

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 13

Issue 2

Gödöllő
2017

OCHRATOXIN A ÉS BIODEGRADÁCIÓS MELLÉKTERMÉKEINEK HATÁSA ZEBRADÁNIÓ (*DANIO RERIO*) EMBRIÓKRA

¹Garai Edina, ¹Kerekes Flóra, ¹Urbányi Béla, ²Cserhádi Mátyás, ²Márton Dalma,
¹Csenki Zsolt

¹Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék,

²Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

2100 Gödöllő, Páter Károly út 1.

Edina.Garai@phd.uni-szie.hu

Received – Érkezett: 05. 12. 2017.
Accepted – Elfogadva: 02.07. 2018.

Összefoglalás

Napjainkra gyorsuló ütemben növekednek azok a potenciális veszélyt hordozó területek nagysága, amelyek ideálisak a mikotoxinok termelődéséhez. Friss kutatások alapján már minden magyarországi régióban megtalálhatóak az *Aspergillus* fajok, így sürgetővé vált a mikotoxin szennyezettség problémájának megoldása. A mikotoxinok ártalmatlanítására számos módszer ismert, melyek közül kísérleteinkben egy biodegradációs eljárás hatékonyságát vizsgáltuk. A mikotoxinok mikrobiális bontása során, bizonyos esetekben a kiindulási anyagnál is toxikusabb melléktermékek képződhetnek. Ezeknek a metabolitoknak a biomonitoringjára az EFSA ajánlást adott ki, melyben megfogalmazta, hogy a biodegradáció közben keletkező metabolitok biológiai hatását is vizsgálni kell. Korábbi munkáink során kidolgozott mikroinjektálási módszer alkalmazásával egy bizonyítottan Ochratoxin A (OTA) bontó mikrobatorzs minősítését kívántuk elvégezni. Az injektálás során előre meghatározott mennyiségű vizsgálati anyagot juttattunk az embriók szervezetébe, majd 120 órában letális végpontra vizsgáltuk őket. A mikrobatorzs minősítésekor a törzstől származó normál és bontott minták teszteredményeit hasonlítottuk össze, az 5 ppm OTA tartalmú oldat eredményeivel. A baktériumtörzs 96%-os bontási hatékonyságot mutatott kísérleteinkben. Az eredményeink alapján elmondható, hogy az OTA bontó ÓR 16 jelzésű baktériumtörzs (*Cupriavidus Basiliensis*) termel toxikus anyagokat, azonban ennek toxicitása alacsonyabb az OTA tartalmú oldathoz képest. A baktérium OTA bontási melléktermékei szintén alacsonyabb toxicitást mutatnak a kiindulási OTA oldathoz képest. Következtetésként elmondható, hogy az ÓR 16 jelzésű baktériumtörzs alkalmazható lehet zárt térben OTA-szennyezett takarmány detoxifikációjára.

Kulcsszavak: ochratoxin A, zebradánió, mikroinjektálás, biodegradáció

The effect of Ochratoxin A and its biodegradation secondary products in zebrafish embryos (*Danio Rerio*)

Abstract

Nowadays, contaminated areas size by mycotoxins have been growing. Based on recent studies, all the *Aspergillus* species have been found in all Hungarian regions. Many methods are known for the detoxification of mycotoxins. One of them is biodegradation which was also used in our experiments. During the microbial biodegradation of mycotoxins, in some cases secondary products might be more toxic than the original mycotoxins are. According to the EFSA statement, metabolites from mycotoxins' degradation processes need to be also examined. During our former works we applied the method of microinjection for toxicity analyses. This method was used to certify the microbial strain OTA-degrading ability. During microinjection, predetermined amounts of test materials were injected into the embryos. At 120 hpf, embryos' lethal endpoint was examined. During classification of bacterial strain we tested normal, toxin-free control containing only the metabolic products of the microorganisms, and degraded samples from the strain. The bacterial strain showed 96% degradation efficiency in our experiments. The outcomes were compared with the results of 5 ppm OTA. Based on our results, ÓR 16 bacterial strain (*Cupriavidus Basilensis*) produces toxic materials but they are less poisonous than OTA is. The degradation secondary products are also showed a lower toxicity than OTA did. The conclusion is that ÓR 16 bacterial strain suitable to use for the detoxification of OTA-contaminated feed in confined places.

Keywords: ochratoxin A, zebrafish, microinjection, biodegradation

Irodalmi áttekintés

Mikotoxinok

A mikroszkópikus penészgombák metabolizmusa közben termelt másodlagos anyagcsere-termékek a mikotoxinok. Súlyos egészségkárosító hatásai mellett, csökkentik a szennyezett termékek tápanyagtartalmát és gazdasági károkat okoznak. A mikotoxinok által okozott mérgezést mikotokózisnak nevezzük (*Balogh és mtsai., 2013, CAST REPORT 2003*).

Ochratoxin A

Az *Aspergillus* és a *Penicillium* penészgombafajok által termelt ochratoxinok közül a legtoxikusabb az ochratoxin A (továbbiakban: OTA). Számos egészségkárosító hatását írták már le, többek között limfocitopéniát, elhalást a máj periportális sejtjeiben, veseelégtelenséget, vesekárosodást okoz, teratogén- és karcinogén is (IARC - 2B besorolás) (*IARC 1987*). Az állati és humán ochratoxikózisok megelőzése érdekében számos védekezési módszer lehetséges (*Balogh és mtsai., 2013, CAST REPORT 2003*).

Mikotoxinok elleni védekezés

A mikotoxinokat termelő penészgombák élelmiszer- és takarmánybiztonsági szempontból is fontos kultúrnövényeket fertőzhetnek meg. A védekezés egyik legjobb módja a megelőzés, például az integrált növényvédelem segítségével; azonban a már szennyezett termények mentesítésére

is számos lehetőség áll rendelkezésre, melyek kémiai, fizikai vagy biológiai módszerek lehetnek. A fizikai és kémiai mentesítések során fellépő tápanyagtartalom csökkenés, a biológiai mentesítés során nem jelentkezik, így a lényegesen olcsóbb használat mellett, ez a tényező is indokolja a biológiai módszerek fejlesztését és használatát a toxinmentesítésre (Ábrahám és mtsai., 2011, Balogh és mtsai., 2013).

Biológiai detoxifikációra számos mikroorganizmus és azok izolált enzimejei is képesek. A biodegradációs folyamat során keletkező melléktermékek esetében azonban előfordulhat, hogy a kiindulási anyagnál toxikusabb anyagok képződnek. Példa erre az aflatoxin B1, amelynél az epoxidáció során az AFB1-2,3-epoxid keletkezik, amely egy bizonyítottan tumorkeltő metabolit (IARC - 1B) (IARC 1987). Az OTA esetében már leírtak *Lactobacillus*, *Streptococcus*, és *Saccharomyces cerevisiae* törzseket, illetve néhány egyéb gombafajt amelyek különböző hatékonysággal bontják a toxint (Juodeikiene és mtsai., 2012). Az OTA bontó mikrobák közül az egyik legígéretesebb a 2013-ben leírt *Cupriavidus basilensis* ŐR 16 jelzésű baktériumtörzs, amely 98%-os degradáló hatékonyságot mutatott OTA-bontását tekintve (Cserhádi, 2013). Az EFSA 2010-es tanulmányában felhívja a figyelmet arra, hogy a mikotoxinok mellett a veszélyes metabolitok biomonitoringja is kiemelkedő jelentőséggel bír. Ez alapján nem csak a takarmányok mikotoxin-szennyezettségének csökkentésére irányuló eljárások ellenőrzése a cél, hanem az eközben keletkező metabolitok biológiai hatásának vizsgálata is. Ennek ellenőrzésére ökotoxikológiai tesztek és etetési kísérleteket kell alkalmazni (EFSA SCIENTIFIC OPINION 2010).

Zebradánió

Az ökotoxikológiai vizsgálatok egyik meghatározó modellállata a zebradánió (*Danio rerio*). A faj előnye a toxikológiai vizsgálatoknál, hogy az embriók fejlődése ex-utero zajlik, fejlődésüket jól megfigyelhető és nyomon követhető az átlátszó ikrahéjon keresztül. További előnye, hogy a legtöbb emlősökön végezhető manipulációs eljárást is adaptálták erre a fajra (Csenki, 2011).

Anyag és módszer

Ochratoxin A biodegradáció

A bontási folyamat megkezdése előtt az ŐR 16 jelzésű baktériumtörzs felszaporítását végeztük el. A felszaporításhoz a -80°C -on tárolt törzset LB agarra szélesztettük, majd három napig 28°C -on inkubáltuk. A következő lépésben egyetlen tiszta teleppel alakítottunk ki a kiindulási inokulumot 100%-os LB tápoldatokban, amelyet 3 napig 28°C -on, 170 rpm-es fordulatszámra ráztunk. Az inokulum sejtsűrűségét $\text{OD}_{600}=0,6$ -ra állítottuk be 20%-os LB tápoldattal, és 5 ml mennyiséggel oltottuk be a bontási rendszereket. A bontási kísérleteket 45 ml 20%-os LB tápoldatot, 5 ml inokulumot és az 5 ppm OTA-t tartalmaztak. A kísérlet kontrolljaként 5 ppm-es OTA tartalmú mikrobamentes 20%-os LB tápoldatot alkalmaztunk. Az ŐR 16 jelzésű baktériumtörzs normál anyagcseretermékének mintájához OTA-mentes azonos sejtsűrűségű 20%-os LB tápoldatból baktérium tenyészetet állítottunk össze. A kísérleteket 3 párhuzamos ismétléssel végeztük. A bontási rendszereket 5 napig inkubáltuk 28°C -on, 175 rpm rázatás mellett. A minták centrifugálását (14000 rpm, 4°C , 20 perc) követően a felülúszót dekantáltuk, 20 mikronos membránszűrőn szűrtük és -

20°C-on tároltuk a további vizsgálatokig. A bontott minták OTA tartalmát AccuScan Gold ELISA rendszeren alapuló mérőeszkővel mértük vissza, az eszközhöz mellékelt protokoll alapján.

Mikroinjektálás

Az előre elkészített boroszilikát kapilláris (NARISHIGE JAPAN Glass Capillaries, 1x90 mm) zárt végét kissé letörtük, majd a vizsgálati anyaggal megtöltöttük a kapillárist. Az injektáláshoz mikroinjektáló manipulátort használtunk (Tritech Research Inc., microINJECTOR; MINJ-2). A cseppméret meghatározásához tárgylemezre cseppentett immerziós olajba injektáltunk néhány alkalommal, majd fényképezés után egy kalibrált szoftver használatával meghatároztuk a cseppek átmérőjét, hogy a gömb térfogatképletének alkalmazásával meghatározzuk a bejuttatandó anyagmennyiségét. A kísérlet során minden tesztanyag esetében 75 µm (0,22 nl), 100 µm (0,52 nl), 150 µm (1,77 nl) és 200 µm-es (4,17 nl) cseppátmérőket alkalmaztunk. Az ikrák megtermékenyülést követően az embriókat azonnal (egysejtes állapot) egy 10 cm átmérőjű Petri-csészébe helyezett standard méretű tárgylemez mellé sorakoztattuk az injektáláshoz. Az injektálást sztereomikroszkóp alatt 1,5x-es nagyítással, szabadkézzel, a korionon keresztül végeztük el. Minden cseppméret esetén legalább 3 ismétlést alkalmaztunk, csoportonként 20-20 db embrióval. Az injektálást követően az ikrákat 26°C-on inkubáltuk, 120 órán keresztül. Az elpusztult egyedek számát 24 óránként feljegyeztük.

Minősítés folyamata

Az ŐR 16 jelzésű baktériumtörzs minősítéséhez először a mikroinjektálási módszert teszteltük egy semleges oldattal (Zebrafish Ringer's oldat - ZFR - 116 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,2), majd a baktériumos kísérlethez használt töménységű tápoldatokat (20% és 100% LB tápoldat) vizsgálatuk a legnagyobb, 200 µm-es cseppátmérő segítségével. A következő lépésben az OTA 5 ppm-es oldatának kalibráló görbét vettük fel a fentebb megadott cseppátmérők alapján. Ezt követően az ŐR 16 jelzésű baktériumtörzs normál és OTA-bontási anyagcseretermékeit vizsgáltuk a korábban leírt 4 cseppátmérő segítségével. Az 5 ppm-es OTA oldat eredményeit összehasonlítottuk a baktérium normál és bontási melléktermékeinek eredményeivel, illetve a normál és bontott anyagcseretermékek eredményeivel is.

Az eredmények értékelését a GraphPad Prism 6.01-es szoftverrel végeztük, Kruskal-Wallis ANOVA-t használtunk Dunn post-hoc teszttel a kontroll csoportok, az ŐR16 jelzésű baktériumtörzs normál és bontási anyagcseretermékeinek eredményeinek összehasonlításához. Az 5 ppm-es OTA oldat mortalitási eredményeinek értékeléséhez ANOVA-t, Tukey post-hoc teszttel alkalmaztunk.

Eredmények és értékelés

Kísérleteink során két kontrollt alkalmaztunk. A mikroinjektálási módszer kontrolljaként egy semleges oldatot használtunk (ZFR), a baktériumos kísérlet kontrolljaként pedig a mikroba felszaporításához alkalmazott LB táptalajokat teszteltük a legnagyobb cseppátmérő segítségével (200 µm = 4,17 nl). Az oldatok mortalitási eredményei 10% alatt maradtak (*I/A ábra*), amely az

OECD előírás kontroll csoportra vonatkozó pusztulási értékének is megfelel. Az eredmények statisztikai elemzése alapján nem találtunk szignifikáns különbséget. Ennek alapján elmondható, hogy sem a mikroinjektálás, sem a bontási módszer nincs hatással az embriók túlélésére az általunk használt térfogatokon.

Az OTA 5 ppm-es mortalitási eredményei (*I/B ábra*) azt mutatják, hogy a kezeletlen kontroll csoport pusztulása 10% alatt maradt és a dózisok emelésével a mortalitási értékek is emelkedtek, a legnagyobb, 4,17 nl-es dózis esetén 80% körüli pusztulást tapasztaltunk. Szignifikáns különbséget kaptunk a kontroll és a 0,52 nl ($p \leq 0,01$), az 1,77 nl ($p \leq 0,0001$), a 4,17 nl ($p \leq 0,0001$) csoportok között, emellett a 0,22 nl és a 0,52 nl ($p < 0,05$), az 1,77 nl ($p \leq 0,0001$), a 4,17 nl ($p \leq 0,0001$) kezelések között, valamint a 0,52 nl és az 1,77 nl ($p \leq 0,0001$), a 4,17 nl ($p \leq 0,0001$) dózisok között.

Az ŐR 16 jelzésű baktériumtörzs normál anyagcseretermékeinek mortalitási eredményei (*I/C ábra*) esetén a kontroll csoport mortalitása szintén 10% alatt maradt és a dózis hatására itt is növekvő pusztulási értékeket kaptunk, a 4,17 nl-es dózis esetén 60% körüli mortalitást tapasztaltunk. Szignifikáns különbséget kaptunk a kontroll és a 4,17 nl ($p \leq 0,01$), illetve a 0,22 nl és a 4,17 nl ($p \leq 0,001$) között. Az eredmények alapján elmondható, hogy a mikroba életfolyamatai során halakra káros melléktermékeket termel, azonban ennek toxicitása jóval alacsonyabb, mint a kiindulási 5ppm-es OTA oldaté.

Az ŐR 16 jelzésű baktériumtörzs OTA bontási melléktermékeinek mortalitási eredményeit az *I/D ábra* mutatja. A kezeletlen kontroll csoport pusztulási értékei ebben az esetben is 10% alatt maradtak, a mortalitási értékek dózis-függést mutatnak. Szignifikáns különbséget tapasztaltunk a kontroll és az 1,77 nl ($p < 0,05$), a 4,17 nl ($p < 0,05$) között, valamint a 0,22 nl és a 4,17 nl ($p < 0,05$) között. Az eredmények alapján elmondható, hogy a bontási melléktermékek toxicitása szintén alacsonyabb, mint az 5 ppm-es OTA oldaté. Emellett a normál anyagcseretermékekhez viszonyítva is alacsonyabb toxicitást mutatnak. A legnagyobb dózis esetén is csak 38,5%-os mortalitást tapasztaltunk, azonban statisztikailag nem igazolható a különbség.

1. ábra: Ochratoxin A és annak *Cupriavidus basilensis* ÖR16 baktériumtörzsszel végzett biodegradációjából származó metabolitjainak zebradánió embrió mikroinjektással végzett toxicitás vizsgálatának eredményei.

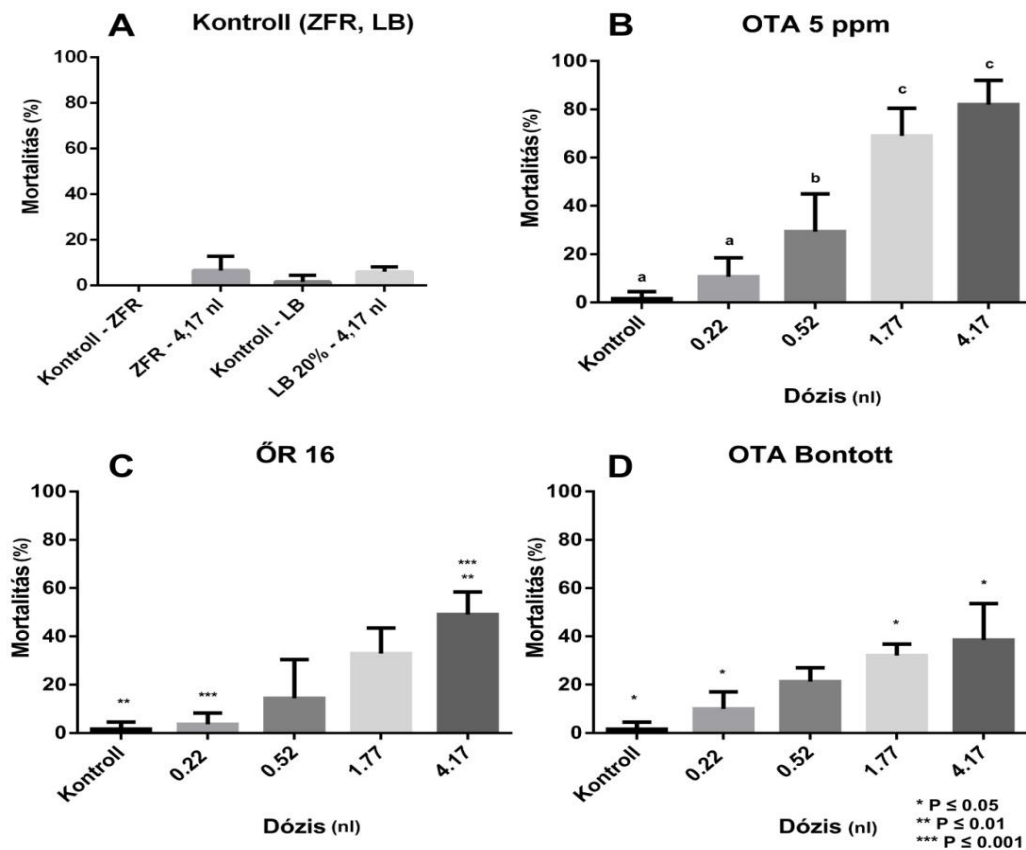


Figure 1: The effect of Ochratoxin A and its biodegradation secondary products by *Cupriavidus basilensis* ÖR16 bacterium strain in zebrafish embryos with microinjection methods

Az ábrák a kontrollok (kezeletlen kontroll, Zebrafish Ringer's -ZFR, LB tápoldat–panel A) és a kezelési csoportok (OTA 5 ppm–panel B, ÖR 16 normál anyagcsere termék–panel C, ÖR 16 OTA bontási melléktermék–panel D) százalékos mortalitási eredményeit mutatják.

The figures shows control groups (non-injected control, Zebrafish Ringer' - ZFR, LB medium - panel A) and treatment groups (OTA 5 ppm–panel B, ÖR 16 metabolic products – panel C, ÖR 16 biodegradation product –panel D) mortality results.

Következtetések és javaslatok

Az eredményeink alapján elmondható, hogy az ŐR 16 jelzésű baktériumtörzs termel normál életfolyamatai során a halakra káros anyagcseretermékeket, azonban ennek toxicitása jóval alacsonyabb, mint az 5ppm-es OTA oldaté. Továbbá a baktériumtörzs OTA-bontás során termelt melléktermékei is kevésbé toxikusak a zebradánió embriókra, mint az OTA 5 ppm-es oldata. Következtetésként elmondható, hogy az ŐR 16 jelzésű baktériumtörzs alkalmazható lehet zárt térben OTA-szennyezett takarmány detoxifikációjára.

Javasoljuk a kísérletek kiegészítését enzim- és molekuláris vizsgálatokkal, annak érdekében, hogy az embriókban kialakuló változásokat bővebben megismerhessük.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a VKSZ_12-1-2013-0078 és az NVKP_16-1-2016-0009 pályázatok, valamint Cserhádi Máttyás munkáját a Bolyai János kutatási ösztöndíj támogatták.

Irodalomjegyzék

- Ábrahám R., Érsek T., Kuroli G., Németh L., Reisinger P. (2011): Növényvédelem. http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_08_Novenyvedelem/ch02.html (2015 szeptember)
- Balogh K., Balláné Erdélyi M., Mézes M. (2013): Takarmánytoxikológia. – Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 130 p.
- CAST REPORT (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. – In: RICHARD, J.L., PAYNE, G.A. (Eds.). Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report No. 139, Ames, Iowa, USA. pp. 199.
- Csenki ZS.I. (2011): Oocyta transzplantáció halakon (Petesejt átültetés zebradánió (Danio rerio) halfajon). Doktori (Ph. D.) értekezés, SZIE, Gödöllő, 108 p.
- Cserhádi M. (2013): Mikotoxinok biodegradációjára képes mikroorganizmusok szelekciója és alkalmazása. Doktori (Ph. D.) értekezés, SZIE, Gödöllő, 143 p.
- EFSA SCIENTIFIC OPINION (2010): Statement on the establishment of guidelines for the assessment of additives from the functional group ‘substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). EFSA Journal, 8:1693. p
- IARC (1987): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IAC Monographs Volumes 1 to 42, Lyon, 83-87 p.
- Juodeikiene G., Basinskiene L., Bartkiene E., Matusевичius P. (2012): Mycotoxin Decontamination Aspects in Food, Feed and Renewables Using Fermentation Processes, Chapter 8, pp.171-204