



*A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo: Shutterstock*

Tima Helga¹, Kecskésné Nagy Eleonóra², Rácz Anita³, Kiskó Gabriella¹
Mohácsiné Farkas Csilla¹

Érkezett: 2016. november – Elfogadva: 2017. május

Takarmányozásra használt növényi alapanyagok DON, F-2, T-2 mikotoxin-vizsgálata ELISA-módszerrel

Kulcsszavak: takarmány, ELISA, deoxinivalenol, zearalenon, T-2 mikotoxin

1. Összefoglalás

Tanulmányunkban különböző állatfajok etetésére használt növényi alapanyagokat vizsgáltunk kompetitív ELISA-módszerrel. A vizsgálatok során takarmányozáshoz leggyakrabban használt alapanyagokkal (szója- és lucerna-pellet, valamint búza, árpa és kukorica) dolgoztunk. A *Fusarium* mikotoxinok közül a deoxinivalenol (DON), zearalenon (F-2) és a T-2 toxinokat mértünk. A mérési eredményeinket RStudio matematikai-statisztikai programmal értékeltük. Kísérletünkben megállapítottuk, hogy mindhárom vizsgált mikotoxin detektálható - volt mindegyik mintában, de nem mindegyikben volt mennyiségileg elfogadható pontossággal meghatározható érték. A detektált DON toxin eredmények átlagértéke egy nagyságrenddel nagyobbak bizonyult a többi toxinnál. Vizsgálatunk során bizonyítást nyert, hogy a deoxinivalenol, zearalenon és T-2 mikotoxinok jelenléte komoly takarmány- és élelmiszer-biztonsági veszélyt jelent, hiszen ha csak kis mennyiségekben is, de jelen vannak már a takarmány-alapanyagokban. Napjainkban egyre több esetben fordul elő ezen mikotoxinok együttes jelenléte, ami nagymértékben sokszorozza az előbb említett kockázatot.

2. Bevezetés

A természetes eredetű szennyeződésekhez tartoznak a mikroszkopikus gombák által termelt mikotoxinok, amelyek a penészgombák másodlagos anyagcsere-termékei. A mikotoxinok humán- és állategészségügyi jelentősége kiemelkedő [1]. A jelenleg is zajló klímaváltozás miatt a toxinok előfordulásának kockázata az élelmiszerláncban nagy jelentőséggel bír. Az IPCC (az ENSZ Éghajlat-változási Kormányközi Testülete) és a Meteorológiai Világszervezet (WMO) állásfoglalásai, a VAHAVA (VÁltozás-HAtás-VÁlasztás) elnevezésű kutatási program, valamint az Országgyűlés által elfogadott Nemzeti Éghajlat-változási Stratégia megállapításai alapján: „a Kárpát-medencében fokozottan érvényesülő klímaváltozás várható” [2]. Ez a folyamat hátrányosan érintheti a hazai mezőgazdaságot a termésmennyiségek várható kiesése miatt, kedvezőtlen hatása lehet az élel-

mezés- és élelmiszer-biztonságra a kártékony mikroorganizmusok elszaporodásának következtében, valamint a humán- és állategészségügyre is közvetett hatással lehet. A globális klímaváltozás elősegítheti a mikotoxinokat termelő penészgombák szaporodását [2]. A mikotoxinnal szennyezett takarmánnyal etetett állatok komoly élelmiszer-biztonsági veszélyt jelentenek, így a belőlük készített termékek elfogyasztása is kockázatos lehet, valamint a toxint tartalmazó takarmányokat fogyasztó állatok fejlődése visszaesik, súlygyarapodása lassul, és szaporodásbiológiai, állategészségügyi kondícióik is romlanak. A kedvezőtlen állategészségügyi jellemzők negatív hatást gyakorolnak az állattenyésztésre, így a gazdasági hatékonyság és a termelési mutatók is csökkenhetnek [3].

A mikotoxinok kutatása az utóbbi évtizedben egyre inkább az érdeklődés középpontjába kerül. Több kísérletet végeznek annak érdekében, hogy csök-

¹ Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Kar, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

² Pallasz Athéné Egyetem, Kertészeti és Vidékfejlesztési Kar

³ Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia Tanszék

kenteni lehessen a toxinok bekerülésének esélyét az élelmiszerláncba. Arra vonatkozóan is vannak vizsgálatok, hogy az elvárt vagy megengedett határértéken belül előforduló szennyeződések (pl. alapanyagok esetén) még alacsonyabb szintre lehessen mérsékelni. A toxinok élelmiszerláncba bekerülési esélyét a gabonafélék termesztése során alkalmazott megelőző agrotechnikai műveletekkel lehet minimalizálni [4]. Ezek közül kiemelhető a legelterjedtebben alkalmazott kémiai növényvédelem, amelynek hatékonyságát és hatásosságát Mesterházy és munkatársai [5] vizsgálták. Ugyancsak említésre méltó az egyre szélesebb lehetőségeket biztosító biológiai növényvédelem, amelynek alkalmazása során a kórokozók a természetes ellenségekkel szoríthatók vissza [6]. A megelőző védekezés fontos tényező a fajtaválasztás, és e tekintetben igen hangsúlyos szerepet kap a fajtanemesítés, azaz a rezisztens vagy toleráns gabonafajták előállítása [7], [8].

A megelőző agrotechnikai műveletek hatékonysága és hatásossága nagymértékben függ az évjárártól és a technológiai fegyelemtől, ahogy azt az elmúlt évek tapasztalatai is mutatják. A *Fusarium* gomba szaporodásához kedvező évjáratokban fel kell készülni arra, hogy toxinnal különböző mértékben szennyezett búzátételek betakarítására kell számítani. Az ilyen évjáratokban annak kockázata is növekszik, hogy a takarmányok nagyobb mértékben lesznek toxinokkal szennyezettek, mint az élelmiszeripari alapanyagok. Ennek alapvető oka, hogy az élelmiszer-előállításban nagyon szigorú jogszabályi előírásokat betartva kell kiválasztani az alapanyagokat. Azokat a gabonátételeket, amelyek pl. a toxinszennyezettségük miatt nem felelnek meg e kritériumoknak, takarmánnyá minősíthetik. Ennek ismeretében kiemelt szerepük van azoknak a kutatásoknak, amelyeknek célja a betakarítást követő időszakban a toxinkoncentráció csökkentése. Az állati takarmányozásban az egyik ilyen lehetőség a takarmányokhoz olyan anyagok hozzáadása, amelyek képesek megkötni az állati szervezetet károsító toxinokat. Bata [3] beszámol arról, hogy toxinetési kísérleteket végeznek különböző korcsoportú serté-

seken, szarvasmarhákon, tojtyúkokon, pulykákon is, és követik egészségügyi állapotuk változásait. A kísérletek során bizonyítást nyert, hogy a fuzariatoxikózis kevert tünetekben mutatkozik meg, továbbá a fuzariatoxinok iránt legérzékenyebb állatfaj a sertés és a baromfi. Ezen fajknál szaporodásbiológiai zavarokat valamint az immunrendszer legyengülése következtében másodlagos megbetegedéseket okoztak. A szarvasmarha kevésbé érzékeny ezekkel a toxinokkal szemben, mint a sertés.

A betakarítást követő időszakban a gabona korszerű berendezésekkel történő tisztításával is van lehetőség a toxintartalom csökkentésére. A színválogatás és a felülettisztítás hatékonyságát elsődlegesen élelmiszeripari alapanyagokon vizsgálják [9], [10], de van lehetőség ezek alkalmazására a takarmányozáshoz felhasznált anyagok előkészítésénél is, amennyiben az indokolt. Kecskésné és munkatársai [11] felhívják a figyelmet arra, hogy a malomipari felhasználásra szánt búza őrlés előtti színválogatása során a malmi búza mellett képződött frakció, azaz az úgynevezett melléktermék DON-toxin tartalma minden esetben megnövekszik a kiinduló, tisztítatlan búzátétel toxintartalmához képest. A növekedés mértéke viszont nem mutat korrelációt sem a kiinduló alapanyag toxintartalmával, sem a tisztítás hatékonyságával, ugyanis egyéb, előre nehezen meghatározható tényezők is befolyásolják azt. Ezt azért fontos tudni, mert az említett mellékterméket takarmánnyként, illetve takarmánykeverékek alkotójaként hasznosítják. A kísérleti eredmények szerint mindenképp javasolt a felhasználás előtt a melléktermék toxintartalmának a mérése, hogy a takarmányok toxinszennyezését elkerülhessük.

A tápláléklánc csúcsán álló ember joggal várhatja el, hogy a termék, amely az asztalára kerül, kielégítse az egészségmegőrzés és betegségmegelőzés szempontjából megfogalmazott igényeit. Kiemelt feladat az élelmiszer-biztonság fenntartása, vagyis a nem biztonságos termékek kiszűrése, kivonása a gyártói, kereskedelmi forgalomból.



A kép illusztráció / Picture is for illustration only.
Foto/Photo: Shutterstock

A DON, F-2 és T-2 mikotoxinok okozta takarmány és takarmányipari alapanyagok – elsősorban gabonafélék – szennyezettsége világszerte komoly élelmiszer-biztonsági kihívást jelentett és jelent ma is [12]. Németországban egy korábbi, búzamintákon végezett ($n=84$) kutatás szerint a DON mikotoxinok értékei 4,0 - 20500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ közötti tartományban voltak mérhetőek, az F-2 toxin 1,0 - 8040 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a T-2 3,0 - 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ között mennyiségben volt kimutatható [13]. Lengyelországban 1990-ben, szintén búzamintákat vizsgálva a DON toxin szennyezettség 2000 - 40000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ között alakult, míg a zearalenon toxin ennél a tartománynál kevesebb volt, mennyiségét 10 - 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ közötti értékeknek találták [14]. Kukorica esetében - ugyancsak Lengyelországban - kizárólag deoxinivalenol toxint vizsgáltak, és a minták szennyezettsége nagyobb mértékűnek bizonyult a búzáénál. Itt az értékek 4,0 - 320 mg/kg között alakultak [12]. Finnországban állati takarmányok és gabonák (kukorica, búza, árpa) DON szennyezettsége 7,0 - 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ volt, a minták F-2 toxin értékei 22,0 - 95,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ között alakultak [15], amelyek lényegesen alacsonyabbak az előzőeknél. Az adatok azt mutatják, hogy a toxinkoncentráció egy adott területen és időszakban nagy eltéréseket mutathat. Ennek megfelelően az élelmiszer-biztonsági feltételeket csak akkor lehet megbízhatóan teljesíteni, ha kidolgozzuk a takarmány-alapanyagok toxinszintjének ellenőrzési rendszerét és annak keretén belül folyamatosan mérjük a toxinszinteket.

A takarmányok penészgombákkal való szennyezettsége nem jelenti minden esetben a mikotoxinok jelenlétét is [16], [17]. A pontos mikotoxin-szennyezettség megítéléséhez kellően érzékeny és specifikus analitikai módszerekre van szükség. Általánosságban elmondható, hogy bármely mikotoxin kimutatása igen bonyolult, idő- és költségigényes folyamat, amelynek pontossága nagymértékben függ a mintavétel és minta-előkészítés helyességétől, illetve hatékonyságától [16]. A meghatározási módszerek kezdetben vékonyréteg kromatográfiára épültek, majd gáz- és folyadék kromatográfián alapultak [18], [19]. Ezeket egészítették ki a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) módszerek [19]. Ezek mellett a nagyhatékonyságú analitikai módszerek mellett rutin jellegű, immunanalitikai eljárásokat is kifejlesztettek egyes mikotoxinok mennyiségi és minőségi meghatározására [20], [21].

Az utóbbi években az ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), és a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszer fluoreszcenciás és tömegspektrometriás válfajainak előretörése figyelhető meg [22]. A jelenleg alkalmazott vizsgálati módszereket három nagy csoportba sorolhatjuk: gyorsmódszerek, elválasztás technikák, immunológiai eljárások.

A mikotoxinok kimutatásának azonban vannak újabb felismert korlátai is, ezek elsősorban a maszkolt és kötött toxinokra értendőek. A maszkolt mikotoxinok meghatározásának nehézsége megváltozott fizi-

kokémiai sajátágaikból adódik, amelynek következménye lehet az eltérő extrahálhatóságuk. Emiatt a szokásos vizsgálati módszerek alkalmazásakor ezek kvantifikálása bizonytalan, a kötött toxinoké pedig nem lehetséges [23].

3. Anyag és módszer

3.1. Anyagok

Vizsgálatainkhoz a takarmány-alapanyagokat két csoportba rendeztük. Az első vizsgálati csoportban a zöld növényi részekből előállított szója ($n=10$) és lucerna pelletből ($n=10$) vizsgáltunk összesen 20 mintát. Ugyancsak 20 mintával dolgoztunk a második vizsgálati csoportban is. Itt a gabonafélék magvainak, konkrétan búzának ($n=10$), árpának ($n=5$) és kukoricának ($n=5$) a toxintartalmát mértük meg. Így az összes mintaszámunk $n=40$ volt. A takarmány-alapanyagok gyors, tájékoztató mikotoxin-felmérése kompetitív ELISA-módszerrel, Ridascreeen Fast kitekkel (R-Biopharm) történt. Az általunk használt gyors tesztek „lelkét” a standard oldatok jelentették, amelyeket a kitek a toxinméréshez igazodóan tartalmaztak. A DON kit: RIDASCREEN® FAST DON (Art. No.: R5902, 48 wells), standard oldatok: „mikotoxint nem tartalmazó vak oldat” mg/kg , 0,222 mg/kg , 0,666 mg/kg , 2 mg/kg , 6 mg/kg . A zearalenon kit: RIDASCREEN® FAST ZEARALENON (Art. No.: R5502, 48 wells) standard oldatok: „mikotoxint nem tartalmazó vak oldat” $\mu\text{g}/\text{kg}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A T-2 kit: RIDASCREEN® FAST T-2 (Art. No.: R5302, 48 wells) standard oldatok: „mikotoxint nem tartalmazó vak oldat” $\mu\text{g}/\text{kg}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mérésünkhöz Metertech-500 spektrofotométert (ELISA Reader) használtunk (hullámhossz 450 nm). A módszerek validálásához szükséges standard oldatok gyártója: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Németország). Az eredmények értékelése speciális szoftver segítségével történt: RIDA® SOFT WIN (Art. No.: Z9999). A statisztikai analízist RStudio (Version 0.98.953) program segítségével végeztük.

3.2. Minta-előkészítés

Mintáink légszáraz állapotúak voltak, ezért nem volt szükség további szárításra. A vizsgálati mintarészeket 1,0 mm szemcse méretű darálón (Tecator, Sweden) homogenizáltuk. A mintaelőkészítés DON, F-2, T-2 mikotoxinokra a gyártó által mellékelte útmutatás szerint történt (R-Biopharm). DON mikotoxin esetében zárható üvegtégelybe bemértünk 5 gramm mintát (őrölt, elegyített), majd 100 ml desztillált vízzel 30 percig rázógépen (Tecator) erősen rázattuk az oldatot. Az elegyet üvegtölcsérbe helyezett Whatman 1-es szűrőn leszűrtük 100 ml-es Erlenmeyer lombikba. A leszűrt elegyből 50 μl -t használtunk a teszthez: RIDASCREEN® FAST DON.

F-2 és T-2 mikotoxinok esetében azonos a minta-előkészítési protokoll, vagyis ugyanabból a munkaoldatból használtunk a tesztekhez. Bemértünk 5 gramm

mintát, amelyet 100 ml-es lombikba töltöttünk, és 25 ml 70%-os MeOH adtunk hozzá, majd 30 percig rázógépen erősen kevertettük az oldatot. Az elegyet üvegtölcsérben Whatman 1-es szűrőn leszűrtük 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba. A szűrletből 1 ml-t kivettünk, melyhez 1 ml desztillált vizet adtunk, ebből a hígított mintából 50 µl-t használtunk a tesztekhez: RIDASCREEN® FAST ZEARELENON, RIDASCREEN® FAST T-2.

3.3. Módszervalidálás

A kitek mikotoxinok kvantitatív analízisére való megfelelésségét több releváns szervezet tanúsítványa igazolta: AOAC, Association of Official Chemists (AOAC International/Research Institute – PTM/Performance Tested Methods), FGIS (Federal Grain Inspection Services - program of the Grain Inspection), USDA/GIPSA (Packers and Stockyards Administration of the United States Department of Agriculture).

A DON toxin mérési módszervalidálása a gyártó által tanúsítványban leírt gabonákra és más növényi alapanyagokra, kukorica, búza, árpa, maláta, búzaborpa, cirok, búzapehely, búzaliszt, szójaliszt, szójapehely, lucerna, valamint gabona alapú takarmányokra történt. A gyártó által megadott detektálási határ (LOD): 0,15 mg/kg, a mennyiségi meghatározás határa (LOQ): 0,20 mg/kg. Az F-2 toxin, mérési módszer

validálása gabonákra: kukorica, búza, árpa, zab, valamint keverék-takarmányokra történt. A gyártó által megadott detektálási tartomány 17-41 µg/kg, az alsó méréshatár LOQ: 50 µg/kg volt. A T-2 toxin, mérési módszer validálását kukorica, valamint sertés és baromfi tápokkal, mint keverék takarmányokkal végezték. A gyártó által megadott határok a következők voltak: LOD: 20 µg/kg, LOQ: 50 µg/kg. A kitekhez mellékelt tanúsítványok szerint megadott detektálási határokat és a mennyiségi meghatározás alsó határait az **1. táblázatban** foglaltuk össze.

Mi is elvégeztük a mérési módszerek validálását, amelynek során mindegyik mikotoxin detektálási határának (LOD) meghatározásához n=10 búza mintát (vak / blank) használtunk, a gyártó által leírt minta és mérésre való előkészítés szerint. Erre azért volt szükség, mert LOD feletti koncentrációs eredményeket használtunk fel az értékelés és adatelemzés során. Az LOD kalkulációja a vizsgált minták abszorbancia alapján a kalibrációs görbék segítségével számított koncentrációs átlag értékéből és az ezekhez tartozó szórás (SD=standard deviation) értékekből történt.

$$LOD = (\text{vakminta számított átlag-koncentráció}) + (\text{mérési eredmények /SD/ szórásának kétszerese})$$

A visszanyerési % meghatározását három különböző koncentráció szinten végeztük el (50, 100, 200 µg/kg).

1. táblázat. A gyártó által (R-Biopharm) megadott alsó mérési és detektálási határok.
Table 1. Limits of detection and quantification, provided by the manufacturer (R-Biopharm)

Teszt típus Test type	Detektálási határ (LOD) Limit of detection (LOD)	A mérés alsó határa (LOQ) Limit of quantification (LOQ)
DON teszt / DON test	0,2 mg/kg	0,2 mg/kg
F-2 teszt / F-2 test	17- 41 µg/kg	50 µg/kg
T-2 teszt / T-2 test	20 µg/kg	50 µg/kg

LOD: A detektálás alsó határa (Limit of detection)

LOQ: A mennyiségi mérés alsó határa (Limit of quantification)

2. táblázat. ELISA módszer validálási eredményei.
Table 2. ELISA method validation results

Mikotoxin Mycotoxin	LOD (µg/kg)	Adagolt (spiked) koncentráció Spiked concentration (µg/kg)	Visszanyerés Recovery (%)	Átlag visszanyerés számoláshoz Average recovery for calculation (%)	CV (%)	Köztes pontosság Intermediate precision (%)	CV (%)
DON	13	50	92,0	92,3	4,3	92,4	6,0
		100	95,6				
		200	89,4				
F-2	17	50	85,3	89,3	3,9	86,9	6,8
		100	92,5				
		200	90,1				
T-2	12	50	97,5	97,3	3,4	96,9	7,0
		100	98,1				
		200	96,3				

LOD: A detektálás alsó határa (Limit of detection)

CV: Variációs koefficiens (Variation coefficient)

A kontroll búza mintáinkhoz 500 µg/l-t adagoltunk az általunk készített mikotoxin standard munkaoldatból úgy, hogy beállítsuk a becsült három koncentráció-szintet. Minden koncentráció esetén és naponta hat ismétléssel dolgoztunk.

$$\text{Visszanyerési \%} = 100 \times (\text{mért tartalom} / \text{erősített szint})$$

A köztes pontosság (intermediate precision), helyesség meghatározása érdekében ugyanezeket a lépéseket még két alkalommal megismételtük. Összesen 3 alkalommal mértünk le minden mikotoxint minden koncentrációban. A vizsgálatok két hónap alatt zajlottak le, két különböző vizsgálószemély bevonásával, ugyanabban a laboratóriumban, ugyanazokkal az eszközökkel. A precizitás a mérés véletlenszerű változásait jellemző adat, amely többek között a laboratóriumon belüli variabilitással is leírható.

$$H = X_{\text{mért}} - X_{\text{ref}}$$

Ahol H a helyesség, pontosság amely egyenlő a mért ($X_{\text{mért}}$) és a referencia érték (X_{ref}) különbségével, ha rendelkezésre áll CRM (hiteles vagy tanúsított referencia minta). Az X_{ref} értékét CRM híján magunk határoztuk meg.

Mindegyik vizsgált mikotoxin (DON, F-2, T-2) validációs paramétereinek meghatározásához búzamintákat használtunk. Eredményeinket a **2. táblázatban** foglaltuk össze.

Az adatok a következőképpen alakultak: DON mikotoxin LOD: 13 µg/kg, F-2 toxinnál 17 µg/kg, T-2 esetében 12 µg/kg volt. A visszanyerés 85,3- 98,1% között alakult, a variációs koefficiens (CV) 3,4- 5,7%. Köztes pontosság: 86,9- 96,9%, CV: 5,9- 7,1%. A vizsgálataink során megadott koncentrációs értékek számítása az adott mikotoxin-átlagérték visszanyerése alapján történt. A visszanyerés elfogadhatósági kritériumai szerint 0,01 mg/kg koncentráció esetében 60-115 % között, 0,1 mg/kg esetében 80-110 % között kell lennie az értékeknek (882/2004/EK rendelet III. mellékletének 1. és 2. tételében foglalt ren-

delkezéseknek kell megfelelniük). A mi esetünkben a visszanyerés elfogadható volt. A T-2 kit esetében azonban a HT-2 toxin keresztreakcióját figyelembe kell venni, és a gyártó által meghatározott keresztreakcióval számolni kell. A tesztfolyamatokat, lépéseket a gyártó vagy forgalmazó által mellékelte útmutatás szerint hajtottuk végre (R-Biopharm, D.G.).

4. Eredmények és értékelésük

A mikotoxin-vizsgálatok előtt öt pontos standard kalibrációt végeztünk a tesztekhez mellékelte standard oldatokkal. A kalibrációs görbék korrelációs együtthatói (R^2) DON toxin kalibráció esetében: 0,9962; F-2 kalibráció: 0,9998 és T-2 kalibráció esetében: 0,9943 volt. A kalibrálás lineáris, ha a korrelációs együttható (R^2) magasabb, mint 0,990. Szója esetében DON és T-2 toxinokra nézve az összes minta vizsgálati eredménye a mérési határ alatt (<LOQ) volt, de a toxinok detektálhatóak (>LOD) voltak. Az F-2 toxin a szójaminták 60%-ában volt mennyiségileg (>LOQ) meghatározható. A lucernapellet-minták esetében mind a három toxinnál 100%-ban LOQ felett voltak a koncentrációk. Az RStudio szoftver (RStudio Inc.) [24] segítségével kiértékelt adatok a **3. táblázatban** láthatók. Ebben a táblázatban az összes vizsgált minta mikotoxin-koncentrációinak statisztikai értékelését látjuk, amely azt mutatja, hogy a DON mikotoxinok medián és átlagértéke egy nagyságrenddel nagyobb a zearalenon és T-2 mikotoxinokénál, melyek minden esetben detektálhatóak (>LOD) voltak.

Az alacsony mintaszám, a DON és a másik két mikotoxin medián értékeinek nagy különbsége miatt az eloszlások illetve a normalitás vizsgálata a nagy bizonytalanság miatt nem tehető meg. Ha a normális eloszlás nem bizonyítható, akkor a medián értékek összehasonlítására használhatjuk a Wilcoxon tesztet. A vizsgált mintákra nézve az F-2 és a T-2 mikotoxinok medián értékei nem különböznek szignifikánsan egymástól ($p=0,0926$; $p > 0,05$), de a DON és az F-2 ($p=0,0069$; $p < 0,05$) valamint, a DON és a T-2 toxinok ($p=0,0051$; $p < 0,05$) értékei igen. A mennyiségileg

3. táblázat. Detektált mikotoxin-koncentrációk (>LOD) értékelése az összes mintára vonatkoztatva (szója, lucerna pellet), RStudio matematikai-statisztikai programmal.
Table 3. Evaluation of the detected mycotoxin concentrations (>LOD) for all samples (soy, alfalfa pellet), using the RStudio mathematical-statistical program

DON µg/kg	F-2 µg/kg	T-2 µg/kg
Min.: 15.0	Min.: 43.00	Min.: 13.00
1st Qu.: 48.0	1st Qu.: 74.00	1st Qu.: 18.00
Medián / Median: 568.0	Medián / Median: 85.00	Medián / Median: 45.00
Átlag / Mean: 605.0	Átlag / Mean: 89.00	Átlag / Mean: 46.00
3rd Qu.: 1105.0	3rd Qu.: 108.00	3rd Qu.: 69.00
Max.: 1400.0	Max.: 134.00	Max.: 83.00

LOD: A detektálás alsó határa (Limit of detection)
1st Qu.: Első kvartilis (First quartile)
3rd Qu.: Harmadik kvartilis (Third quartile)
Min.: minimum
Max.: maximum

meghatározható (>LOQ) koncentrációk értékelése a **4. táblázatban** látható, ahol az átlagot, SD, minimum és maximum értékeket adtuk meg.

A búza-, árpa- és kukoricaminták mérése előtt ötpon-tos kalibrációt végeztünk az általunk vizsgált *Fusarium* mikotoxinokra. A kalibrációs görbék korrelációs együtthatójának négyzete (R^2) DON toxin kalibráció esetében: 0,9974, F-2 kalibrációnál: 0,9977, és T-2 kalibráció esetében: 0,9983 volt.

Búza esetében F-2 toxinra a minták vizsgálati eredményeinek 100 %-a volt LOQ feletti érték. Az árpánál a minták 20 %-ánál találtunk LOQ feletti DON-értékeket. Kukoricánál DON toxinra a minták 50 %-a; F-2, T-2 toxinokból a minták 20%-a tartalmazott a mérés alsó határa feletti értékeket (>LOQ). Az RStudio szoftver segítségével kiértékelt adatokat az **5. táblázatban** adtuk meg, ahol az összes vizsgált minta mikotoxin koncentrációinak statisztikai

értékelését látjuk. Itt is mindegyik mintában (hasonlóan az 1. csoporthoz) mind a három mikotoxin detektálható mennyiségben (>LOD) volt jelen.

Az általunk használt matematikai-statisztikai program az adatok gyors elemzését tette lehetővé. A kiértékelésből megállapíthatjuk, hogy a deoxinivalenol átlagértéke itt is egy nagyságrenddel nagyobb a zearalenon, és T-2 mikotoxinokénál.

A nagy eltérések miatt ebben az esetben sem volt értelme az eloszlás- és normalitásvizsgálatnak. Ha az eloszlás nem normális, a nem paraméteres Mann-Whitney U teszt használható: a háromféle mintacsoport esetében nincs szignifikáns különbség az egyes mikotoxinok mediánjai között (a p értékek minden esetben 0,05 fölöttiek voltak). A szintén robusztus Kruskal-Wallis ANOVA tesztet elvégezve azt tapasztaltuk, hogy ha minden mintacsoportot egyszerre vizsgálunk, akkor sincs szignifikáns különbség

4. táblázat. LOQ feletti mikotoxin-koncentrációk értékelése.
Table 4. Evaluation of mycotoxin concentrations above the LOQ.

Mikotoxinok <i>Mycotoxin</i>	Minták <i>Sample</i>	>LOQ minták eloszlása >LOQ sample distribution (%)	Minták átlag- értéke <i>Mean sample value (µg/kg)</i>	SD (szórás) SD (standard deviation) (µg/kg)	Min. érték <i>Min. value (µg/kg)</i>	Max. érték <i>Max. value (µg/kg)</i>
DON	Szója / Soy	0%	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a
	Lucerna pellet <i>Alfalfa pellet</i>	100%	1164	±143	1050	1400
F-2	Szója / Soy	60%	79	±7	72	85
	Lucerna pellet <i>Alfalfa pellet</i>	100%	111	±19	86	134
T-2	Szója Soy	0%	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a
	Lucerna pellet <i>Alfalfa pellet</i>	100%	74	±7	67	83

LOQ: A mennyiségi mérés alsó határa (*Limit of quantification*)

^a Mennyiségi mérés alsó határa alatti mikotoxin-koncentrációk (<LOQ).

^a *Mycotoxin concentrations below the limit of quantification (<LOQ).*

Min.: minimum

Max.: maximum

5. táblázat. Detektált mikotoxin koncentrációk (>LOD) értékelése az összes mintára vonatkoztatva
(búza, árpa, kukorica), RStudio matematikai-statisztikai programmal.

Table 5. Evaluation of detected mycotoxin concentrations (>LOD) for all samples
(wheat, barley, maize), using the RStudio mathematical-statistical program.

DON µg/kg	F-2 µg/kg	T-2 µg/kg
Min.: 45.0	Min.: 17.00	Min.: 19.00
1st Qu.: 63.0	1st Qu.: 18.00	1st Qu.: 19.00
Medián / <i>Median</i> : 70.0	Medián / <i>Median</i> : 25.00	Medián / <i>Median</i> : 20.00
Átlag / <i>Mean</i>: 145.0	Átlag / <i>Mean</i>: 39.00	Átlag / <i>Mean</i>: 24.00
3rd Qu.: 271.0	3rd Qu.: 64.00	3rd Qu.: 23.00
Max.: 401.0	Max.: 72.00	Max.: 52.00

LOD: A detektálás alsó határa (*Limit of detection*)

1st Qu.: Első kvartilis (*First quartile*)

3rd Qu.: Harmadik kvartilis (*Third quartile*)

Min.: minimum

Max.: maximum

a mikotoxinok medián értékei között. Az F-2 mikotoxint vizsgálva a p érték a szignifikancia szint határán volt ($p=0,0498$), külön-külön vizsgálva a csoportokat, nem szignifikáns a különbség a mediánok között. A mennyiségileg meghatározható koncentrációk kiértékelését a **6. táblázatban** foglaltuk össze, ahol az átlag, a szórás (SD), a minimum és a maximum értékeket adtuk meg. A DON esetében kukoricamintákban az átlagérték a szórással korrigálva (\pm SD) 297 ± 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ volt.

A NÉBIH (Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal) rendszeresen ellenőrzi hazánkban a takarmány-alapanyagok, takarmányok és az emberi étkezésre szánt növényi alapanyagok különböző mikotoxin-szennyezettségét. Korábbi vizsgálatokból [22] származó eredmények szerint, 2003-ban DON toxinra $n=222$ különböző mezőgazdasági alapanyagot vizsgáltak meg. Vizsgálatukból kiderült, hogy a minták 30,2%-a 0,040 mg/kg alatti koncentrációban, 10,4%-a 2,0 mg/kg feletti koncentrációban tartalmazta a toxint. 2008-ban ugyancsak DON toxinra végzett takarmány alapanyag vizsgálatuk során $n=118$ mintát vizsgáltak, melynél 50%-a 0,040 mg/kg alatti, 6,8%-a 2,0 mg/kg feletti DON toxin szennyezettséget mutatott. A zearalenonra (F-2) vonatkozóan 2003-ban, $n=128$ alapanyag mintát vizsgáltak meg, ebből 77,3%-a 0,010 mg/kg alatti koncentrációban tartalmazta a toxint, 0,8%-a 1,0 mg/kg feletti volt. 2008-ban F-2 toxinra vizsgált mintákban ($n=56$) 0,010 mg/kg alatti eredmény 80,4%-ban fordult elő, de 1,0 mg/kg feletti mennyiséget nem találtak. T-2 toxin esetében 2003-ban, $n=147$ mintát vizsgáltak, amelyekben kimutatási határ alatt a minták 94,6%-a volt, ez a szám 2006-ban 90%-os, 2008-ban ($n=12$) már csak 75% volt. Ezek az eredmények is bizonyítják, hogy a mikotoxinok mennyisége évről évre változhat a különböző vizsgált mintákban az időjárási és klimatikus hatások eredményeképpen.

2015-ben készült tanulmányunkban búza-, kukorica-, árpa- és zabmintákat vizsgáltunk ($n=116$), a kukorica bizonyult szennyezettebb gabonának DON, F-2, T-2 toxinra vonatkozóan [17].

A mezőgazdasági alapanyagokban és az állati takarmányokban a *Fusarium* toxinok (DON, F-2, T-2) vizsgálata fontos feladat, hiszen e szennyezők innen kerülhetnek be a táplálékláncba.

5. Következtetések

A klímaváltozással kapcsoltban megjelenő új veszélyforrások egyike a mikotoxinok előfordulásának megnövekedett gyakorisága a táplálékláncban. Vizsgálatunk során a leggyakrabban használt takarmányozási alapanyagok DON, F-2, T-2 mikotoxin szennyezettségének mérését végeztük el kompetitív ELISA-módszerrel. A vizsgált három toxin minden egyes mintában detektálható ($>\text{LOD}$) volt. Az adatok alapján megállapítottuk, hogy a DON toxinok átlagértékei egy nagyságrenddel nagyobbak voltak, mint az F-2, és a T-2 mikotoxinok átlagértékei. Ezekből az adatokból az a következtetés vonható le, hogy az alapanyagokat legnagyobb mértékben szennyező toxin a DON, majd ezt követi az F-2, és végül a T-2 toxin.

Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a deoxinivalenol, F-2, T-2 mikotoxinok vizsgálata kiemelt jelentőségű feladat az élelmiszer- és takarmánybiztonság területén.

6. Irodalom

- [1] Kovács, F. (2010): Agrártermelés- Tápláléklánc- Mikotoxinok. Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Kovács, M. (szerk.). Agroinform Kiadó, Budapest. p. 7-11

6. táblázat. LOQ feletti mikotoxin-koncentrációk értékelése.
Table 6. Evaluation of mycotoxin concentrations above the LOQ.

Mikotoxinok Mycotoxin	Minták Sample	>LOQ minták eloszlása (%) >LOQ sample distribution (%)	Minták átlag- értéke Mean sample value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD (szórás) SD (standard deviation) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Min. érték Min. value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Max. érték Max. value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
DON	Búza / Wheat	0%	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a
	Árpa / Barley	20%	401	n.é.	n.é.	n.é.
	Kukorica / Maize	50%	297	± 24	280	314
F-2	Búza / Wheat	100%	69	± 4	64	72
	Árpa / Barley	0%	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a
	Kukorica / Maize	20%	64	n.é.	n.é.	n.é.
T-2	Búza / Wheat	0%	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a
	Árpa / Barley	0%	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a
	Kukorica / Maize	20%	52	n.é.	n.é.	n.é.

LOQ: A mennyiségi mérés alsó határa (Limit of quantification)

^a Mennyiségi mérés alsó határa alatti mikotoxin-koncentrációk (<LOQ).

n.é.: Nem értelmezhető, mivel egy minta volt LOQ felett.

Min.: minimum

Max.: maximum

- [2] Farkas, J., Beczner, J. (2009): A klímaváltozás és a globális felmelegedés várható hatása a mikológiai élelmiszer- biztonságra. *Klíma- 21 Füzetek*. 56. p. 4-5.
- [3] Bata, Á. (2001): Mikotoxinok meghatározásának analitikai módszerei. *Penészgombák – mikotoxinok a táplálékláncban*, Kovács, F. (szerk.). MTA, Agrártudományok Osztálya, Budapest. p. 20-29
- [4] Mesterházy, Á. (2015): Agrotechnikával a fuzárium megelőzésére. *Biokultúra*. 26(3). p. 30-32
- [5] Mesterházy, Á., Lehoczki-Krsjak, Sz., Varga, M., Tóth, B., Szabó-Hevér, Á., Bartók, T., Ács, K., Kótai, Cs. (2014) A búza kalászvédelmének fejlesztése kalászfuzáriummal szemben. A kilencedik évtizedben, Matuz, J., Szilágyi, L.(szerk.). Szeged. p. 259-265
- [6] László, Gy. (2013): Biológiai növényvédelem Magyarországon. Engedélyezett növényvédő szerek az ökológiai és az integrált gazdaságban. *Biokultúra*. 24(2). http://www.biokontroll.hu/cms/index.php?option=com_content&view=article&id=1564:biologiai-noevenyvedelem-magyarorszagon&catid=112:novenytermesztes&Itemid=43 Hozzáférés: 2016. 11. 04.
- [7] Mesterházy, Á., Tóth, B., Lehoczki-Krsjak, S., Szabó-Hevér, Á., Cseuz, L., Lemmens, M., Varga, M., Hertelendy, P. (2011): Breeding wheat with resistance to FHB: concepts, methods and results. In: Gilbert, J., Tekauz, A., Sweetland, N., Slusarenko, K. (eds.): Proc. of the 7th Canadian Workshop on Fusarium Head Blight.,Winnipeg, Kanada. 122.
- [8] Szabó-Hevér, Á., Varga, M., Lehoczky-Krsjak, Sz., Lantos, Cs., Pauk, J., Purnhauser, L., Mesterházy, Á. (2013): Deoxinivalenol-tartalommal szembeni rezisztencia genetikai hátterének vizsgálata frontana eredetű térképező búz populációban. XIX. Növénynevelési Tudományos Nap. Pannon Egyetem Georgikon Kar. Keszthely
- [9] Kecskésné, N.E., Sembery, P. (2015): The effect of adequate technical conditions on level of Don toxin in milling process. *Annals of Faculty of Engineering Hunedoara - International Journal of Engineering*. 13(1). p. 49-52
- [10] Kecskésné, N.E., Korzenszky, P., Sembery, P. (2016/a): The role of color sorting machine in reducing food safety risks. *Potravinarstvo*. 10(1). p. 354-358
- [11] Kecskésné, N.E., Tima, H., Korzenszky, P., Sembery, P. (2016/b): Színválogatás után keletkezett malmi melléktermék DON-toxin-tartalmának vizsgálata takarmányként való felhasználás szempontjából. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 138(7). p. 421-430
- [12] Placinta, C.M., D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. (1999): A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *J. Anim F Sci and Techn*. 78. p. 21-37
- [13] Muller, H.M., Schwadorf, K. (1993): A survey of the natural occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in a southwestern area of Germany. *Mycopath*.121. p. 115-121
- [14] Perkowski, J., Plattner, R.D., Golinski, P., Vesonder, R. F. (1990): Natural occurrence of deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, nivalenol, 4,7-dideoxynivalenol and zearalenone in Polish wheat. *Mycotoxin Res*. 6. p. 7-12
- [15] Hietaniemi, V., Kumpulainen, J. (1991): Contents of *Fusarium* toxins in Finnish and imported grains and feeds. *Food Addit. Contam*. 8. p. 171-182
- [16] Campbell, A. D., Whitaker, T.B., Pohland, A. E., Divkens, J. W., Pork, D.L. (1986): Sampling, sample preparation and samplings plans for foodstuffs for mycotoxin analysis. *Pure appl. Chem*. 58. p. 307-313
- [17] Tima, H., Brückner A., Mohácsi-Farkas, Cs., Kiskó, G. (2016): *Fusarium* mycotoxins in cereals harvested from Hungarian fields. *Food Add Cont Part:B*. 9(2). p. 127-131
- [18] Bata, Á., Harrach, B., Ujszászi, K., Kis-Tamás, A., Lásztity, R. (1985): Macroyclic trichotecene toxins produced by *stachybotrys atra* strains isolated in Middle Europe. *Appl. Environm. Microbiol*. 49. p. 679-681
- [19] Pohland, A.E., Thorpe, C.W., Trucksess, M.W., Eppley, R.M. (Eds.) (1986): *Diagnosis of Mycotoxicoses*. Martinus Nijhoff. The Hague. 271
- [20] Barna-Vetró, I., Gyöngyösi, Á., Solti, L. (1994): Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for *Fusarium*, T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Appl. Environm. Microbiol*. 60. p. 730-731
- [21] Barna-Vetró, I., Solti, L. (2001): Mikotoxinok mérésére alkalmas enzim- immunanalitikai módszerek. *Penészgombák – mikotoxinok a táplálékláncban*, Kovács, F. (szerk.). MTA, Agrártudományok Osztálya, Budapest. p. 30-41
- [22] Búza, L., Marthné, S.J. (2010): Mikotoxinok vizsgálati módszerei, eredményei, előfordulásuk a hazai takarmányokban. *Aktualitások a mikotoxin kutatásban*, Kovács, M. (szerk.). Agroiinform Kiadó, Budapest. p. 13-19
- [23] Farkas, J., Szeitzné Sz.M., Mohácsiné F.Cs. (2014): Mikotoxinok álarcban- új takarmány- és élelmiszer-biztonsági kihívás? *Élvizsg. Köz*. 3.
- [24] Ihaka, R., Gentleman, R. (1996): A language for data analysis and graphics. *J. Computat. and Graph. Stat*. 5(3). p. 299-314