in complex feed matrices. *Toxins*, 11. E531.
- Ji C. - Fan Y. - Zhao L.: 2016. Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition*, 2. 127-133.
- Jiang S. Z. - Yang Z. B. - Yang W. R. - Wang S. J. - Wang Y. - Broomhead J. - Johnston S. L. - Chi F.: 2012. Effect on hepatonephric organs, serum metabolites and oxidative stress in post-weaning piglets fed purified zearalenone-contaminated diets with or without Calibrin-Z. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96. 1147-1156.
- Joung K. B. - Côté J. C.: 2002. Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. *Journal of Applied Microbiology*, 92. 97-108.
- Kamyar S. - Movassaghazani M.: 2017. Reduction of Aflatoxin M1 in milk using Kefir Starter. *Iranian Journal of Toxicology*, 11. 27-31.
- Keller L. A. M. - Pereyra M. G. - Keller K. M. - Alonso V. A. - Oliveira A. A. - Almeida T. X. - Barbosa T. S. - Nunes L. M. T. - Cavaglieri L. R. - Rosa C. A. R.:

2013. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research*, 52. 42-47.

Kemboi D. C. - Antonissen G. - Ochieng P. E. - Croubels S. - Okoth S. - Kangethe E. K. - Faas J. - Lindahl J. F. - Gathumbi J. K.: 2020. A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: Challenges for food safety and dairy production in sub-Saharan Africa. *Toxins*, 12. 222.

Khaneghah AM, Moosavi M, Omar SS, Oliveira CA, Karimi-Dehkordi M, Fakhri Y, Sant'Ana A S.:2021. The prevalence and concentration of aflatoxin M1 among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Food Control*, 125. 107960.

Kim D. H. - Lee K. D. - Choi K. C.: 2021. Role of LAB in silage fermentation: Effect on nutritional quality and organic acid production—An overview. *AIMS Agriculture and Food*. 6. 216–234.

Koraichi F. - Videmann B. - Mazallon M. - Benahmed M. - Prouillac C. - Lecoeur S.: 2012. Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver. *Toxicology Letters*, 211. 246-256.

Korosteleva S. N. - Smith T. K. - Boermans H. J.: 2009. Effects of feed naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on metabolism and immunity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92. 1585-1593.

Kosicki R. - Błajet-Kosicka A. - Grajewski J. - Twarużek M.: 2016. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 215. 165-180.

Kung Jr. L. - Shaver R. D. - Grant R. J. - Schmidt R. J.: 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 101. 4020-4033.

Kung L. - Shaver R.: 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. *Focus on Forage*, 3. 1-5.

- Lahtinen S. J. - Haskard C. A. - Ouwehand A. C. - Salminen S. J. - Ahokas J. T.: 2004. Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants*, 21. 158-164.
- Laitila A.: 2015. Toxigenic fungi and mycotoxins in the barley-to-beer chain. [In A. E. Hill (szerk.) *Brewing Microbiology, Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition] Woodhead Publishing, 107-139.
- Lancaster M. C. - Jenkins F. P. - Philp J. M.: 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 192. 1095-1096.
- Lili Z. - Junyan W. - Hongfei Z. - Baoqing Z. - Bolin Z.: 2018. Detoxification of cancerogenic compounds by lactic acid bacteria strains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58. 2727-2742.
- Lin H. - Lin S. - Awasthi M. K. - Wang Y. - Xu P.: 2021. Exploring the bacterial community and fermentation characteristics during silage fermentation of abandoned fresh tea leaves. *Chemosphere*, 283. 131234.
- Luo Y. - Liu X. - Yuan L. - Li J.: 2020. Complicated interactions between bio-adsorbents and mycotoxins during mycotoxin adsorption: Current research and future prospects. *Trends Food Science and Technology*. 96. 127–134.
- Ma Z. X. - Amaro F. X. - Romero J. J. - Pereira O. G. - Jeong K. C. - Adesogan A. T.: 2017. The capacity of silage inoculant bacteria to bind aflatoxin B1 *in vitro* and in artificially contaminated corn silage. *Journal of Dairy Science*, 100. 7198-7210.
- Magnusson J. - Ström K. - Roos S. - Sjögren J. - Schnürer J.: 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219. 129-135.
- Mahmood Fashandi H. - Abbasi R. - Mousavi Khaneghah A.: 2018. The detoxification of aflatoxin M1 by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42. e13704.

- Makun H. A. - Dutton M. F. - Njobeh P. B. - Mwanza M. - Kabiru A.Y.: 2011. Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria. *Mycotoxin Research*, 27. 97-104.
- Maleki F. - Abdi S. - Davodian E. - Haghani K. - Bakhtiyari S.: 2015. Exposure of infants to aflatoxin M1 from mother's breast milk in Ilam, Western Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 6. 283-287.
- Mally A. - Solfrizzo M. - Degen G. H.: 2016. Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: Current state-of-the art and application to human exposure assessment. *Archives of Toxicology*, 90. 1281-1292.
- Mankevičienė A. - Gaurilčikienė I. - Dabkevičius Z. - Semaškienė R. - Mačkinitė R. - Supronienė S.: 2006. Mycotoxin contamination of Lithuanian-grown cereal grains and factors determining it. *Ekologija*, 3. 21-27.
- Marin S. - Ramos A. J. - Cano-Sancho G. - Sanchis V.: 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60. 218–237.
- Markov K. - Pleadin J. - Bevardi M. - Vahčić N. - Sokolić-Mihalak D. - Frece J.: 2013. Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, 34. 312-317.
- Masri M. S. - Lundin R. E. - Page J. R. - Garcia V. C.: 1967. Crystalline aflatoxin M1 from urine and milk. *Nature*, 215. 753-755.
- Masson-Delmotte V. - Zhai P. - Pirani A. - Connors S. L. - Péan C. - Berger S. - Caud N. – Chen Y. - Goldfarb L. - Gomis M. I. - Huang M.: 2021. Climate change 2021: the physical science basis. Contribution of working group I to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change (IPCC), 2.
- Mata A. T. - Ferreira J. P. - Oliveira B. R. - Batoréu M. C. - Crespo M. B. - Pereira V. J. - Bronze M. R.: 2015. Bottled water: Analysis of mycotoxins by LC–MS/MS. *Food Chemistry*, 176. 455-464.
- Matz C. - Kjelleberg S.: 2005. Off the hook how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiology*, 13. 302–307.

- McAuliffe O.: 2018. Symposium review: *Lactococcus lactis* from nondairy sources: their genetic and metabolic diversity and potential applications in cheese. *Journal of Dairy Science*, 101. 3597-3610.
- McDonald P. - Henderson A. R. - Heron S. J. E.: 1991. *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Chalcombe, Marlow, UK.
- Meca G. - Blaiotta G. - Ritieni A.: 2010. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control*, 21. 579–583.
- Medina Á. - González-Jartín J. M. - Sainz M. J.: 2017. Impact of global warming on mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, 18. 76-81.
- Melnick R. L. - Suárez C. - Bailey B. A. - Backman P. A.: 2011. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*. 57. 236–245
- Meroueh S. O. - Bencze K. Z. - Heseck D. - Lee M. - Fisher J. F. - Stemmler T. L. - Mobashery S.: 2006. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103. 4404-4409.
- Minervini F. - Giannoccaro A. - Fornelli F. - Dell'Aquila M. E. - Minoia P. - Visconti A.: 2006. Influence of mycotoxin zearalenone and its derivatives (alpha and beta zearalenol) on apoptosis and proliferation of cultured granulosa cells from equine ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4. 1-9.
- Miraglia M. - Marvin H. J. P. - Kleter G. A. – Battilani P. - Brera C. - Coni E. - Cubadda F. - Croci L. - De Santis B. - Dekkers S. - Filippi L.: 2009. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 47. 1009-1021.
- Miwa H. - Ahmed I. - Yokota A. - Fujiwara T.: 2009. *Lysinibacillus parviboronicapiens* sp. nov., a low-boron-containing bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59. 1427–1432
- Mogensen J. M. - Frisvad J. C. - Thrane U. - Nielsen K. F.: 2010. Production of fumonisin B2 and B4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58. 954-958.

- Mohsen M. - Hamid T. - Foroud B. – Fernandes O. C. A. - Humberto C. C. - Mousavi K. A.: 2020. Aflatoxin B1 in the Iranian pistachio nut and decontamination methods: A systematic review. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 12. 15-25.
- Mousavi Khaneghah A. - Chaves R. - Akbarirad, H.: 2017. Detoxification of aflatoxin M1 (AFM1) in dairy base beverages (acidophilus milk) by using different types of lactic acid bacteria-mini review. *Current Nutrition & Food Science*, 13. 78-81.
- Muhialdin B. J. - Saari N. - Meor Hussin, A. S.: 2020. Review on the biological detoxification of mycotoxins using lactic acid bacteria to enhance the sustainability of foods supply. *Molecules*, 25. 2655.
- Mwihia E. W. - Lyche J. L. - Mbuthia P. G. - Ivanova L. - Uhlig S. - Gathumbi J. K. - Maina J. G. - Eshitera E. E. - Eriksen G. S.: 2020. Co-occurrence and levels of mycotoxins in fish feeds in Kenya. *Toxins*, 12. 627.
- Neme K. - Mohammed A.: 2017. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*, 78. 412–425.
- Nesic K. - Ivanovic S. - Nesic V.: 2013. Fusarial toxins: secondary metabolites of *Fusarium* fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 228. 101-120.
- 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.
- Niderkorn V. - Boudra H. - Morgavi D. P.: 2006. Binding of fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *Journal of Applied Microbiology*. 101. 849–856.
- O’Brien M. - O’Kiely P. - Forristal P. D. - Fuller H. T.: 2007. Quantification and identification of fungal propagules in well-managed baled grass silage and in normal on-farm produced bales. *Animal Feed Science and Technology*, 132. 283-297.
- Ogunade I. M. - Martinez-Tupia C. – Queiroz O. C. M. - Jiang Y. - Drouin P. - Wu F. - Vyas D. - Adesogan A. T.: 2018. *Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation*. *Journal of Dairy Science*, 101. 4034-4059.

- Opdahl L.: 2017. Identification of candidate cellulose utilizing bacteria from the rumen of beef cattle, using bacterial community profiling and metagenomics. Electronic Theses and Dissertations. South Dakota State University, USA.
- Ortiz J. - Van Camp J. - Mestdagh F. - Donoso S. - De Meulenaer B.: 2013. Mycotoxin co-occurrence in rice, oat flakes and wheat noodles used as staple foods in Ecuador. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30. 2165-2176.
- Ostry V. - Malir F. - Toman J. - Grosse Y.: 2017. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33. 65-73.
- Pahlow G. - Muck R. E. - Driehuis F. - Elferink S. J. O. - Spoelstra S. F.: 2003. Microbiology of ensiling. *Silage Science and Technology*, 42. 31-93.
- Parkouda C. - Thorsen L. - Compaoré C. S. - Nielsen D. S. - Tano-Debrah K. - Jensen J. S. - Diawara B. - Jakobsen M.: 2010. Microorganisms associated with Maari, a Baobab seed fermented product. *International Journal of Food Microbiology*, 142. 292-301.
- Paterson R. R. M. – Lima N.: 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43. 1902-1914.
- Paterson R. R. M.: 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41. 1467-1474.
- Peles F. - Sipos P. - Kovács S. - Győri Z. - Pócsi I. - Pusztahelyi T.: 2021. Biological control and mitigation of aflatoxin contamination in commodities. *Toxins*, 13. 104.
- Peltonen K. - El-Nezami H. - Haskard C. - Ahokas J. - Salminen S.: 2001. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84. 2152-2156.
- Pereyra M. G. - Alonso V. A. - Sager R. - Morlaco M. B. - Magnoli C. E. - Astoreca A. L. - Rosa C. D. R. - Chiacchiera S. M. - Dalcero A. M. - Cavaglieri L. R.: 2008. Fungi and selected mycotoxins from pre-and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, 104. 1034-1041.
- Pestka J. J. - Smolinski A. T.: 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 8. 39-69.

- Porto M. C. W. - Kuniyoshi T. M. - Azevedo P. O. S. - Vitolo M. - Oliveira R. S.: 2017. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 35. 361-374.
- 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.
- Prandini A. - Tansini G. – Sigolo S. - Filippi L. - Laporta M. - Piva G.: 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47. 984-991.
- Queiroz O. C. M. - Kim S. C. - Adesogan A. T.: 2012. Effect of treatment with a mixture of bacteria and fibrolytic enzymes on the quality and safety of corn silage infested with different levels of rust. *Journal of Dairy Science*, 95. 5285-5291.
- Ragoubi C. - Quintieri L. - Greco D. - Mehrez A. - Maatouk I. - D'Ascanio V. - Landoulsi A. - Avantaggiato G.: 2021. Mycotoxin removal by *Lactobacillus* spp. and their application in animal liquid feed. *Toxins*, 13. 185.
- Richard E. - Heutte N. - Sage L. - Pottier D. - Bouchar V. - Lebailly P. - Garon D.: 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology*, 45. 2420-2425.
- Richard J. L.: 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses. - An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119. 3-10.
- Richter W. I. F. - Schuster M. - Rattenberger E.: 2002. Einfluss der fermentation von silomais auf die nachweisbarkeit von Deoxynivalenol (DON). *Mycotoxin Research*, 18. 16–19.
- Rodrigues I. - Handl J. - Binder E. M.: 2011. Mycotoxin occurrence in commodities, feeds and feed ingredients sourced in the Middle East and Africa. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 4. 168-179.
- Rodríguez-Blanco M. - Ramos A. J. - Sanchis V. - Marín S.: 2021. Mycotoxins occurrence and fungal populations in different types of silages for dairy cows in Spain. *Fungal Biology*, 125. 103-114.

- Ropejko K. - Twarużek M.: 2021. Zearalenone and its metabolites. - General overview, occurrence, and toxicity. *Toxins*, 13. 35.
- Rubert J. - León N. - Sáez C. - Martins C. P. - Godula M. - Yusà V. - Manes J. - Soriano J. M. - Soler C.: 2014. Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 820. 39-46.
- Saad A. M. - Abdelgadirt A. M. - Moss M. O.: 1995. Exposure of infants to aflatoxin M1 from mothers' breast milk in Abu Dhabi, UAE. *Food Additives & Contaminants*, 12. 255-261.
- Sani A. M. - Marhamati Z. - Marhamatizade M. H.: 2014. Bio-detoxification of aflatoxin M1 in kefir using *Lactobacillus casei*. *BioTechnology: An Indian Journal*, 9.
- Savi G. D. - Piacentini K. C. - Tibola C. S. - Santos K. - Maria G. S. - Scussel V. M.: 2016. Deoxynivalenol in the wheat milling process and wheat-based products and daily intake estimates for the Southern Brazilian population. *Food Control*, 62. 231-236.
- Schaarschmidt S. - Fahl-Hassek C.: 2018. The fate of mycotoxins during the processing of wheat for human consumption. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17. 556-593.
- Schär-Zammaretti P. - Ubbink J.: 2003. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical Journal*, 85. 4076- 4092.
- Schnepf E. - Crickmore N. - Van Rie J. - Lereclus D. - Baum J. - Feitelson J. - Zeigler D. R. - Dean D.: 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62. 775-806.
- Schnürer J. - Magnusson J.: 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16. 70-78.
- Schoch C. L. - Ciufu S. - Domrachev M. - Hotton 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.

- Schroeder J. W.: 2004. Quality Forage: Silage Fermentation and Preservation. AS-1254 North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA
- Schuster B. - Pum D. - Sleytr U. B.: 2010. S-layer stabilized lipid membranes (Review). *Europe PMC Funders Group*, 3. 1-19.
- Sebaei A. S. - Sobhy H. M. - Fouzy A. S. M. - Hussain O. A.: 2022. Occurrence of zearalenone in grains and its reduction by gamma radiation. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 102. 2503-2511.
- Seid A. - Mama A.: 2019. Aflatoxicosis and occurrence of aflatoxin M1 (AFM1) in milk and dairy products: a review. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 1. 1-12.
- Serrano-Niño J. C. - Cavazos-Garduño A. - Cantú-Cornelio F. - González-Córdova A. F. - Vallejo-Córdova B. - Hernández-Mendoza A. - García H. S.: 2015. In vitro reduced availability of aflatoxin B1 and acrylamide by bonding interactions with teichoic acids from *Lactobacillus* strains. *LWT-Food Science and Technology*, 64. 1334–1341.
- Sleytr U. B. - Schuster B. - Egelseer E. - Pum D.: 2014. S-layers: Principles and applications. *FEMS Microbiology*, 38. 823–864
- Smit E. - Oling F. - Demel R. - Martinez B. - Pouwels P. H.: 2001. The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356: Identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *Journal of Molecular Biology*, 305. 245-257
- Smith M. C. - Madec S. - Coton E. - Hymery N.: 2016. Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. *Toxins*, 8. 94.
- Sohár P.: 2007. Mikotoxinok az élelmiszerláncban. *Élelmiszervizsgálati Közlemények. Különszám*, 53. 60-68.
- Soleas G. J. - Yan J. - Goldberg D. M.: 2001. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49. 2733-2740.

- Solfrizzo M. - Piemontese L. - Gambacorta L. - Zivoli R. - Longobardi F.: 2015. Food coloring agents and plant food supplements derived from *Vitis vinifera*: a new source of human exposure to ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63. 3609-3614.
- Stadler D. - Lambertini F. - Bueschl C. - Wiesenberger G. - Hametner C. - Schwartz-Zimmermann H. - Hellinger R. - Sulyok M. - Lemmens M. - Schuhmacher R. - Suman M.: 2019. Untargeted LC–MS based ¹³C labelling provides a full mass balance of deoxynivalenol and its degradation products formed during baking of crackers, biscuits and bread. *Food Chemistry*, 279. 303-311.
- Stockmann-Juvala H. - Savolainen K.: 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human & experimental toxicology*, 27. 799-809.
- Sun L. - Bai C. - Xu H. - Na N. - Jiang Y. - Yin G. - Liu S. - Xue Y.: 2021. Succession of bacterial community during the initial aerobic, intense fermentation, and stable phases of whole-plant corn silages treated with lactic acid bacteria suspensions prepared from other silages. *Frontiers in Microbiology*, 12. 655095.
- Tabuc C. - Marin D. - Guerre P. - Sesan T. - Bailly J. D.: 2009. Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. *Journal of Food Protection*, 72. 662-665.
- Takahashi-Ando N. - Ohsato S. - Shibata T. - Hamamoto H. - Yamaguchi I. - Kimura M.: 2004. Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70. 3239-3245.
- Tian Y. - Zhang D. - Cai P. - Lin H. - Ying H. - Hu Q. N. - Wu A.: 2022. Elimination of fusarium mycotoxin Deoxynivalenol (DON) via microbial and enzymatic strategies: Current status and future perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 124. 96-107.
- Tinyiro S. E. - Yao W. - Sun X. - Wokadala C. - Wang S.: 2011. Scavenging of zearalenone by *Bacillus* strains in vitro. *Research Journal of Microbiology*, 6. 304–309.

- Tirado M. C. - Clarke R. - Jaykus L. A. - McQuatters-Gollop A. - Frank J. M.: 2010. Climate change and food safety: A review. *Food Research International*, 43. 1745-1765.
- Tralamazza S. M. - Piacentini K. C. - Savi G. D. - Carnielli-Queiroz L. - de Carvalho Fontes L. - Martins C. S. - Corrêa B. - Rocha L. O.: 2021. Wild rice (*O. latifolia*) from natural ecosystems in the Pantanal region of Brazil: Host to *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex and highly contaminated by zearalenone. *International Journal of Food Microbiology*, 345. 109127.
- Tran S. T. - Smith T. K.: 2011. Determination of optimal conditions for hydrolysis of conjugated deoxynivalenol in corn and wheat with trifluoromethanesulfonic acid. *Animal Feed Science and Technology*, 163. 84-92.
- Ueberschär K. H. - Brezina U. - Dänicke S.: 2016. Zearalenone (ZEN) and ZEN metabolites in feed, urine and bile of sows: Analysis, determination of the metabolic profile and evaluation of the binding forms. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 1. 21-28.
- Unusan N.: 2006. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 44. 1897-1900.
- Van Dommelen A. - Vanderleyden J.: 2007. Associative nitrogen fixation. [In H. Bothe, S. J. Ferguson, W. E. Newton (szerk.) *Biology of the nitrogen cycle*] Elsevier, 179-192.
- Varga E. - Malachova A. - Schwartz H. - Krska R. - Berthiller F.: 2013. Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30. 137-146.
- Vaughan M. M. - Huffaker A. - Schmelz E. A. - Dafoe N. J. - Christensen S. A. - McAuslane H. J. - Alborn H. T. - Allen L. H. - Teal P. E.: 2016. Interactive effects of elevated [CO₂] and drought on the maize phytochemical defense response against mycotoxigenic *Fusarium verticillioides*. *PLoS One*, 11. e0159270.

- Ventura M. - Jankovic I. - Walker D. C. - Pridmore R. D. - Zink R.: 2002. Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68. 6172-6181.
- 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.
- Wang J. - Fan Y. - Yao Z.: 2010. Isolation of a *Lysinibacillus fusiformis* strain with tetrodotoxin-producing ability from puffer fish *Fugu obscurus* and the characterization of this strain. *Toxicon*, 56. 640–643.
- Wang G. - Yu M. - Dong F. – Shi J. - Xu J.: 2017. Esterase activity inspired selection and characterization of zearalenone degrading bacteria *Bacillus pumilus* ES-21. *Food Control*, 77. 57-64.
- Wang L. - Zhang Q. - Yan Z. - Tan Y. - Zhu R. - Yu D. - Yang H. - Wu A.: 2018. Occurrence and quantitative risk assessment of twelve mycotoxins in eggs and chicken tissues in China. *Toxins*, 10. 477.
- Weidenbörner M.: 2001. Encyclopedia of Food Mycotoxins. Springer-Verlag, Berlin, 173
- Wen J. - Kong W. - Hu Y. - Wang J. - Yang M.: 2014. Multi-mycotoxins analysis in ginger and related products by UHPLC-FLR detection and LC-MS/MS confirmation. *Food Control*, 43. 82-87.
- Westlake K. - Mackie R. I. - Dutton M. F.: 1987. T-2 toxin metabolism by ruminal bacteria and its effect on their growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 53. 587-592.
- Wicken A. J. - Gibbens J. W. - Knox K. W.: 1972. Comparative studies on the isolation of membrane lipo-teichoic acid from *Lactobacillus fermenti* 6991. *Journal of Bacteriology*, 113. 365–372.
- Wilson K.: 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 56. 2-4.

- Wu F. - Khlangwiset P.: 2010. Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin-reduction strategies in Africa: case studies in biocontrol and post-harvest interventions. *Food Additives and Contaminants*, 27. 496-509.
- Wu Q. - Jezkova A. - Yuan Z. - Pavlikova L. - Dohnal V. - Kuca K.: 2009. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, 41. 1-7.
- Wu Q. - Wu W. - Kuca K.: 2020. From hypoxia and hypoxia-inducible factors (HIF) to oxidative stress: A new understanding of the toxic mechanism of mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*, 135. 110968.
- Yao Y. - Long M.: 2020. The biological detoxification of deoxynivalenol: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 145. 111649
- Zachariasova M. - Dzuman Z. - Veprikova Z. - Hajkova K. - Jiru M. - Vaclavikova M. – Zachariasova A. - Pospichalova M. - Florian M. - Hajslova J.: 2014. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Animal Feed Science and Technology*, 193. 124-140.
- Zain M. E.: 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15. 129-144.
- Zhao L. - Jin H. - Lan J. - Zhang R. - Ren H. - Zhang X. - Yu G.: 2015. Detoxification of zearalenone by three strains of *Lactobacillus plantarum* from fermented food in vitro. *Food Control*, 54. 158–164.
- Zhong Q. D. - Li G. H. - Wang D. B. - Shao Y. - Li J. G. - Xiong Z. H. - Wu Y. N.: 2014. Exposure assessment to ochratoxin A in Chinese wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62. 8908-8913.
- Zhou H. - Guog T. - Dai H. - Yu Y. - Zhang Y. - Ma L.: 2020. Deoxynivalenol: Toxicological profiles and perspective views for future research. *World Mycotoxin Journal*, 13. 179-188.
- Zielińska K. J. - Fabiszewska A. U. - Stefańska I.: 2015. Different aspects of *Lactobacillus* inoculants on the improvement of quality and safety of alfalfa silage. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 75. 298–306.

Zinedine A. - Ruiz M. J.: 2014. Zearalenone. [In S.C. Duarte, A.L. Simões Pena, C. de Matos Lino (szerk.) *Mycotoxins and their Implications in Food Safety*] e-book Future Science Ltd., London, UK.

Zinedine A. - Soriano J. M. - Molto J. C. - Manes J.: 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45. 1-18.

Zoghi A. - Khosravi-Darani K. - Sohrabvandi S.: 2014. Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14. 84-98.

Zou Z. Y. - He Z. F. - Li H. J. - Han P. F. - Meng X. - Zhang Y. - Zhou F. - Ouyang K. P. - Chen X. Y. - Tang J.: 2012. In vitro removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 21. 1677-1683.

11. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN

(DE Egyetemi és Nemzeti Könyvtár publikációs adatbázisába feltöltött, a Könyvtár által elkészített és hitelesített publikációs lista)



**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., Nampootheri, 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., Győri, 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" : Fialat 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.



12. NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2024...11.06.....

Adácsi Cintia

a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Adácsi Cintia doktorjelölt 20~~18~~...-20~~22~~ 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.

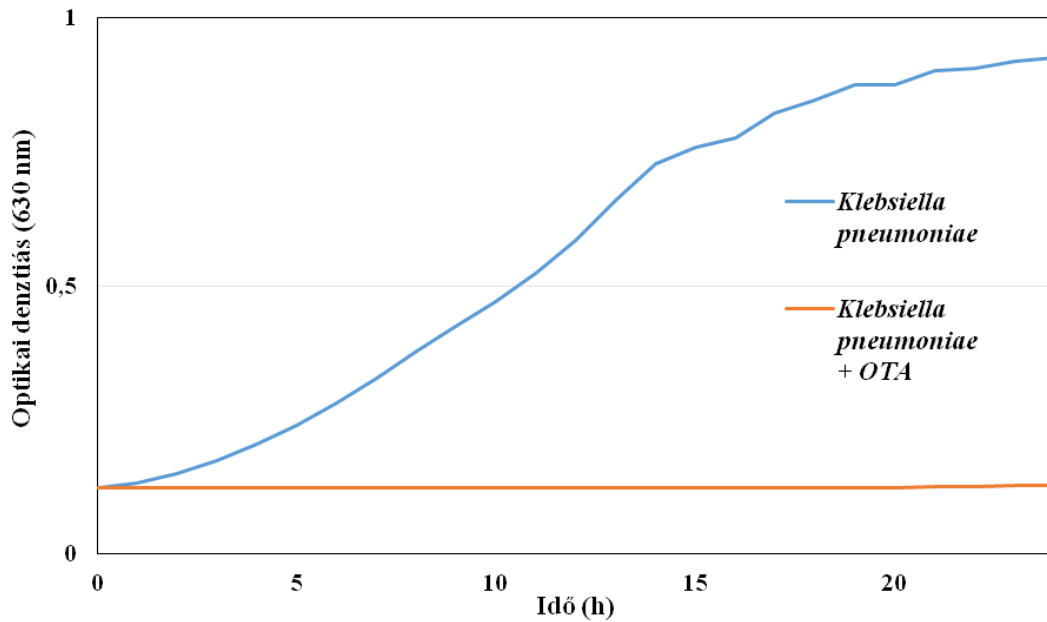
Debrecen, 2024...11.06.....

Pustalyi

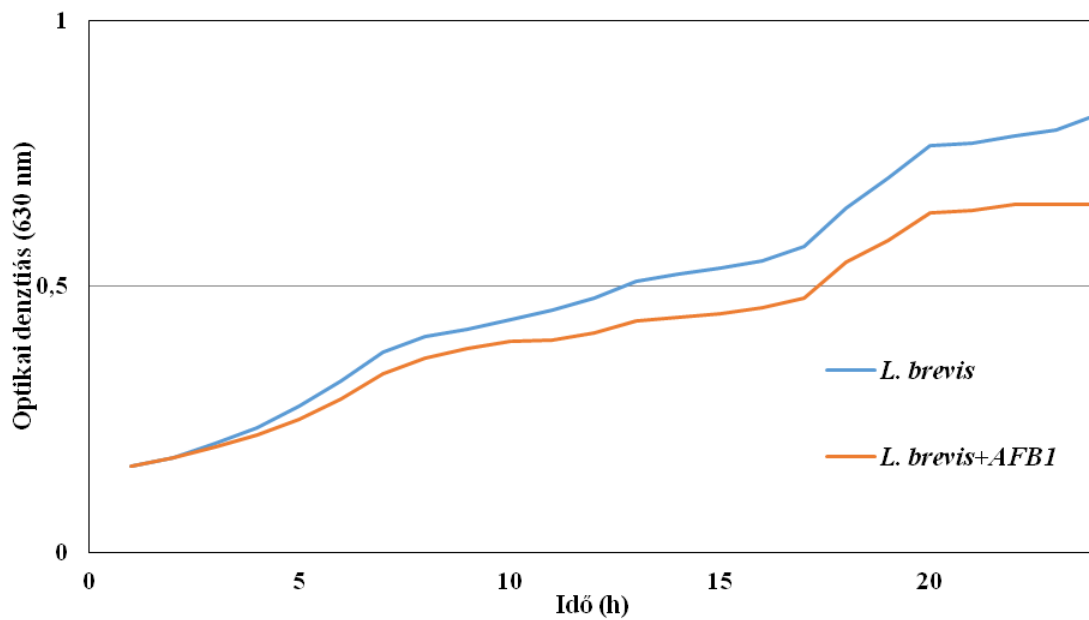
a témavezető(k) aláírás

13. MELLÉKLETEK

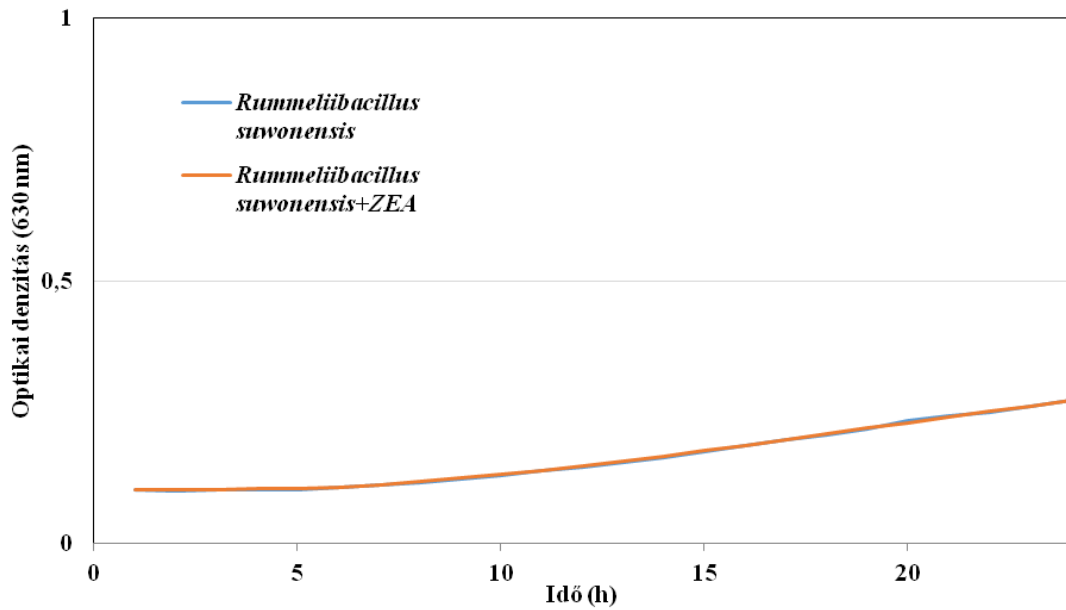
1. melléklet: A *Klebsiella pneumoniae* AMK8/2 baktérium OTA (1000 µg/l) mikotoxin melletti növekedése (n = 4, t próba 24. óra p=3,49662E-10)



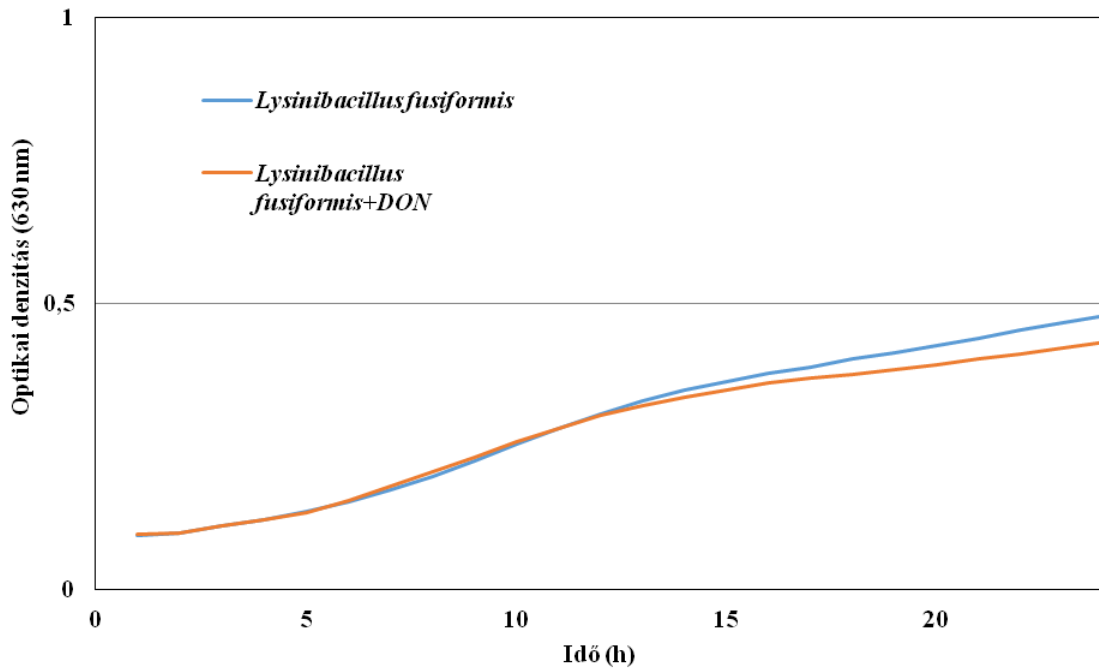
2. melléklet: A *Levilactobacillus brevis* AMKT3/3 baktérium AFB1 (24 µg/l) mikotoxin melletti növekedése (n = 4, t próba 24. óra p=0,031)



3. melléklet: A *Rummeliibacillus suwonensis* AMK9/2 baktérium ZEA (500 µg/l) mikotoxin melletti növekedése (n = 4, t próba 24. óra p=0,342)



4. melléklet: A *Lysinibacillus fusiformis* AMK10/2 baktérium DON (1000 µg/l) mikotoxin melletti növekedése (n = 4, t próba 24. óra p=0,183)



14. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani elsőként témavezetőmnek, Dr. Pusztahelyi Tündének, hogy munkámat mindvégig támogatta, értékes elméleti és gyakorlati tanácsaiért, hozzájárulva disszertációm sikeres elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem MÉK Agrárműszerközpont dolgozóinak a dolgozatomban nyújtott segítségért.

Köszönetemet fejezem ki, Zudorné dr. Dombrádi Zsuzsanna Ritának (Debreceni Egyetem, DE Klinikai Központ, Egészségügyi Szolgáltató Egységek, Diagnosztikai Egységek, Orvosi Mikrobiológia) a MALDI-TOF MS mérések elvégzéséért.

Köszönetemet fejezem ki a BIOMI Kft.-nek (Gödöllő, Magyarország) a PCR termékek szekvenálásáért.

Köszönetem fejezem ki az Alföldi Tej Kft.-nek és a DE MÉK Precíziós Növénytermesztési Kutatás-fejlesztési Szolgáltató Központjának a vizsgálati anyag biztosításáért.

Köszönetemet fejezem ki, a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményének (MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet), hogy a silózásnál felhasznált *Lactiplantibacillus plantarum* NCAIM B01074 törzset biztosította.

Köszönettel tartozom két pályázatnak:

- 2018-1.2.1-NKP-2018-00002 A magyar fogyasztók rövid és hosszú távú aflatoxinterhelésének meghatározása a tejtermékláncban és a kockázatkezelő intézkedések megalapozása.
- 2019-2.1.13-TÉT_IN-2020-00056 Biotechnológiai kutatások *Fusarium* mikotoxinoktól mentes gabonafélék és élelmiszerek előállítása céljából.

Végezetül köszönöm családomnak, szüleimnek, páromnak a teljes körű támogatást és a rengeteg türelmet, amiért végig bíztak bennem, akkor is, amikor én már nem tudtam.