

SZAKDOLGOZAT

Szakdolgozat - Kilián Kitti

Kilián Kitti

2025



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Budai Campus
Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék
Biomérnöki alapképzési szak**

ÚJ FAJ JELÖLT BAKTÉRIUM JELLEMZÉSE

Belső konzulens: Dr. Csernus Olívia
Tudományos munkatárs

Dr. Tóth Ákos Gergely
Tudományos munkatárs

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** Élelmiszertudományi és
Technológiai Intézet, Biomérnök és
Erjedéssipari Technológia Tanszék

Készítette: Kilián Kitti

**Budapest
2025**

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. A LIGNOCELLULÓZ FELÉPÍTÉSE	3
2.2. A LIGNOCELLULÓZ ENZIMATIKUS BONTÁSA	5
2.2.1. <i>Lignocellulóz-bontó mikroorganizmusok</i>	5
2.2.2. LIGNINMÓDOSÍTÓ ENZIMEK.....	7
2.3. BAKTÉRIUMOK MEGHATÁROZÁSA ÉS JELLEMZÉSE.....	12
3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	16
3.1 FENOTÍPUSOS KARAKTERIZÁLÁS	16
3.1.1 <i>Táptalaj preferencia</i>	16
3.1.2 <i>Gram teszt</i>	19
3.1.3 <i>Oxidáz teszt</i>	19
3.1.4 <i>Kataláz teszt</i>	20
3.1.5 <i>Anyagcsere tesztek (API)</i>	20
3.2 MOLEKULÁRIS MIKROBIOLÓGIAI MÓDSZEREK	21
3.2.1 <i>DNS izolálás</i>	21
3.2.2 <i>DNS koncentráció mérés</i>	23
3.2.3 <i>16S rRNS gén amplifikáció (PCR)</i>	23
4 KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	27
4.1 FENOTÍPUSOS KARAKTERIZÁLÁS	27
4.1.1 <i>Táptalaj preferencia és telep morfológia vizsgálata</i>	27
4.1.2 <i>Hőmérséklet optimum meghatározás</i>	29
4.1.3 <i>API 50 CH teszt</i>	30
4.1.4 <i>Oxidáz teszt</i>	32
4.1.5 <i>Gram teszt</i>	32
4.1.6 <i>Kataláz teszt</i>	33
4.2 MOLEKULÁRIS MIKROBIOLÓGIAI MÓDSZEREK	34
4.2.1 <i>Az izolált DNS NanoDroppal történő vizsgálata</i>	34
4.2.2 <i>A gél vizsgálata</i>	35
4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	37
5. ÖSSZEFOGLALÁS	38
IRODALOMJEGYZÉK	39
ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	44
ÁBRAJEGYZÉK.....	44
TÁBLÁZATJEGYZÉK	44
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	45

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A növényi biomassza a Földön a legnagyobb mennyiségben elérhető, megújuló erőforrás. A lignocellulóz biomassza jelentős részét a növényi sejtfal teszi ki, amely fő feladata a sejtek védelme és a sejt struktúrájának megőrzése. A növényi sejtek száraztömegének tipikus százalékos aránya: 35-50% cellulóz, 20-35% hemicellulóz és 5-30% lignin.

Az éghajlat változás egy globális problémát jelent. Az atmoszférában található szén-dioxid (CO₂) tartalom 1750 óta 43%-kal emelkedett. Ebben a drasztikus változásban kiemelkedő szerepe van a fosszilis tüzelőanyagok túlzott felhasználásnak és a nagymértékű erdőirtásnak (Raud et al., 2019). Újabb statisztikák szerint a globális lignocellulóz biomassza éves keletkezése körülbelül 181,5 milliárd tonna, amelyből csak 8,2 milliárd tonna kerül felhasználásra különböző alkalmazási területeken (Singh et al., 2022). A fosszilis tüzelőanyagok egyre növekvő költségei és a szén-dioxid kibocsátásuk káros környezeti hatásai miatt, egyre nagyobb igény mutatkozik a költséghatékonyabb, és egyben környezetbarát bioüzemanyagforrások alkalmazására, amelyek megoldásként szolgálhatnak a globális felmelegedés csökkentésére. A lignocellulóz biomassza mezőgazdasági és erdészeti maradványokból, szerves szilárd, faipari, valamint cellulóz tartalmú hulladékokból származik. A biomassza átalakítása általában egy többlépcsős feldolgozási folyamatot igényel, amely magába foglalja az előkezelést (mechanikai, kémiai vagy biológiai), enzimátikus hidrolízist és a fermentációs folyamatokat (Mujtaba et al., 2023; Anwar et al., 2014).

A lignocellulóz alapú biomassza fenntartható lebontása hidrolízis révén, lignocellulolitikus enzimek segítségével megy végbe, amelyeket a bioüzemanyag gyártás mellett, különböző alkalmazásokban is fel lehet használni, mint például papíripar, élelmiszeripar, textilipar, mezőgazdaság és hulladékkezelés.

A papíriparban az oxidatív enzimek, lignin-peroxidázok (LiP), mangán-peroxidázok (MnP), hibrid-peroxidázok (VP) és lakkázok jelentős szerepet töltenek be a biológiai fehérítésben, így helyettesítve a klóralapú fehérítést. A papír- és cellulóziparban egyre ismertebb a „biopulping” alkalmazása. A „biopulping” folyamata során a ligninbontó mikroorganizmokkal kezelt fakéreg lágyabbá válik, ami erősebb papírt eredményez (Chukwuma et al., 2020).

Az élelmiszeriparban a lignocellulolitikus enzimeket széles körben használják fel, mint például a gyümölcs- és zöldséglevék feldolgozása, valamint a növényi olajfeldolgozás során, továbbá

a borászatban, a sörfőzésben és a sütőiparban. Jelenleg különböző enzimátikus kezeléseket alkalmaznak a modern gyümölcs- és zöldségfeldolgozásban, mivel a cellulázok, hemicellulázok és pektinázok kiválóan alkalmazhatóak a folyamatok optimalizálására (Toushik et al., 2017).

A textiliparban többnyire a szintetikus rostok használata az elterjedt, amelyek termelése környezetszennyezéshez vezet. Ennek következtében egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik a környezetbarát növényi rostok felhasználása iránt, ilyen például a pamut, juta és a len. A cellulázok a nedves textildolgozásban sikeresen alkalmazott enzimek, amelyeket a pamutrostok utókezelésére alkalmaznak (Verma és Dwivedi, 2014; Kuhad et al., 2011).

A mezőgazdaság területén is alkalmazzák a celluláz, hemicelluláz és pektináz enzimeket, amelyek a növények növekedésének fokozásában és betegségeik megelőzésében játszanak szerepet. A celluláz enzimeket a talaj minőségének javítására is alkalmazzák. A különböző cellulolitikus gombák, mint például az *Aspergillus*, *Chaetomium* és *Trichoderma* ígéretes eredményeket mutattak a vizsgálatok során (Kuhad et al., 2011).

A hulladékként jelentkező növényi biomassza feldolgozásának problémájára adhat választ a lignocellulóz bontásra képes baktériumok biotechnológiai alkalmazása. A munkám célja egy új, eddig ismeretlen baktérium fajhoz tartozó törzs jellemzése, amely a későbbiekben a növényi biomassza hasznosítását célzó biotechnológiai eljárás alapja lehet. A jellemzés során célul tűztem ki egy korábban izolált, lignocellulóz bontó törzs alapvető tulajdonságainak meghatározását, mint például a környezeti optimumait, morfológiai bélyegeit, valamint az anyagcsere tulajdonságait.

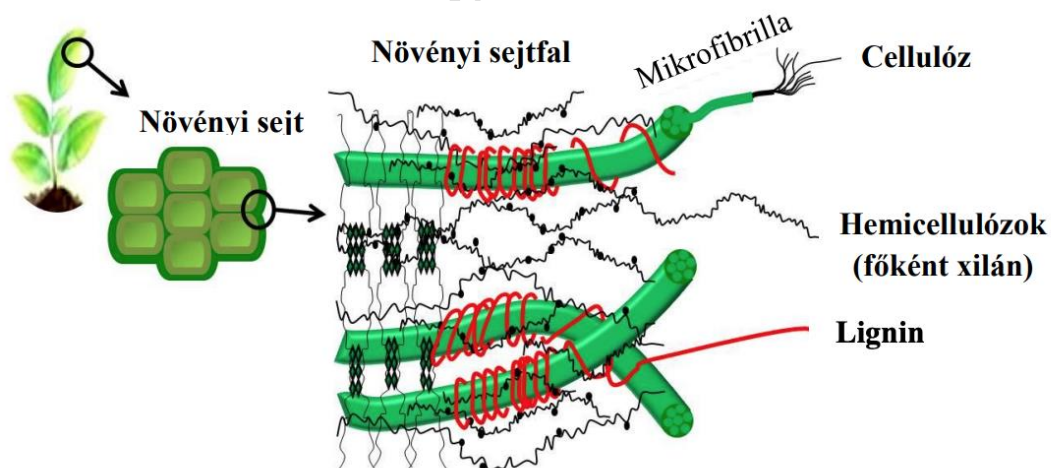
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A lignocellulóz felépítése

A növényi biomassa az emberiség számára hozzáférhető legmeghatározóbb megújuló szénforrás. A lignocellulóz egy összetett kompozit szerkezet, amely elsősorban három biopolimerből áll, ligninből, cellulózból és hemicellulózból. Az 1. ábrán látható a lignocellulóz szerkezeti felépítése. A lignin a lignocellulóz második leggazdagabb polimer frakciója. A lignin egy nagy molekulatömegű, oldhatatlan polimer, amely fenil-propán alegységekből épül fel. A fenil-propán alegységek kovalensen kötődnek a hemicellulózhoz, és ennek eredményeképpen létrejövő mátrixba ágyazódnak bele a cellulóz mikroszálak (Smith, 2019; Tóth, 2016). A fő alkotóelemei a három fenil-propán származék, a p-kumar-alkohol, a koniferil-alkohol és a szinapil-alkohol. A lignin polimerben ezek a fenil-propán származékok tovább módosulnak p-hidroxifenil, guaiacil és sziringil csoportokká. Ezen alkotóelemekből képződik, az enzim katalizált polimerizációs reakcióban szabálytalan szerkezetű lignin hálózat. Szerepe a növényi sejtfal erősítésében és a különböző mikrobiológiai behatásokkal szembeni védelem biztosításában van.

1. ábra: A lignocellulóz szerkezeti felépítése

(Forrás: Makk, 2017)



A növényi sejtfal fő alkotó eleme a cellulóz. A cellobióz a glükán láncok szerkezeti ismétlődő egysége a cellulózban. A cellobióz két β -1,4 kötéssel kapcsolódó glükóz molekula dimerje, amelyben a glükóz molekulák 180° -kal elfordulnak (Réczey, 2012). Ez ellentétben áll más glükán polimerekkel, például az α -1,4-glükánnal (keményítő), és β -1,3-glükánnal (kalóz), ahol

a glükóz az ismétlődő egység. A glükán lánc egy hosszú, láncszerű szerkezetet alkot, melyet Van der Waals erők, valamint az intra- és intermolekuláris hidrogénkötések stabilizálnak. Ennek eredményeként a glükán láncok szabályos kristályos elrendezést alkotnak, mely vízben oldhatatlan és ellenálló a különböző kémiai behatásokkal szemben. A természetben a cellulóz sosem fordul elő egyetlen láncként, hanem a szintézis pillanatától kezdve mikrofibrillumokban létezik, amely a cellulóz szálak egyre vastagabb, rendezett szerkezetű kristályos kötegei. A glükán lánc hossza körülbelül 2000-től több mint 25000 glükóz egységig terjed. A természetben a cellulóz leggyakoribb kristályos formája a cellulóz I, amely metastabil és irreverzibilisen átalakítható egy másik kristályos állapotba, a cellulóz II-be, amely a legstabilabb ismert allomorf. A cellulóz I párhuzamos glükán láncokkal és erős intramolekuláris hidrogénkötésekkel rendelkezik. A *Valonia macrophysa* nevű óriás tengeri alga szintetizálja a cellulóz I-et, amely a legmagasabb kristályszerkezettel rendelkezik. A természetben a cellulóz I két kristályos szuballomorfban létezik, cellulóz I α -ban és I β -ban. A cellulóz II ritkán fordul elő a természetben. A cellulóz II glükán láncok antiparallel irányban helyezkednek el, valószínűleg a lánc felcsavarodásának eredményeként. Más cellulóz allomorfok, például a cellulóz III és IV ismertek, de ritkán vagy sosem fordulnak elő a természetben. Minden cellulóz allomorfot a jellegzetes röntgen- vagy elektron-diffrakciós mintázata alapján lehet azonosítani (Brown et al., 1996).

A hemicellulóz a második leggyakrabban előforduló természetes polimer a cellulóz után a növényi sejtfalban. A cellulóz a növényi sejtfalnak a domináns szerkezeti poliszacharidja, egy lineáris β -1,4-D glükopiranozid polimer. A hemicellulózokat keresztkapcsolódó glikánoknak is nevezik, és úgy vélik, hogy szerepet játszanak a növényi sejtfal nyújtásában és módosításának szabályozásában. A hemicellulózok a cellulóz szálak közötti kölcsönhatásokra erőteljes hatást gyakorolnak, és jelentős szerepük van a cellulóz láncok és a lignin összeköttetésében (Wyman et al., 2005). A hemicellulózok elágazó szerkezetű heteropolimerek amelyek öt gyakori összetételű csoportból állnak, melyek a xilánok, mannánok, β -glükánok, xiloglükánok, valamint az arabinogalaktánok (Smith, 2019).

A xilán a legelterjedtebb hemicellulóz a növényi sejtfalban, általában a teljes növényi biomassza körülbelül 1/3-át teszi ki. A xilánok β -1,4 kötésű xilóz gerinccel és különböző mellékcsoportokkal rendelkeznek. A xilán specifikus változatát az oldalláncok összetétele és kapcsolatai határozzák meg. Az oldalláncokat általában az O₂ és/vagy O₃ pozíciókhoz

kapcsolják, és tartalmazhatnak glükuronsavat, 4-O-metil-glükuronsavat, L-arabinofuranózt, xilózt és acetilcsoportokat. Az oldalláncok típusa és szintje az adott növénytől függ.

A mannán egy β -1,4-glikozidos kötésekkel kapcsolódó lineáris heteropolimer. A szerkezete, és így a lebomlása is nagyon hasonló a cellulózhoz, mindkettő lineáris β -1,4 kötésekkel kapcsolt monoszacharid polimer. A mannán polimer elágazásokat tartalmazhat, melyekben főként glükóz és galaktóz monomerek találhatóak, így glükomannánt, galaktomannánt és galaktoglükomannánokat kaphatunk az elágazásokat felépítő monomerek számától függően.

A növényi biomasszában uralkodó cellulóz mellett két másik β -glükán játszik fontos szerepet a növényi sejtfal szerkezetében és működésében. A β -glükán és a xiloglükán szerkezetileg hasonlóak a cellulózhoz, mivel β -kapcsolt glükóz gerincen alapulnak. Mindkét szerkezet részt vesz a cellulóz mátrix rendszerének támogatásában és keresztkötésében, hidrogénkötéses kölcsönhatások révén a cellulózzal, más hemi-cellulózokkal és pektinekkel (Wyman et al., 2005).

Az arabinóz és galaktóz egységekből felépülő arabinogalaktán sokkal kisebb arányban fordul elő a növényi sejtfalban, mint a xilán vagy a mannán (Tóth, 2016).

2.2. A lignocellulóz enzimatis bontása

2.2.1. Lignocellulóz-bontó mikroorganizmusok

A cellulolitikus mikroorganizmusok rendkívül változatos taxonómiai csoportokban fordulnak elő. A növényi biomassza lebontását végző mikroorganizmusok többsége az eubaktériumok és a gombák közé tartozik, de anaerob cellulózbontó protozoonokat is azonosítottak. Cellulolitikus mikroorganizmusok bárhol előfordulnak, ahol cellulóz alapú hulladék halmozódik fel. Ebben az esetben vegyes populációkban fordulnak elő, amelyekben cellulolitikus és nem-cellulolitikus fajok egyaránt jelen vannak. Ez a környezet vezet a cellulóz teljes lebontásához, amely során aerob körülmények között szén-dioxiddá és vízzé alakul át, anaerob körülmények között pedig szén-dioxiddá, metánná és vízzé.

Az aerob lebontás többnyire a talaj felső rétegén megy végbe, ahol a cellulóz hulladékok felhalmozódnak. Ezek közül a fa az a komponens, amelyet a magas lignintartalma miatt, a cellulolitikus mikroorganizmusok a leglassabban támadnak meg. A lignin teljes lebontása egy

olyan oxidatív folyamat, amelyre kevés mikroorganizmus képes. A folyamatban többnyire különböző konidiumos gombák vesznek részt. A lignin teljes lebontásához szükséges enzimkészlettel rendelkezik például a fehér rothadású gomba (*Phanerochaete chrysosporium*). Sokféle szervezet, különösen az *Actinomycetes*, a lignin részleges lebontására képes csak. A gombák mellett több cellulolitikus talajbaktériumot is azonosítottak, mint például a *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Thermomonospora* és *Microbispora* nemzetség tagjait.

Az anaerob lebontás főként a növényevők bélrendszerében, komposztban, trágyában és szennyvízkezelő üzemek iszapjaiban van jelen. Az anaerob cellulolitikus szervezetek a táplálkozási lánc egyéb mikroorganizmusai számára előnyösek, mivel megakadályozzák az ecetsav okozta savasodást, és eltávolítják a felesleges hidrogént. A polimer szénhidrátok átalakítása metánra és szén-dioxidra egy többlépcsős folyamat. Első lépésben a glükózt, amely a cellulózból származik, cellulolitikus és kapcsolt szacharolitikus szervezetek erjesztik, így hidrogént, szén-dioxidot és különböző szerves vegyületeket, beleértve savakat és alkoholokat termelve. Második lépésben ezeket a vegyületeket ecetsavra és szén-dioxidra alakítják át. Ez a lépés lehet termodinamikailag kedvezőtlen, kivéve, ha a hidrogén részleges nyomása nagyon alacsony szinten van. A felesleges redukáló ekvivalenseket ezért olyan megfelelő akceptorokhoz kell átvinni, mint a szulfát vagy a szén-dioxid. A szulfátot a szulfát redukálók hidrogén-szulfiddá csökkentik. A szén-dioxidot ecetsavvá alakítják az acetogének, és metánná a metanogének. Végző lépésben pedig az ecetsavat a metanogének metánná és szén-dioxiddá alakítják át (Béguin-Aubert, 1994).

A szaprofita gombák a magas hatékonyságú enzimáti rendszerüknek köszönhetően a lignocellulózt nagy arányban tartalmazó nyersanyagok lebontására is képesek. A gombák, két fajta lebontási rendszerrel rendelkeznek: intracelluláris, amely a külső sejtfallal működik együtt, és az extracelluláris, amelynek a poliszacharid lebontásában van kiemelkedő szerepe. Széles körű extracelluláris enzimeket termelnek, amelyeknek két típusa ismert, a hidrolitikus, amely a poliszacharid lebontását végzi, és az oxidatív, amely a lignint bontja és felnyitja a fenilgyűrűket. A lignocellulózt bontó gombákat másnéven xilofág gombáknak nevezzük. Három csoportja ismert, amelyek különböző lebontási mechanizmusokkal bontják le a lignocellulózt, az úgynevezett „white-rot” gombák, „brown-rot” gombák és a „soft-rot” gombák.

A fehér-rothadású „white-rot” gombák az összes lignocellulóz összetevőjének lebontására képesek, a lignint, cellulózt és a hemicellulózt is bontják. A leghatékonyabb lignin bontásra képesek a három említett típus közül. A lignin bontás hatékonysága a különleges enzimszisztémájuknak köszönhető, amely a teljes lignin mineralizációjára képes (Andlar et al., 2018).

A barna-rothadású „brown-rot” gombák a cellulózt és hemicellulózt jól tudják bontani, azonban a lignint lehetőség szerint tudják módosítani, bontani azonban nem tudják. Ezek a gombák a fás biomassa és a faalapú szerkezetekben találhatók meg. Tanulmányok szerint a „brown-rot” gombák a „white-rot” gombákból származtak, amikor több olyan esszenciális gént veszítettek el, amelyek a lignocellulóz lebontásáért felelősek.

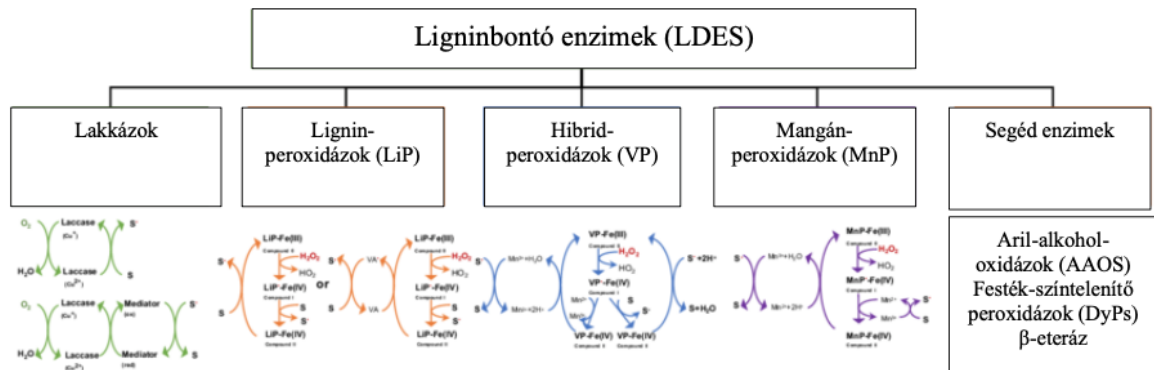
A lágy rothadású „soft-rot” gombák bontási mechanizmusát két típusra osztották. Az első típus szerint a hifák másodlagos sejtfalakat áttörve jellegzetes üregeket képeznek. A második típus hasonlóan támad, mint a tömlősgombák és a fehér-rothadású vagy másnéven „white-rot” gombák, és ez a folyamat a fa sejtfalának elvékonyodásához vezet (Sista Kameshwar és Qin, 2018).

2.2.2. Ligninmódosító enzimek

A lignin enzimikus lebontását elsősorban gombák végzik, azonban vannak olyan baktérium csoportok, amelyek képesek a lignin részleges lebontására. A szárazföldi szén szinte teljes egészében lignifikált poliszacharidokból vagy magából ligninből áll, és a biodegradációra ellenálló lenne, ha nem lennének ligninolitikus mikroorganizmusok. Ezek a szervezetek nagyrészt magasabbrendű gombák, amelyek többnyire a korhadó fákból találhatók meg. A lignin lebontása problémát jelent ezeknek a gombáknak, mivel a lignin egy fenilpropán alegységekből felépülő heterogén és amorf polimer, amely nem hidrolizálható. A gombák ligninolízis mechanizmusa a nyolcvanas évek elején lett ismert, amikor, bizonyos extracellulárisan termelődő gombaperoxidázokat fedeztek fel, amelyek a plomier lignin oxidatív reakcióját katalizáló nem specifikus fehérjék. A lignolitikus peroxidáz enzimek hem prosztetikus csoporttal működnek, alacsony pH optimummal rendelkeznek, hidrogén-peroxid és egyéb mediátorok közreműködésével bontják le a lignint. Négy fő típusa ismert: lignin-peroxidázok (LiP), mangán-peroxidázok (MnP), hibrid-peroxidázok (VP), valamint a polifenol

oxidázok közé tartozó lakkázok (Hammel et al., 1993). A ligninbontó enzimeket a 2. ábra szemlélteti.

2. ábra: Ligninbontó enzimek
(Forrás: Internet 8.)



Az első típus a lignin-peroxidázok (LiP) amelyek, magas redox potenciállal rendelkező erős oxidáló hatással rendelkeznek, a nem-fenolos lignin egységeket bontják le, akár a polimer 90%-át is. Ezek az enzimek a veratril alkohol mediátor segítségével bontják le a nem-fenolos lignin egységeket. A második típus a mangán-peroxidázok (MnP), a fenolos és nem-fenolos lignin egységek oxidációs folyamataiban is részt vesznek és Mn²⁺ iont használnak mediátorként. A harmadik típus a hibrid-peroxidázok (VP), amelyek nemrégiben kerültek leírásra a *Pleurotus* és más gombákban, mint a peroxidáz enzimek harmadik típusa, amely kombinálja a LiP és MnP tulajdonságait, illetve a növényi és mikrobiális peroxidázok katalitikus tulajdonságait, amelyek a fenolos vegyületek oxidálásáért felelősek (Martinez et al., 2005).

A lakkázok a többszörös réz oxidáz (MCO) enzimesaládba tartoznak. Ezeket az enzimeket különféle gombák, növények, rovarok és baktériumok állítják elő. A lakkázok által katalizált reakciók magukban foglalják a monomerek polimerizációját, a polimerek lebontását és a fenolos vegyületek oxidációját. A szerves anyagok oxidációja közben az oxigént négy elektronos redukcióval vízzé redukálják. A lakkázok mediátorok alkalmazásával képesek nem-fenolos vegyületeket is oxidálni, amelyek oxidációs-redukciós cikluson mennek keresztül, így az elektronokat a nem-fenolos vegyület és az enzim között továbbítják. Ezeket a lakkáz

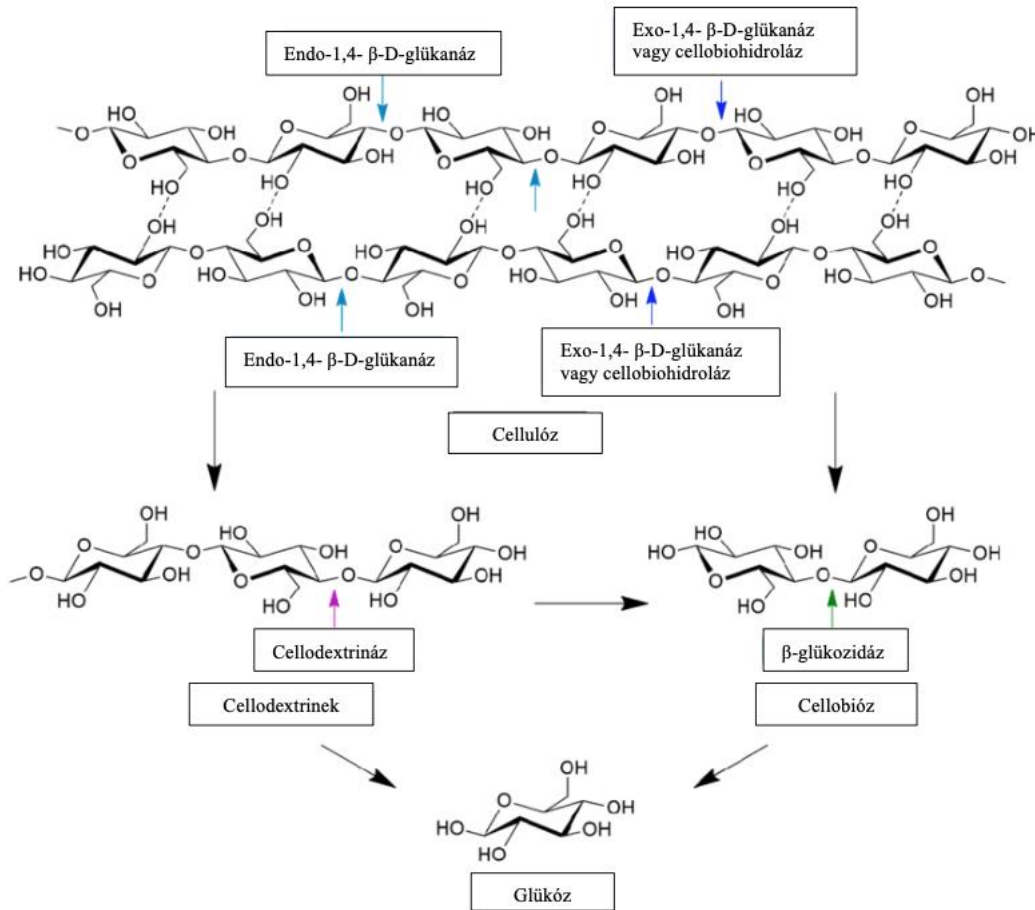
mediátor rendszereket (LMS) számos folyamatban használták, beleértve a cellulóz delignifikációt és a szerves szennyeződések oxidációját.

A baktériumok által előállított lakkázokat magas hőmérsékleti tolerancia és magas aktivitás jellemzi semleges vagy lúgos körülmények között, míg a gombák által termelt lakkázok általában savas pH érték mellett működnek. Több baktériumban is leírtak már lakkázokat, például a *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Thermus thermophilus* nemzetség tagjainál (Reiss et al., 2011). A baktériumok mellett számos gombánál is azonosították a lakkáz enzimet, *Ascomycetes*, *Deutromycetes* és *Basisomycetes* csoportokban, különösen a „white-rot” gombákban, amelyek részt vesznek a lignin anyagcseréjében (Brijwani et al., 2010).

A szénhidrátok mono-, di-, oligo- és poliszacharidok formájában, egyedülálló szerepet játszanak a természetben. A szénhidrátokat bontó enzimek a glikozid hidrolázok (GH) csoportjába tartoznak. Ezek az enzimek glikozidos kötést hasítanak két szénhidrát között, vagy egy szénhidrát és egy nem szénhidrát között. 1991-ben bevezetésre került az aminosav-szekvencia hasonlóságokon alapuló glikozid hidrolázok osztályozása (Henrissat-Davies, 1997). Napjainkban a CAZY (carbohydrate-active enzymes) adatbázisban folyamatosan feltöltésre kerülnek az új hidroláz enzimek. A glikozid hidrolázokat aszerint is megkülönböztethetjük, hogy az általuk katalizált reakció során megváltoztatja-e az anomer hely konfigurációját. Ez alapján ismerünk megtartó és invertáló glikozidázokat (Internet 1).

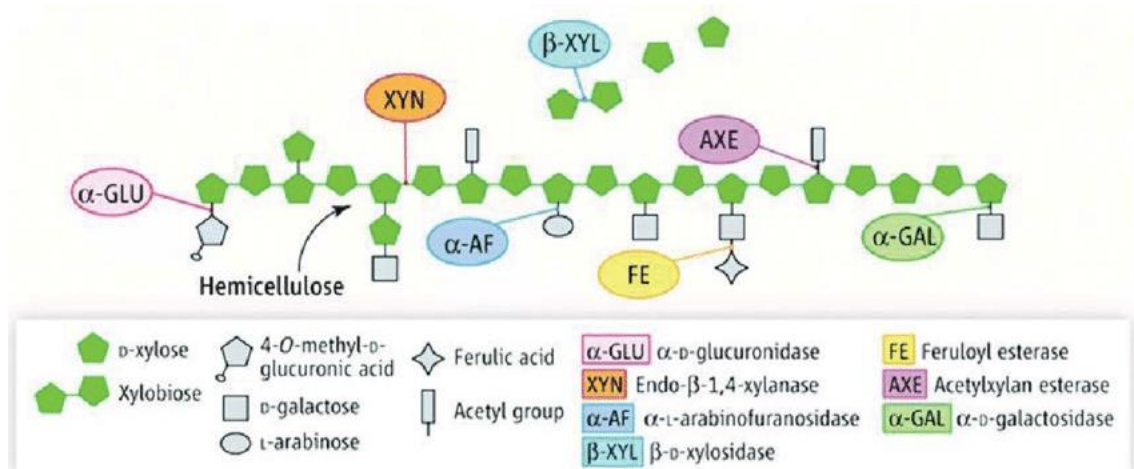
A cellulózbontó mikroorganizmusoknak az oldhatatlan cellulóz hidrolizálásához és metabolizálásához extracelluláris cellulázokat kell termelniük. A celluláz a glikozid hidrolázok csoportjába tartozik, a cellulóz β -1,4-glikozidos kötését hidrolizálja. A cellulázrendszerek összetevőit először katalitikus működésük módja alapján osztályozták, majd később szerkezeti tulajdonságaik alapján is. Három típusú enzimaktivitást különböztetünk meg, endoglükánázok, exoglükánázok és a β -glükozidázok. Az endoglükánázok a cellulóz amorf régiójához kötődnek, és véletlenszerűen kapcsolódnak polimer lánchoz, amelyen belül, a glükózok közötti β -1,4-glikozidos kötést bontja le. Az exoglükánázok a cellulóz poliszacharid lánc redukáló vagy nem redukáló végén folyamatosan működnek, glükózt vagy cellobiózt szabadítanak fel fő termékként. A β -glükozidázok a termékként megjelent celloextrineket és cellobiózt bontják le glükóz monomerekre (Lynd et al., 2002). A cellulóz enzimaktivitás bontásának folyamatát a 3. ábra mutatja be.

3. ábra: Cellulóz enzimatis bontása
(Forrás: Internet 9.)



A hemicellulázok heterogén felépítésű nagy kémiai diverzitást mutató biopolimerek. A hemicellulázok katalitikus moduljai vagy glikozid hidrolázok (GH-k), amelyek hidrolizálják a glikozidos kötések, vagy szénhidrát észterázok (CE-k), amelyek az acetát vagy ferulsav mellékcsoporthoz tartozó észterkötéseket hidrolizálják. A hemicellulóz lebontása számos kihívást jelenthet a mikroorganizmusok számára. A polimer nagy molekulatömegű vagy oldhatatlan, vagy a cellulózzal és a ligninnel társul. A hemicellulóz szerkezete is rendkívül változó, és bár a különböző kémiai kötések tény egésze korlátozott, különböző szerkezeti környezetekben jelen lehetnek. A hemicellulóz fő heteropolimerjei a xilán, mannán, galaktán és arabinán, illetve a D-xilóz, D-mannóz, D-galaktóz és L-arabinóz. A 4.ábrán látható a hemicellulóz enzimatis bontásának folyamata.

4. ábra: Hemicellulóz enzimatikus bontása
(Forrás: Internet 10.)



A leggyakoribb hemicellulóz a xilán, amely lineáris β -1,4-kötésű D-xilóz alapláncból áll. A xilanázok a xilóz egységekben lévő β -1,4-kötéseket hasítják, rövid xilo-oligoszacharidokra. A β -xilozidázok *exo*-típusú glikozidázok, amelyek xilooligoszacharidokat és xilobiózt hidrolizálnak egyetlen xilóz egységgé. A legtöbb ismert xilanáz a GH10-es és GH11-es családokhoz tartozik, és további xilanáz gén található a GH5-ös, GH8-as és GH43-as családok között. A xilanáz szubsztrátok esetén általában a 4-O-metil-glükuronsav és az arabinofuranóz oldalláncok jelenléte gátolja a xilán kötődését és hidrolízisét.

A β -mannanáz szintén β -1,4-kötéseket bont le mannán alapú hemicellulózokban, rövid manno-oligoszacharidokat szabadítanak fel. A β -mannanázok a GH5-ös és GH26-os családokba tartoznak, és további β -mannozidázok találhatóak a GH1, GH2 és GH5-ös családokban.

Az α -L-arabinofuranozidázok és az α -L-arabinanázok az arabinofuranozil tartalmú hemicellulózok hidrolizációjáért felelősek. A GH családokban is megtalálhatók GH3, GH43, GH51, GH54 és GH62. Ezek közül néhány enzim széles szubsztrátspecifitást mutat. Vannak, amelyek O-5, O-2 és/vagy O-3 csoportokhoz kapcsolódó arabinofuranozil csoportot hasítanak le, valamint vannak olyanok is, amelyek szubsztrátjai O-2 és O-3 duplán szubsztituált xilózt tartalmaznak.

Az α -D-glükuronidázok a glükuronoxilán és az arabinoglükurono-xilán polimerekben bontják a 4-O-metil-D-glükuronsav oldalláncának az α -1,2-glikozidos kötéseit. A GH67-es családban található meg.

A hemicellulóz bontásában részt vesznek az észterázok is, amelyek közül a legismertebbek az acetil észterázok és a feruloil észterázok. Az acetil észterázok hidrolizálják a xilóz oldalláncain lévő acetil csoportokat. A feruloil észterázok hidrolizálják az arabinóz egységek és a ferulsav közötti észter kötést. Ez az észter kötés részt vesz a xilán keresztkapcsolásában a ligninhez (Shallom és Shoham, 2003).

2.3. Baktériumok meghatározása és jellemzése

Antonie van Leeuwenhoek 1674-ben valószínűleg először figyelt meg protozoonokat, majd néhány évvel később baktériumokat is sikerült megvizsgálnia. Különböző forrásokból, esővízből, tavakból, emberi szájüregből és bélből is sikerült állati egysejtűeket izolálnia (Internet 2).

A prokarióta rendszertan elengedhetetlen eleme a törzs jellemzése. Mind az új keletű, mind a hagyományos módszerek fontos szerepet töltenek be egy törzs hovatartozásának megállapításához egy taxonon belül. Ismert taxon esetén egy tesztkészlet használatával meghatározható, hogy egy adott törzs tagja-e egy meglévő taxonnak. Olyan törzs vagy törzscsoport esetén, amelyeket újonnan fedeznek fel, teljesskörű jellemzést kell adni. Ennek a jellemzésnek a célja, hogy a „Bacteriological Code” (1990-es revízió) által meghatározott hierarchikus keretbe beilleszkedjen, valamint, hogy leírást adjon a taxonról.

A fenotípus jellemzői közé tartozik a sejttípusa, telep morfológiája, anyagcsere folyamatok és szubsztrát hasznosítása, enzimreakciók, valamint a növekedéshez szükséges környezeti tényezők, a pH és hőmérséklet optimum meghatározása. Azonban ez a meghatározás nem elegendő, ugyanis az organizmusok fenotipikus jellemzésének részét képezik a különböző kemotaxonómiai tulajdonságok is, melyet gyakran nem sorolnak a fenotípus paramétereire közé. Általában a sejt kémiai összetételét vizsgálják a kemotaxonómiai módszerek alkalmazása során.

A morfológiai, fiziológiai és biokémiai tulajdonságok vizsgálata a prokarióták jellemzésének legrégebbi eszközei. Ezen tulajdonságok vizsgálata során meg tudjuk határozni a

spóráképződést (amennyiben az adott faj esetében megfigyelhető), flagellumok elhelyezkedését, mozgékonyt, intracelluláris struktúrák felépítését fénymikroszkóp segítségével, a szilárd felületeken növekedő telepek alakját és méretét, valamint a kolónia formájának egyéb jellemzőit és a sejtek anyagának pigmentáltságát (Tindall et al., 2010).

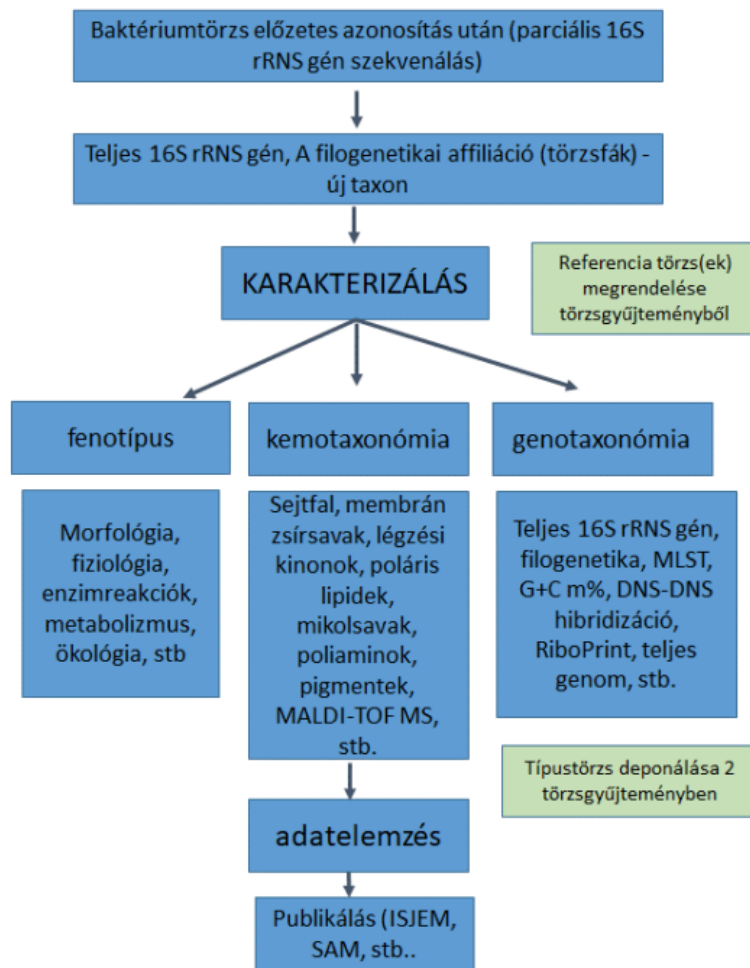
Kemotaxonomiai vizsgálatokkal az élőlények biokémiai tulajdonságait tudjuk meghatározni. A citoplazma membrán zsírsavak vizsgálatakor a szénlánc hosszúsága, a metilcsoport és a kettős kötés elhelyezkedése, illetve a foszfolipid-zsírsav összetétele mind a nemzetségre utaló tulajdonságok. A baktérium fajok megkülönböztethetőek a jelenlévő zsírsavak mennyisége alapján. A légzési kionok az elektrontranszportlánc mobilis elektron- és protonszállító molekulái, amelyek közül a menakinonoknak és ubikinonoknak van kemotaxonomiai szempontból jelentősége. A poláris lipidek a citoplazma membrán alkotói, amelyek azon molekulák heterogén csoportjait képviselik, amelyekben a lipidhez kovalens kötéssel egy hidrofíli csoport kapcsolódik. Ezek a molekulák szintén fontos taxonomiai jelentőséggel bírnak. A bakteriális sejtfal peptidoglikánból épül fel, melynek gerincét β -1,4-glikozidos kötések kapcsolják össze, és N-acetilglükózamin és N-acetil muraminsav egységekből állnak. A peptidoglikán a baktérium szerkezetében fontos szerepet tölt be, a sejfal merevsége, alakja és az ozmotikus nyomással való ellenállásért is felelős. Taxonomiai szempontból a legjelentősebb, a muraminsavról leló oligopeptid láncok aminosav összetétele. A MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time off Flight-Mass Spectrometry) tömegspektrometria során intakt-sejt elemzéseket alkalmaznak a faj, csoport vagy nemzetség azonosításához (Tóth E., 2020).

A taxonómia és az ökológia területén egyaránt kulcsfontosságú szerepet tölt be a 16S rRNS génszekvenciákban tárolt információ. A génszekvenciák vizsgálatának alapja, az izolátumok génjének bázissorrend meghatározása, mely feltétlenül szükséges az új fajok leírásához. A 16S rRNS génszekvencia segítségével történő prokarióta izolátumok meghatározásának folyamata több lépést is tartalmaz. Az első a hasonlóság keresés, amely a nyilvános adatbázisokban található nukleotid szekvenciák közötti hasonlóságot mutatja meg. A második az azonosított típus törzsekhez tartozó szekvenciák visszakeresését teszi lehetővé. A harmadik az izolátum és a filogenetikailag szomszédos típus törzsek közötti nukleotid hasonlósági értékeket számítja ki. A negyedik pedig a filogenetikai elemzést végzi el. Azonban ez az eljárás magas taxonomiai ismeretet igényel és időigényes folyamat (Chun et al., 2007). Ezért az új baktérium fajok típus törzsének szekvenciáját nyilvánosan hozzáférhető adatbázisba fel kell tölteni, ahol az új

szekvencia és az ahhoz kapcsolódó ismert fajok szekvenciájának összehasonlítása történik. Ha egy új baktérium faj típus törzsének a szekvenciája 97% vagy annál nagyobb százalékban mutat hasonlóságot az adatbázisban lévő ismert faj szekvenciájával akkor, további genotipikus és fenotipikus elemzésre van szükség, hogy a vizsgált törzset új fajként írassuk le. Gyakran előfordul, hogy a 16S rRNS génszekvenciák alacsony minőségűek a nyilvános adatbázisokban, ezért ellenőrzött adatbázisokat érdemes használni, mint a SILVA, a Living Tree Project és az EzTaxon. A genetikai analízis elengedhetetlen vizsgálatait a DNS G+C arányának meghatározása, a DNS-DNS (DDH) hibridizáció, teljes genom szekvenálások és a nukleinsav ujjlenyomat technika (Logan et al., 2009). A DNS G+C tartalmának meghatározása taxonómiai szempontból hasznos paraméter, és fontos előfeltétele a DNS-DNS hibridizációnak. A DNS G+C arány tartalma ha egyezik vagy nem szignifikáns mértékben tér el egymástól, akkor feltételezhető az azonosság, azonban vannak kivételek is, különösen az obligát intracelluláris paraziták (Tindall et al., 2010). A DNS-DNS hibridizáció nélkülözhetetlen a fajleírások esetében, ha az új és az azzal legközelebbi rokonságban álló baktérium faj 16S rRNS génszekvenciái 97% vagy annál nagyobb egyezést mutatnak. A hibrid DNS és homológ kettős szál közötti hibrid hőstabilitás (DTm) különbségek mérvadóak lehetnek taxonómiai szempontból, ezért fontos a DTm kiszámítása. A DNS-DNS hibridizációval kapott 70% vagy annál nagyobb érték esetén azonos fajról beszélhetnénk, azonban nem szabad mereven alkalmazni ezt a küszöbértéket, hiszen, ha két törzs közötti 70% alatti rokonsági értéket kapunk, akkor nem lehet automatikusan úgy értelmezni, hogy különböző fajokhoz tartoznak, illetve az ellenkező esetben kapott rokonsági érték, pedig önmagában nem tekinthető elegendő bizonyítéknak egy új faj elismeréséhez. A nukleinsav ujjlenyomat módszerének számos fajtája ismert, amplifikált fragment hossz polimorfizmus (AFLP), makro-restrikciós elemzésre pulzáló térerősségű gélelektroforézis (PFGE), random amplifikált polimorf DNS (RAPD), repetitív szekvencia alapú-PCR (REP-PCR) valamint ribotipizálás (Logan et al., 2009). Az AFLP technika előnye a többi nukleinsav ujjlenyomat módszerekkel szemben a teljes genom polimorfizmusának ellenőrzésére való képesség és a reprodukálhatósága. Az AFLP az összes DNS mintára alkalmazható, ezáltal egy univerzális DNS ujjlenyomatolási rendszert képez. Egy olyan molekuláris technika, amely a teljes genomikus DNS-ből a genomikus DNS emésztésének eredményeként keletkezett restrikciós fragmentumok szelektív amplifikációját használja. A DNS fragmentumok alapján, a molekuláris genetikai polimorfizmusok jelenlétére vagy hiányára következtethetünk, amelyeket a genomikus DNS restrikciója és amplifikációja után találunk (Paun és Schönswetter, 2012). A pulzáló mezővel történő gélelektroforézist (PFGE) a "harmadik generációs molekuláris megközelítésnek" tekintik a baktériumok

tipizálására. A harmadik generációs molekuláris analízishez agaróz gélelektroforézisre van szükség az enzimmel korlátozott plazmid vagy genom DNS-fragmentumok szétválasztásához. Mivel a baktérium genomok mérete 2-4 Mbp, a pulzáló elektroforézis lehetővé teszi a különböző méretű DNS-fragmentumok tisztább szétválasztását, ami jobb tipizálást és a vizsgált baktériumok klónjának hozzárendelését eredményezi (Neoh et al., 2019) (5.ábra).

5. ábra: Taxonómiai leírás folyamata
(Forrás: Tóth E., 2020)



3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A vizsgálataimat a Magyar Agár- és Élettudományi Egyetem Biomérnöki és Erjedéssipari Technológia Tanszékén végeztem.

Az általam vizsgált baktériumtörzs egy szelektív hulladékgyűjtő telepről származó, több mint egy évig 4 °C-on tárolt papírmintából került izolálásra korábban egy hallgatótársam (László, 2022) által, célzottan lignocellulóz-degradáló mikroorganizmusok azonosítása érdekében.

3.1 Fenotípusos karakterizálás

3.1.1 Táptalaj preferencia

Luria Bertani (LB) tápleves:

Az LB broth (Miller) a mikrobiológiai kutatásokban és laboratóriumi munkákban a leggyakrabban használt baktériumtenyésztő közeg. Az 1. táblázat szemlélteti a táptalaj elkészítéséhez szükséges adatokat. A nátrium-klorid a megfelelő izotóniás környezetet biztosítja a táptalajban, mennyisége a tenyészteni kívánt baktériumok érzékenységének függvényében változhat. A fehérje hidrolizátumként ismert tripton, a baktériumok növekedéséhez szükséges tápanyagokat, aminosavakat és peptideket szolgáltatja, míg az élesztőkivonat többnyire ismeretlen szerves vegyületeket tartalmaz. Az LB közeg pH-értéke általában 7,0 körül van, enyhén változhat a konkrét összetételtől és előkészítéstől függően (Ezraty et al., 2014).

1. Táblázat: LB broth (Miller) táptalaj elkészítéséhez szükséges komponensek és mennyiségük (Forrás: Internet 3.)

Reagensek	Koncentráció (g/l)
Tripton	10 g
Élesztőkivonat	5 g
Nátrium-klorid	10 g
Víz	1000 ml

Tryptic soy broth (kazeinpepton-szójapepton bouillon):

A tryptic soy broth (TSB) egy tápanyagban gazdag közeg, amely különösen az aerob és fakultatív anaerob baktériumok növekedését támogatja. A tripton, aminosavak és peptidok, míg a szójabab pepton fehérje forrás a baktériumok számára. A nátrium-klorid a táptalaj ozmolalitásának fenntartásában játszik szerepet. A glükóz, a baktériumok megfelelő növekedéséhez szükséges energiaforrást biztosítja. Az optimális pH fenntartása fontos a mikroorganizmusok szaporodásához, ezért a kétkomponensű kálium-foszfát pufferként szolgál a megfelelő pH-érték szabályozásában (Internet 4). A 2. táblázatban a táptalaj elkészítéséhez szükséges adatokat tüntettem fel.

2. Táblázat: Tryptic soy broth táptalaj elkészítéséhez szükséges komponensek és mennyiségük (Forrás: Internet 4.)

Reagensek	Koncentráció (g/l)
Tripton	17 g
Szójabab pepton	3 g
Nátrium-klorid	5 g
Glükóz	2,5 g
Kálium-foszfát	2,5 g
Víz	1000 ml

Agar-agar:

A bakteriológiai agar olyan speciális táptalaj, amelyet kisebb tengeri moszatok (vörös algák) sejtfalából nyernek ki. A „*Gracilaria*” és a „*Gelidiaceae*” fajok sejtfalából származik. Természetes formájában az agar két komponensből áll, agarózból és agaropektinből. Az agróz galaktóz és anhidro-galaktóz egységekből felépülő lineáris poliszacharid, amely egy gélképző komponens, az agaropektin pedig az agar elágazó, nem gélesedő összetevője (Internet 5). A 3. táblázatban feltüntettem a táptalaj összetevőit, százalékos arányban megadva.

3. Táblázat: A bakteriológiai agar összetevői százalékban megadva

(Forrás: Internet 5.)

Reagensek	Koncentráció (%)
Agaróz	70
Agaropektin	30

R2A agar:

Az R2A agart többnyire heterotróf mikroorganizmusok tenyésztésére használják, különösen azokra, amelyek a környezetben alacsonyabb tápanyagtartalmú környezetben élnek. Az R2A agar összetevői közé tartozik az élesztőkivonat, amely, mint vitamin forrás van jelen a tápközegben. A proteóz-pepton és kazein hidrolizátum aminosavakat, nitrogént, szénhidrogént és ásványi anyagokat szolgáltatnak a szervezetek növekedéséhez. A dikálium-hidrogén-foszfát a közeg ozmotikus egyensúlyának fenntartásáért felelős. A magnézium-szulfát a kétértékű kationok és szulfát forrása, míg a nátrium-piruvát növeli a stresszelt sejtek helyreállítását. Az agar a táptalaj szilárdításáért felelős (Internet 6). Az R2A táptalaj elkészítéséhez szükséges adatokat a 4. táblázat mutatja be.

4. Táblázat: Az R2A táptalaj elkészítéséhez szükséges adatok
(Forrás: Internet 6)

Komponensek	Koncentráció (g/l)
Élesztőkivonat	0,5 g
Proteóz pepton	0,5 g
Kazein hidrolizátum	0,5 g
Glükóz	0,5 g
Oldható keményítő	0,5 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	0,3 g
Magnézium-szulfát	0,024 g

Nátrium-piruvát	0,3 g
Agar-agar	15,0 g
Víz	1000 ml

A táptalajokat 120 °C-on 1,1 bar nyomáson 20 percig autoklávoztam.

3.1.2 Gram teszt

A Gram teszt egy gyorsan kivitelezhető teszt, amely 3%-os KOH oldat segítségével képes megkülönböztetni a Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium sejteket. A Gram-negatív sejtfalet képes a 3%-os KOH feloldani, míg a Gram-pozitív sejtfalet nem oldódik fel (Dash-és Payyappilli, 2016).

Teszt menete

1. Egy csepp 3%-os vizes KOH oldatot cseppentettem a tárgylemezre.
2. Steril oltókacs segítségével egy nagyobb mennyiséget emeltem ki a baktériumtenyészetből.
3. Majd alaposan összekevertem a sejteket és a KOH oldatot a tárgylemezen, kb 1,5 cm átmérőjű területen.
4. Ha a baktérium-KOH szuszpenzió jelentősen viszkózus vagy zselés állagot ér el, 5 és 60 másodperc között, akkor az izolátum Gram-negatív. Ha nincs zselésedés, akkor az izolátum Gram-pozitív. A viszkozitás meghatározásának legjobb módja, ha az oltókacs segítségével kb 1 cm-re felemeljük a kapott szuszpenziót a tárgylemeztől és megvizsgáljuk annak állagát (Buck, 1982).

3.1.3 Oxidáz teszt

Az oxidáz próbát a Diagnostics s.r.o. gyártói protokoll alapján végeztem. Az oxidáz teszt a baktériumok által termelt citokróm-oxidáz enzim jelenlétének kimutatására szolgál. Az enzim kimutatása színreakcióval történik: a tesztcsík reagens zónájában a tetrametil-fenilén diamin nevű mesterséges elektron-donor oxidálódik a citokróm-oxidáz enzim hatására, ennek

eredményeként kék szín jelenik meg. Ez a színváltozás jelzi, hogy a vizsgált baktérium citokróom-oxidáz pozitív, tehát rendelkezik az adott enzimmal.

Teszt menete

1. Egy csepp oxidáz reagenst (tetrametil-fenilén diamin) cseppenttem az oxidáz tesztsíkra.
2. Friss tenyészetből egy műanyag pálcával mintát vettem és a tesztsík reagens zónájába dörzsöltem.
3. Azonnal leolvastam a reakciót.

3.1.4 Kataláz teszt

Néhány baktériumcsoport képes kataláz enzimet termelni, amely elősegíti a sejtek méregtelenítését azáltal, hogy a hidrogén-peroxid (H_2O_2) baktériumölő hatását semlegesíti; a kataláz enzim katalizálja a H_2O_2 vízzé és oxigénné történő lebontását (Nicholls, 2012).

Teszt menete

1. A teszt során egy csepp 30%-os hidrogén-peroxidot cseppenttem a tárgylemezre.
2. Steril oltókacs segítségével a baktériumtenyészetből egy látható mennyiségű baktériumtelepet vettem ki.
3. A tárgylemezen a baktériumtelepet és a hidrogén-peroxidot összekevertem.
4. Az eredményt azonnal leolvastam.

3.1.5 Anyagcsere tesztek (API)

API 50 CH teszt

Az API 50 CH tesztet a Biomérieux REF 50 300 gyártói protokoll alapján végeztem.

Az AX-9 baktériumtörzs metabolikus képességeinek feltérképezése céljából az API 50 CH tesztrendszer alkalmaztam, amely lehetőséget biztosít a mikroorganizmus szénhidrát-anyagcserejének részletes elemzésére. A rendszer 49 különböző szénhidrát és poliszacharid fermentációs profilját vizsgálja színreakció alapján, kiegészítve egy negatív kontrollal. A vizsgálathoz a törzset először R2A táptalajon tenyésztettem, majd steril API CHB/E

médiumban szuszpendáltam, a gyártói protokoll szerint (Biomérieux). A mikrotálcák minden rekeszébe 50 µL szuszpenziót adagoltam, majd 30 °C-on, 48 órán keresztül inkubáltam. Ebben az esetben azért használtunk API 50 CHB/E médiumot, mert ez alkalmas a *Bacillus* és rokon nemek azonosítására. Az inkubáció alatt a fermentáció láthatóvá válik a csőben színváltozás által, amelyet az anaerob savtermelés vált ki és a táptalajban jelenlévő pH-indikátor mutat ki. Az API CHB/E tápközeg elkészítéséhez szükséges komponenseket és mennyiségeit az 5.táblázatban mutatom be.

5. Táblázat: Az API CHB/E tápközeg elkészítéséhez szükséges komponensek és mennyiségei (Forrás: Biomérieux)

Reagensek	Koncentráció (g/l)
Ammónium-szulfát	2 g
Élesztőkivonat	0,5 g
Tripton	1 g
Dinátrium-foszfát	3,22 g
Kálium-foszfát	0,12 g
Nyomelemek oldata	10 ml
Fenolvörös (indikátor)	0,17 g
Desztillált víz	1000 ml

3.2 Molekuláris mikrobiológiai módszerek

3.2.1 DNS izolálás

A DNS kivonást a Qiagen által forgalmazott DNeasy Ultra Clean Microbial Kittel végeztem a gyártói protokoll alapján.

1. A $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt AX-9 baktériumot tartalmazó biomasszából oltókacsnyi mennyiséget vettem ki, majd a centrifuga cső aljára helyeztem.
2. A biomasszát $300\text{ }\mu\text{l}$ PowerBead oldattal óvatosan szuszpendáltam, majd 2 ml -es PowerBead csőbe pipettáztam a szuszpenziót, majd vortexeltem.
3. Ezt követően hozzáadtam $50\text{ }\mu\text{l}$ Solution SL oldatot, ami SDS-t, egy anionos detergenst tartalmaz. Az SDS segíti a sejtlízist azáltal, hogy lebontja a zsírsavakat és lipideket a mikroorganizmusok sejtmembránjában.
4. Ezután vízszintesen rögzítettem a PowerBead csöveket a MO BIO Vortex csőtartójában és 10 percig maximális sebességgel vortexeltem.
5. A csöveket ezután $10\text{ }000\text{ g}$ sebességen 30 másodpercig szobahőmérsékleten centrifugáltam.
6. Ezután átpipettáztam kb. $300\text{-}350\text{ }\mu\text{l}$ felülúszót egy üres gyűjtőcsőbe.
7. $100\text{ }\mu\text{l}$ Solution IRS oldatot adtam a felülúszóhoz, majd a csöveket 5 másodpercig vortexeltem. Ezt követően $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 5 percig inkubáltam.
8. Következő lépésként a csöveket $10\text{ }000\text{ g}$ sebességen 1 percig szobahőmérsékleten centrifugáltam. A pellet kivételével a felülúszó teljes térfogatát egy tiszta 2 ml térfogatú gyűjtőcsőbe pipettáztam.
9. A felülúszóhoz $900\text{ }\mu\text{l}$ Solution SB oldatot adtam és 5 másodpercig vortexeltem.
10. $700\text{ }\mu\text{l}$ mennyiséget pipettáztam az MB Spincsőbe és $10\text{ }000\text{ g}$ sebességen 30 másodpercig szobahőmérsékleten centrifugáltam. Az átfolyt folyadékot kiöntöttem, és hozzáadtam a maradék felülúszót az MB Spincsőhöz és ismét centrifugáltam $10\text{ }000\text{ g}$ sebességen 30 másodpercig szobahőmérsékleten.
11. Ezután $300\text{ }\mu\text{l}$ Solution CB oldatot adtam hozzá és szobahőmérsékleten $10\text{ }000\text{ g}$ sebességen 30 másodpercig centrifugáltam.
12. A szűrőn átfolyt folyadékot kiöntöttem, majd további 1 percig centrifugáltam $10\text{ }000\text{ g}$ sebességen.
13. A szűrőt egy tiszta 2 ml térfogatú gyűjtőcsőbe helyeztem.
14. A fehér szűrőmembrán közepére $50\text{ }\mu\text{l}$ Solution EB oldatot pipettáztam.
15. Ezt követően $10\text{ }000\text{ g}$ sebességen 30 másodpercig szobahőmérsékleten centrifugáltam.

16. A szűrőt eltávolítottam a 2 ml-es gyűjtőcsőből. A gyűjtőcsőben lévő DNS már készen állt a további vizsgálatokhoz.

17. A DNS-t a fagyasztóba helyeztem $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on .

3.2.2 DNS koncentráció mérés

A DNS tisztítást követően, Thermo Scientific Nanodrop One^c spektrofotométer segítségével határoztam meg a DNS koncentrációját. A tisztított dsDNS minták koncentrációját 260 nm-es hullámhosszon történő abszorpcióval mérjük (Internet 7). Standard alkalmazások esetén az alsó 2,0 ng/μl, a felső detektálási határ pedig 27,5 ng/μl.

A nukleinsav mérésének menete:

1. A kezdőképernyőn kiválasztottam dsDNS-t.
2. Mérés előtt nullázást végeztem a műszervakkal.
3. Ezt követően 2 μl mintát pipettáztam a minta felviteli felületre és lemértem a mintát.
4. A minta koncentrációjának értékét ng/μl mennyiségben leolvastam.

3.2.3 16S rRNS gén amplifikáció (PCR)

A 16S rDNS amplifikációját PCR-rel végeztem el 50 μl-es végső reakciótérfogóban, a 6. táblázatban felsorolt komponensek felhasználásával. A PCR reakció egy kezdeti denaturációs lépéssel kezdődött, amely során a DNS-szálak szétválása érdekében a mintát $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 5 percig inkubáltam. Ezután a ciklusok 32 alkalommal ismétlődtek, ahol minden ciklus három fő lépésből állt. Először a DNS denaturációja történt meg $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (30 másodperc), majd a primerek kötődése a célszekvenciákhoz (anelláció) $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (30 másodperc), végső lépésként az új szálak meghosszabbítása történt a DNS-polimeráz által (extenzió) $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (1 perc). A ciklusok után egy végső extenziós lépés következett $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (10 perc).

6. Táblázat: A PCR reakcióhoz szükséges komponensek és mennyiségük (Forrás: saját munka)

Reagensek	Mennyiség
DNS templát	2 μ l
Forward primer (27F)	0,5 μ l
Reverse primer (1492R)	0,5 μ l
dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	10 μ l
10x PCR puffer	5 μ l
Taq DNS-polimeráz	0,2 μ l
Desztillált víz	31,8 μ l
Összesen	50 μl

3.2.4 Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis a nagyobb méretű DNS fragmentumok elválasztására és identifikálására alkalmas módszer. Az agaróz ismétlődő agarobióz (L- és D-galaktóz) alkotóegységekből áll. A hidrogén kötésekkel kapcsolódó agaróz polimerek térhálós gél szerkezetet képeznek, és annak pórusméretei határozzák meg a gél molekuláris tulajdonságait. A negatív töltésű DNS neutrális pH mellett az elektromos térben a pozitív töltésű anód felé vándorol. A DNS-nek egységes töltés és tömegaránya van, ezért a gélelektroforézis a DNS fragmenteket úgy választja el, hogy az általuk megtett távolság fordítottan arányos a molekulatömegük logaritmusával. A DNS mérete megszabja annak vándorlási sebességét, hiszen a kisebb DNS darabok gyorsabban haladnak át a gél pórusain, mint a nagyobbak. A DNS-hez aspecifikusan kötődő, interkaláló festékek alkalmazásával tesszük láthatóvá a DNS terméket UV fény alatt. Ilyen festék például az etídium-bromid, akridin-narancs és a sybr-green (Lee et al., 2012). A 7. táblázatban az agaróz gél készítéshez szükséges anyagok vannak feltüntetve.

7. Táblázat: Az agaróz gél készítés során felhasznált anyagok (Forrás: saját munka)

Reagensek	Mennyiség
1x TBE puffer (Tris-borát-EDTA puffer)	25 ml
Agaróz	0,25 g
SYBR Safe	2 μ l

TBE puffer elkészítése

1. Első lépésként elkészítettem a 10x TBE puffert 1000 ml térfogatra vonatkoztatva. Kimértem 800 ml desztillált vizet egy nagy főzőpohárba, majd az alábbi komponensek megfelelő mennyiségét hozzáadtam és oldódásig kevertem: 10,78 g TRIS bázis; 5,5 g bórsav és 0,74 g EDTA, majd 1000 ml desztillált vízzel töltöttem fel.
2. Használat előtt 1x koncentrációra hígítottam úgy, hogy a kapott 10x TBE pufferből 10 ml-t kimértem, majd 90 ml desztillált vizet adtam hozzá.
3. Utolsó lépésként 25 ml-t kimértem mérőhenger segítségével a kapott oldatból.

A gél készítés menete

1. Összeállítottam a futtató tálcát. A gélöntő formákat a helyükre illesztettem, majd a rögzítő csavar segítségével folyásmentesen lezártam és a tálcákat vízszintes felületre helyeztem, hogy a gél egyenletesen tudjon megszilárdulni. Végül mintafelvívó fésűket is elhelyeztem a tálcában, hogy a minta zsebek kialakuljanak.
2. Erlenmeyer lombikba 0,25 g agarózt mértem, majd hozzáadtam 25 ml 1x TBE puffert, ezt követően pedig mikrohullámú sütőben felmelegítettem gyakori kevergetés mellett annyira, hogy egy vízserű, áttetsző és agaróz-szemcséket nem tartalmazó oldatot kapjak.
3. Miután a gél lehült annyira, hogy kézzel fogható legyen az lombik, alaposan összekevertem, hozzáadtam a SYBR Safe DNS festéket majd buborékmentesen a futtató tálcába öntöttem. Az agaróz gél 20-30 perc alatt megszilárdult.

4. A gélt a futtató kádba helyeztem és öntöttem rá annyi 1x TBE puffert, hogy az kb. 1-2 mm-es rétegben fedje a gélt.
5. Óvatosan eltávolítottam a fésűt a gélből, úgy, hogy a minta felvitelére szolgáló zsebek ne sérüljenek.

Minták felvétele

1. Az ötödik zsebbe 5 µl DNS molekula markert vittem fel (SM0331).
2. A kapott mintákból 5 µl -t elkevertem 2 µl töltő pufferrel (30 v/v % glicerin, 0,25 mM brómfenolkék), majd az így kapott mintákat óvatosan a maradék zsebekbe rétegeztem a folyadék felszín alá.
3. Az elektroforézist 90 V feszültségen 20 percig végeztem.

A gél vizsgálata

A futtatást követően a gélt UV transzilluminátorral megvilágítva, a Slite 200W GelDoc típusú géldokumentációs rendszerrel rögzítettem a minták képét.

4 KÍSRELETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Fenotípusos karakterizálás

4.1.1 Táptalaj preferencia és telep morfológia vizsgálata

Kutatómunkám kezdetén az izolált baktériumot Nutrient, R2A, LB és TSA táptalajokra szélesztettem, majd vizsgáltam a telepképzésüket 30°C-on történő inkubálás során. 24 órás inkubációt követően még nem volt megfigyelhető jól körülhatárolható telepképződés, ami a feltételezhetően lassabb fajlagos szaporodási sebességre és hosszabb lag-fázisra utal. 48 órával a beoltás után azonban az R2A táptalajon már jól látható szabályos szélű, nyálkás textúrájú, sárga pigmentációjú telepek jelentek meg, amelyekhez poliszacharid alapú tokképződés is társult, ami gyakran megfigyelhető jellemző egyes Gram-pozitív, biofilmképző baktériumoknál (Sutherland, 2001). A tenyésztés eredményeit a 6. ábra szemlélteti, amely az első és második napon megjelenő kolóniák fejlődését mutatja be. A különböző táptalajokon megfigyelt növekedési mintázat alapján az AX-9 baktérium az R2A táptalajon mutatta a legaktívabb kolóniaképzést. A TSA (Tryptic Soy Agar) táptalajon a növekedés jelentősen csökkent, ugyanakkor a telepek morfológiája megmaradt: sárga, sima felszínű, kisebb átmérőjű, mint R2A-n (Atlas, 2010). A Nutrient Agar szintén sárga, szabályos szélű telepek képződését eredményezte, azonban a növekedési intenzitás közepesnek bizonyult. Érdekes, hogy LB táptalajon az AX-9 telepei narancssárga pigmentációt mutattak, amely flavonoidok jelenlétére utalhat a táptalaj összetételében, vagy pigmentképzési válaszreakcióra az eltérő szénforrásokra (Sutthiwong et al., 2014). Az R2A táptalaj cellulózbontó baktériumok számára különösen kedvező környezetet biztosít, mivel a tápanyagok alacsonyabb koncentrációja csökkenti a versenyképességből adódó szelektív nyomást, így a lassabban növekvő, szervesanyag-bontó baktériumok, mint az AX-9, hatékonyabban érvényesülhetnek (Reasoner és Geldreich, 1985). Ezenkívül a cellulózbontás enzimikus hatékonysága erősen pH-függő; az AX-9 esetében is feltételezhető, hogy az optimális bontási aktivitás csak bizonyos pH-tartományban érvényesül (Lynd et al., 2002). A kapott eredményeket összevetve a szakirodalomban leírtakkal: a *Microbacterium* sp. Leaf288 esetében a legjobb növekedést a PP-medium (DSMZ Medium 513) biztosította 28 °C-on történő inkubálás mellett (Internet 11). Bár a telepmorfológiáról részletes leírás nem áll rendelkezésre erre a törzsre vonatkozóan, a *Microbacterium* nemzetség

4.1.2 Hőmérséklet optimum meghatározás

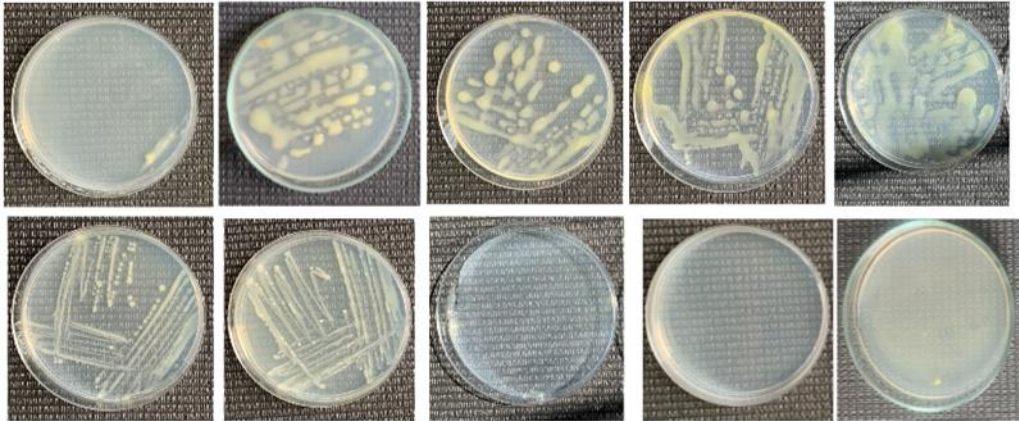
Az AX-9 törzs növekedési hőmérséklet-optimumának meghatározása céljából a baktériumot 5 és 50 °C közötti hőmérséklettartományban vizsgáltam, 5 °C-os lépésközökkel, három párhuzamos leoltással, R2A agaron végzett inkubáció mellett. Az R2A táptalaj alkalmazását az indokolta, hogy ezen a táptalajon korábban a legintenzívebb növekedést mutatta az AX-9 izolátum. A különböző hőmérsékleten kapott eredményeket a 8.táblázat és a 7.ábra szemlélteti.

8. Táblázat: A különböző hőmérsékleten (5-50 °C) kapott értékek, (+) szaporodott a baktérium, (-) nem szaporodott a baktérium (Forrás: Saját munka)

Hőmérséklet (°C)	Szaporodás
5	-
10	+
15	+
20	+
25	+
30	+
35	+
40	-
45	-
50	-

Az eredmények alapján az AX-9 baktériumtörzs 10–35 °C között képes volt szaporodni, míg 40 °C felett már nem mutatott növekedést. A legintenzívebb növekedést 10 °C-on figyeltem meg, ami arra utal, hogy a törzs hidegtűrő (pszichrotróf) tulajdonságokat mutat, vagy legalábbis alacsony hőmérsékleten is jól adaptálódik (Madigan et al., 2021). A 16S rRNS géalapú filogenetikai vizsgálatok alapján az AX-9 legközelebbi rokonának a *Microbacterium sp.* Leaf288 törzs tekinthető. A BacDive adatbázis adatai szerint ez a törzs a legintenzívebb növekedést 28 °C-on, PP (DSMZ Medium 513) táptalajon mutatja, ami egyértelműen a mezofil tartományba esik. A Leaf288 törzs hőmérsékleti optimuma tehát jól elkülöníthető az AX-9 törzstől, amely alacsonyabb hőmérsékleten is hatékony növekedést mutatott.

7. ábra: Az AX-9 törzs R2A táptalajon készített tenyészetek hőmérséklet optimum meghatározása (5,10,15,20,25,30,35,40,45,50 °C) (Forrás: Saját munka)



4.1.3 API 50 CH teszt

Az AX-9 törzs szénhidrát-anyagcseréjének részletes elemzését API 50 CH teszttel végeztem. Az API 50 CH kittel végzett vizsgálat során megfigyeltem az AX-9 által hasznosított szénhidrátokat, amelyet színreakció kísért (8.ábra). A hasznosított szénhidrátok esetén, az eredeti piros színű oldat sárgára változott a sav képződés miatt, míg az eszkulin bontás esetében fekete színreakció lépett fel. A vizsgálat eredményei alapján az AX-9 törzs többféle monoszacharidot, diszacharidot és néhány komplexebb szénhidrátot is képes volt fermentálni (9.táblázat). Az eredmények arra utalnak, hogy a törzs rendelkezik aktív szénhidráttranszport- és -lebontó útvonalakkal, többek között a L-arabinóz, D-glükóz, D-fruktóz, D-maltóz, D-cellobióz és eszkulin hasznosítása révén.

8. ábra: Az API 50 CH teszt 0 és 48 óra után (Forrás: Saját munka)



9. Táblázat: Az AX-9 baktérium által hasznosított és nem hasznosított szénhidrátok 48 óra eltelte után. A hasznosított szénhidrátok (+), a nem hasznosított szénhidrátok (-) jelöléssel vannak ellátva

(Forrás: Saját munka, Biomérieux protokoll alapján)

API 50 CH					
0. Kontroll	-	18. D-mannit	+	34. D-melezitóz	-
1. Glicerín	-	19. D-szorbitol	-	35. D-raffinóz	+
2. Eritrit	-	20. metil- α -D-mannopiranozid	-	36. Keményítő	-
3. D-arabinóz	-	21. Metil- α -D-glukopiranozid	-	37. Glikogén	-
4. L-arabinóz	+	22. N-acetil-glukózamin	-	38. Xilit	-
5. D-ribóz	-	23. Amigdalín	+	39. Gentiobióz	-
6. D-xilóz	+	24. Arbutin	+	40. D-turanóz	+
7. L-xilóz	-	25. Eszkulin	+	41. D-lixóz	-
8. D-adonit	-	26. Szalicin	+	42. D-tagatóz	-
9. metil- β -D-xilopiranozid	-	27. D-cellobióz	+	43. D-fukóz	-
10. D-galaktóz	+	28. D-maltóz	+	44. L-fukóz	-
11. D-glukóz	+	29. D-laktóz	+	45. D-arabit	-
12. D-fruktóz	+	30. D-melibióz	-	46. L-arabit	+
13. D-mannóz	+	31. D-szacharóz	-	47. Kálium-glukonát	-
14. L-szorbóz	-	32. D-trehalóz	-	48. Kálium-2-ketoglukonát	-
15. L-ramnóz	+	33. Inulin	+	49. Kálium-5-ketoglukonát	-
16. Dulcit	-				
17. Inozit	-				

4.1.4 Oxidáz teszt

Az oxidáz teszt során a tesztsík reagens zónájában megjelenő kék szín a citokróm-c-oxidáz enzim jelenlétére utal a vizsgált baktériumtörzsben. A vizsgálat során az általam elemzett baktérium esetében a reagens zónában színváltozás nem volt megfigyelhető, így a teszt eredménye negatívnak bizonyult, ami a citokróm-c-oxidáz enzim hiányára utal. Az oxidáz teszt eredménye a 9. ábrán figyelhető meg.

9. ábra: Negatív oxidáz teszt eredménye

(Forrás: Saját munka)



4.1.5 Gram teszt

A Gram teszt a Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium sejtek megkülönböztetésére szolgál. A KOH-próba során a Gram-negatív baktériumsejtek sejtfa feloldódik a kálium-hidroxid oldatban, ennek következtében viszkózus, nyúlós, zselészerű szuszpenzió képződik, amelyből az oltókacs segítségével szál húzható. Ezzel szemben Gram-pozitív baktériumok esetén a sejtfa nem oldódik, így nem alakul ki ilyen állagú szuszpenzió, és szálképződés sem figyelhető meg. Az általam vizsgált baktérium nem mutatott pozitív reakciót a KOH-oldatra, tehát a próba eredménye negatív volt, amely Gram-pozitív sejtfa szerkezetre utal. A vizsgálat eredménye a 10. ábrán látható.

10. ábra: Negatív Gram teszt eredménye

(Forrás: Saját munka)



4.1.6 Kataláz teszt

A kataláz teszt célja a baktériumok kataláz enzimtermelő képességének kimutatása. A kataláz enzim jelenlétére a hidrogén-peroxid hozzáadása után megjelenő oxigéngáz buborékok utalnak, amelyek a H_2O_2 bontása során keletkeznek. Pozitív reakció esetén intenzív buborékképződés figyelhető meg, míg negatív eredmény esetén nem történik észlelhető változás. A vizsgálat során az általam tanulmányozott baktériumtörzs pozitív kataláz teszteredményt mutatott, tehát képes a kataláz enzim szintézisére. A teszt eredménye a 11. ábrán látható.

11. ábra: Pozitív kataláz teszt eredménye

(Forrás: Saját munka)



4.2 Molekuláris mikrobiológiai módszerek

4.2.1 Az izolált DNS NanoDroppal történő vizsgálata

Az izolátumból a DNS kivonást a Qiagen által forgalmazott DNeasy Ultra Clean Microbial Kittel végeztem a gyártói protokoll alapján.

Ezt követően a DNS-minta koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel vizsgáltam a dsDNA (double-stranded DNA) alkalmazás használatával, amely automatikusan megjeleníti a minták UV-abszorbancia spektrumát, valamint kiszámítja a koncentrációt és a tisztasági arányokat (Internet 7). Az eredményeket a 10. táblázat foglalja össze.

10. Táblázat: AX-9 nukleinsav koncentrációja és tisztasági mutatói

(Forrás: Saját munka)

#	Nukleinsav koncentráció ng/ μ l	Minőségi mutató A260/A280 arány	Minőségi mutató A260/A230 arány
1	102,4	1,87	1,99

A mérés alapján a minta nukleinsav-koncentrációja 102,4 ng/ μ L volt, amit a 260 nm hullámhosszon mért abszorbancia alapján határozott meg a készülék. A DNS tisztaságát jellemző A260/A280 arány 1,87 volt, amely nagyon közel áll a kettős szálú DNS-re jellemző ideális értékhez (~1,8), így a minta gyakorlatilag fehérje- és fenolszennyezéstől mentesnek tekinthető (Wilfinger et al., 1997). Az A260/A230 arány 1,99-et mutatott, amely az elfogadott 1,8–2,2-es tartományba esik. Ez arra utal, hogy a minta nem tartalmaz jelentősebb mennyiségű olyan szennyező anyagokat, mint például szénhidrátok, fenolok, guanidinium sók vagy egyéb szerves oldószerek, amelyek az A230 nm-nél mutatnak abszorbanciát (Manchester, 1996). Ezen paraméterek alapján a DNS-minta jó minőségűnek és tisztának minősíthető, amely alkalmas további molekuláris biológiai vizsgálatokra. A vizsgált DNS-ről kapott eredményt a 12. ábra mutatja be.

12. ábra: Az AX-9 törzsből izolált DNS UV-spektruma és tisztasági mutatói NanoDrop méréssel

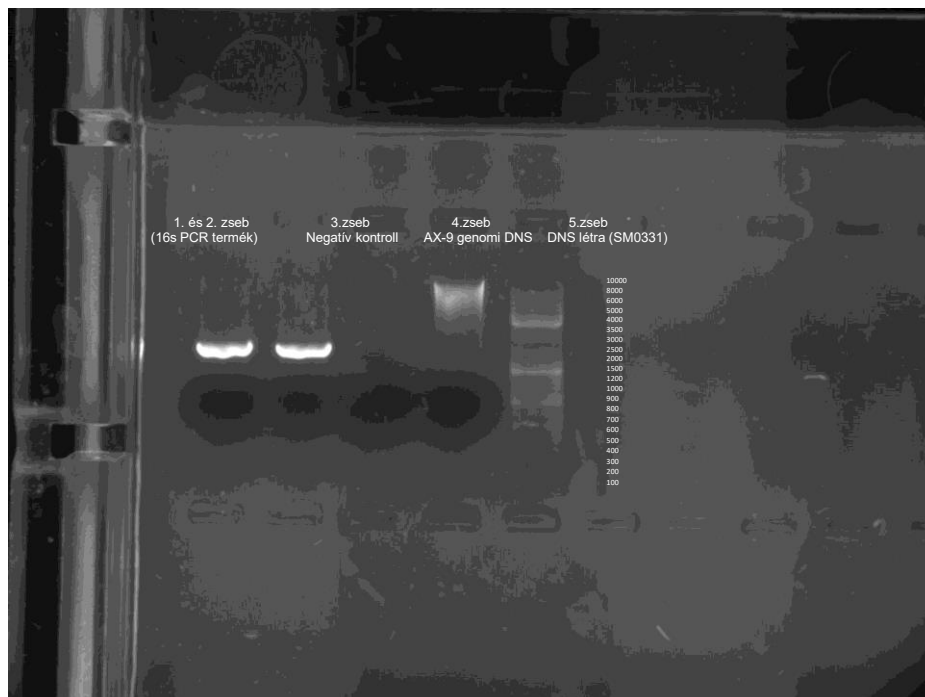
(Forrás: Saját munka)



4.2.2 A gél vizsgálata

Az UV fény hatására láthatóvá válnak a gélben lévő DNS zsebek. A molekulatömeget úgy tudjuk meghatározni, hogy a DNS mintákkal párhuzamosan, egy ismert hosszúságú DNS-töredékekből álló kalibrációs mintát futtatunk, így a DNS minták hosszát a „DNS-létra” hosszához tudjuk viszonyítani. Az ötödik zsebben található a 21 fragmentumból álló SM0331 DNS létra. A fragmentumok méretei 100 bp-től 10000 bp-ig terjednek. A létra három kiemelt referenciasávot tartalmaz: 600 bp, 1000 bp és 3500 bp. Az első és a második mintában a 16s gén PCR termék található, amelyek a DNS létra 1500 bp és 2000 bp fragmentjei közé esnek. A 16s gén PCR termékek hossza összhangban van a gén várt hosszával, amely tipikusan kb.1465 bp baktériumok esetében. Megállapítható, hogy szennyezettségtől mentes, éles sávok láthatók mindkét esetben. A harmadik zsebben a negatív kontroll található, nincs szennyezettségre utaló jel. A negyedik zseb tartalmazza a törzsünkben izolált AX-9 genomi DNS-t, amelynek mérete genomi DNS-re jellemzően nagy, és azt mutatja, hogy a DNS nem fragmentálódott. A kapott gélfotót a 13.ábra mutatja be.

13. ábra: A kapott gélfotó az AX-9 16s gén PCR termékekről, valamint a genomi a DNS-ről
(Forrás: Saját munka)



Szakkolgozat - 1

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Következtetések

Kutatásom célja egy eddig nem jellemzett baktériumfajhoz tartozó törzs részletes fenotípusos és molekuláris szintű jellemzése volt. A vizsgálatok során egy korábban izolált, lignocellulóz-bontó képességgel rendelkező baktériumtörzs környezeti optimumait, morfológiai jellemzőit, valamint anyagcsere-aktivitását elemeztem.

Molekuláris biológiai módszerek közül polimeráz láncreakciót (PCR) és gélelektroforézist alkalmaztam a 16S riboszomális RNS gén amplifikálására, amely előzetes alapot nyújtott a törzs filogenetikai azonosításához.

Javaslatok

- A baktérium faj jellemzése alapokat szolgáltathat olyan későbbi vizsgálatokhoz, melyek a baktérium ipari felhasználására, valamint kedvező tulajdonságainak alkalmazásaira irányulnak. A felhasználási lehetőségek feltérképezésével képet kaphatunk arról, hogy mely iparágak, milyen célra tudnák a saját javukra fordítani a mikroorganizmus pozitív tulajdonságait
- A baktérium faj pozitív tulajdonságai mellett javaslom a kedvezőtlen vagy káros tulajdonságainak vizsgálatát, valamint az ipari felhasználás esetében a baktérium használatával járó veszélyforrások analizálását
- Az új faj genetikai feltérképezésével lehetőség nyílt a hasznos tulajdonságainak átvitelére más mikroorganizmusokba különböző géntörzsi technikák segítségével. Így megvalósítva egy biztonságosan felhasználható mikroorganizmust mely rendelkezik olyan kedvező tulajdonsággal, mint például a cellulózbontás.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A lignocellulóz biomassza a legmeghatározóbb mennyiségben előforduló megújuló nyersanyag forrás, amely ligninből, cellulózból és hemicellulózból épül fel. A folyamatosan újratermelődő biomassza számos előnnyel rendelkezik a fosszilis energiaforrásokkal szemben. A hulladékként jelentkező növényi biomassza felhasználásának egyik lehetséges iránya a lignocellulóz bontására képes mikroorganizmusok alkalmazása különböző biotechnológiai folyamatok során. Napjainkban egyre elterjedtebb a bioüzemanyagok és bioműanyagok, illetve különböző ipari termékek előállítására a biomassza forrásokból. A megfelelő enzimrendszerrel rendelkező mikroorganizmusok alkalmazása eredményt hozhat az ilyen termékek gyártása során, így az új mikroorganizmusok jellemzése és leírása szélesítheti azt az alapot, amire a gyakorlati megoldásokat építeni lehet. A kutatásom célja a hulladékként jelentkező növényi biomassza vagy melléktermék hasznosítása volt.

A munkám során egy újonnan izolált, eddig ismeretlen baktérium fajhoz tartozó lignocellulóz bontó törzset jellemeztem, és meghatároztam alapvető tulajdonságait. A taxonómia és az ökológia területén egyaránt kulcsfontosságú szerepet tölt be a 16S rRNS génszekvenciákban tárolt információ. A génszekvenciák vizsgálatának alapja, az izolátumok génjének bázissorrend meghatározása, hiszen feltétlenül szükséges az új fajok leírásához. Ha egy új baktérium faj típus törzsének a szekvenciája 97% vagy annál nagyobb százalékban mutat hasonlóságot az adatbázisban lévő ismert faj szekvenciájával akkor, további genotipikus és fenotipikus elemzésre van szükség, hogy a vizsgált törzset új fajként írassuk le. Az AX9 jelű izolátumot egy hallgatótársam nemcsak izolálta, hanem annak részleges szekvenálását is elvégezte. A 16S rRNS gén részleges szekvenanciaanalízise alapján az izolátum a *Microbacterium* nemzetségbe sorolható, és a 97%-os szekvenanciahomológia egy eddig nem leírt faj jelenlétére utal, így az AX9 potenciálisan új faj jelöltnek tekinthető. A taxonómiai besorolás pontosítása érdekében további vizsgálatokat végeztem, amelyek során a PCR-amplifikáció és agaróz gélelektroforézis sikeresen megvalósult. Bár a 16S rRNS gén teljes szekvenciájának meghatározása a megalapozott filogenetikai besoroláshoz elengedhetetlen lenne, ez jelenleg csak mint potenciális lehetőség áll rendelkezésre.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., Šantek, B. (2018): Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng. Life Sci.* 18, 768–778. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
2. Anwar, Z., Gulfraz, M., Irshad, M. (2014): Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 7, 163–173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
3. Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press.
4. Béguin, P., Aubert, J.P. (1994): The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25–58. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x>
5. Brown, M. R., Saxena, I.M., Kudlicka, K. (1996): Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends Plant Sci.* 1, 149–156. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80050-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80050-1)
6. Brijwani, K., Rigdon, A., Vadlani, P.V. (2010): Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. *Enzyme Res.* 2010, 149748. DOI: <https://doi.org/10.4061/2010/149748>
7. Buck J.D. (1982): Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria
8. Chukwuma, O., Rafatullah, M., Tajarudin, H., Ismail, N. (2020): Lignocellulolytic Enzymes in Biotechnological and Industrial Processes: A Review. *Sustainability* 12, 7282. DOI: <https://doi.org/10.3390/su12187282>
9. Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.-W. (2007): EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2259–2261. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64915-0>
10. Dash, C., Payyappilli, R. (2016): KOH string and Vancomycin susceptibility test as an alternative method to Gram staining *Journal of International Medicine and Dentistry* 3(2):88-90 DOI:[10.18320/JIMD/201603.0288](https://doi.org/10.18320/JIMD/201603.0288)
11. Ezraty, B., Henry, C., Hérisse, M., Denamur, E., Barras, F. (2014): Commercial Lysogeny Broth culture media and oxidative stress: A cautious tale DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.010>

12. Hammel, K.E., Jensen, K.A., Mozuch, M.D., Landucci, L.L., Tien, M., Pease, E.A. (1993): Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 268, 12274–12281.
13. Henrissat, B., Davies, G. (1997): Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 637–644. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(97\)80072-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80072-3)
14. Kämpfer, P. (2012). Genus *Microbacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 5, pp. 983–1003). Springer.
15. Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A. (2011): Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Res.* 2011, 1–10. DOI: <https://doi.org/10.4061/2011/280696>
16. Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C., Kim, Y. H. (2012): Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments
17. László D. (2022): Lignocellulóz-bontó baktériumok izolálása és jellemzése papírhulladékokból
18. Logan, N.A., Berge, O., Bishop, A.H., Busse, H.-J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M.S., Seldin, L., Ventosa, A. (2009): Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2114–2121. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013649-0>
19. Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002): Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 66, 506–577, table of contents. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
20. Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms* (16th ed.). Pearson.
21. Makk Á. N. (2017): Lignocellulóz rendszerek anaerob fermentációjának vizsgálata.
22. Manchester, K. L. (1996). Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques*, 20(6), 968–970.
23. Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F., Ferreira Neila, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J. (2005): Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 8, 195–204.
24. Mujtaba, M., Fernandes Fraceto, L., Fazeli, M., Mukherjee, S., Savassa, S.M., Araujo de Medeiros, G., do Espírito Santo Pereira, A., Mancini, S.D., Lipponen, J., Vilaplana, F. (2023): Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review

- with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. *J. Clean. Prod.* 402, 136815.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136815>
25. Neoh, H., Tan, X.-E., Sapri, H.F., Tan, T.L. (2019): Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infect. Genet. Evol.* 74, 103935.
 26. Nicholls, P. (2012). Classical catalase: ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 95–101. DOI <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.014> DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>
 27. Nyitray L. (szerk.) Alexa A., Fodor K., Garai Á., Glatz G., Radnai L., Rapali P., Szakács D., Várkuti B., Zeke A. (2013): Géntechnológia és fehérjemérnökség. ELTE TTK Biológiai Intézet, Budapest
 28. Paun, O., Schönswetter, P. (2012): Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic and epigenetic studies. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 862, 75–87. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-609-8_7
 29. Raud, M., Kikas, T., Sippula, O., Shurpali, N.J. (2019): Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 111, 44–56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.05.020>
 30. Reiner Karen (2010): Catalase Test Protocol. American Society For Microbiology.
 31. Reiss, R., Ihssen, J., Thöny-Meyer, L. (2011): *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnol.* 11, 9. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-9>
 32. Reasoner, D. J., Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 1–7.
 33. Réczey I. Csorba K. (2012): Lignocellulózok biofinomítása és konverziója második generációs üzemanyagalkohollá.
 34. Singh, N. , Reeta Rani, S. , Poonam, S. N. , Cheng-Di, D. , Anil Kumar, P. , Munish, P. (2022): Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126415>
 35. Spigaglia P., Mastrantonio Paola (2003): Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. DOI: 10.1128/JCM.41.6.2454-2457.2003

36. Shallom, D., Shoham, Y. (2003): Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 219–228. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0)
37. Sista Kameshwar, A.K., Qin, W. (2018): Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. *Mycology* 9, 93–105. DOI: <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1419296>
38. Smith, M.D. (2019): An Abbreviated Historical and Structural Introduction to Lignocellulose, in: Smith, M.D. (Ed.), ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1021/bk-2019-1338.ch001>
39. Sutthiwong, N., et al. (2014). Pigment production by newly isolated strains of *Monascus purpureus* on solid rice medium. *Food Chemistry*, 164, 361–368.
40. Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3–9.
41. Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010): Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 249–266. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
42. Tóth Á. (2016): Lignocellulóz bontó mikrobák izolálása és enzimeik biotechnológiai alkalmazása. DOI: <https://doi.org/10.14751/SZIE.2016.035>
43. Tóth E. (2020): Új prokarióta taxonok leírása és módszerfejlesztések alkalmazott mikrobiológiai és mikrobiális ökológiai kutatások során.
44. Tushik, S., Lee, K.-T., Lee, J., Kim, K. (2017): Functional Applications of Lignocellulolytic Enzymes in the Fruit and Vegetable Processing Industries. *J. Food Sci.* 82, 585–593. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13636>
45. Verma, S.R., Dwivedi, U.N. (2014): Lignin genetic engineering for improvement of wood quality: Applications in paper and textile industries, fodder and bioenergy production. *South Afr. J. Bot.* 91, 107–125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.01.002>
46. Williams, J G, Kubelik, A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. DOI: 10.1093/nar/18.22.6531
47. Wyman, C.E., Decker, S.R., Himmel, M.E., Brady, J.W., Skopec, C.E., Viikari, L. (2005): Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose.
48. Wilfinger, W. W., Mackey, K. (1997). RNA integrity determination using RNase protection assay. *BioTechniques*, 22(3), 556–563.
49. Zsoldiné Urbán E. (2019): Klinikailag fontos humán patogén anaerob baktériumok diagnosztikája és antibiotikum rezisztencia vizsgálata.

Internetes hivatkozások

Megtekintés dátuma: 2024 január – 2025 április

1. Internet 1: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#Overview
2. Internet 2: <https://www.britannica.com/biography/Antonie-van-Leeuwenhoek>
3. Internet 3: <https://www.laboratorynotes.com/preparation-of-luria-bertani-lb-miller-broth/>
4. Internet 4: https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium545.pdf
5. Internet 5: <https://microbeonline.com/agar-properties-uses/>
6. Internet 6: https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_R2A-gelose_EN_030718_88914bf3e081bd33cf8da6d338544a1f.pdf
7. Internet 7: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf>
8. Internet 8: https://www.researchgate.net/figure/Classification-of-lignin-degrading-enzymes-and-their-schematic-representations_fig1_369500623
9. Internet 9: https://www.researchgate.net/figure/Enzymes-involved-in-cellulose-degradation_fig4_342285847
10. Internet 10: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-model-of-enzymatic-hemicellulose-degradation_fig5_316315642
11. Internet 11: [BacDive – The Bacterial Diversity Metadatabase. Microbacterium sp. Leaf288 adatlap. \(2024\). https://bacdiverse.dsmz.de/strain/131802](https://bacdiverse.dsmz.de/strain/131802)

Szaki

ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

Ábrajegyzék

1. ÁBRA: A LIGNOCELLULÓZ SZERKEZETI FELÉPÍTÉSE (FORRÁS: MAKK, 2017)	3
2. ÁBRA: LIGNINBONTÓ ENZIMEK (FORRÁS: INTERNET 8.)	8
3. ÁBRA: CELLULÓZ ENZIMATIKUS BONTÁSA (FORRÁS: INTERNET 9.)	10
4. ÁBRA: HEMICELLULÓZ ENZIMATIKUS BONTÁSA (FORRÁS: INTERNET 10.)	11
5. ÁBRA: TAXONÓMIAI LEÍRÁS FOLYAMATA (FORRÁS: TÓTH E., 2020)	15
6. ÁBRA: AZ AX-9 TÖRZS TENYÉSZETEK KÜLÖNBÖZŐ TÁPKÖZEGEKEN AZ ELSŐ (A) ÉS A MÁSODIK (B) NAP (FORRÁS: SAJÁT MUNKA)	28
7. ÁBRA: AZ AX-9 TÖRZS R2A TÁPTALAJON KÉSZÍTETT TENYÉSZETEK HŐMÉRSÉKLET OPTIMUM MEGHATÁROZÁSA (5,10,15,20,25,30,35,40,45,50 °C) (FORRÁS: SAJÁT MUNKA)	30
8. ÁBRA: AZ API 50 CH TESZT 0 ÉS 48 ÓRA UTÁN	30
9. ÁBRA: NEGATÍV OXIDÁZ TESZT EREDMÉNYE.....	32
10. ÁBRA: NEGATÍV GRAM TESZT EREDMÉNYE.....	33
11. ÁBRA: POZITÍV KATALÁZ TESZT EREDMÉNYE	33
12. ÁBRA: AZ AX-9 TÖRZSBŐL IZOLÁLT DNS UV-SPEKTRUMA ÉS TISZTASÁGI MUTATÓI NANODROP MÉRÉssel (FORRÁS: SAJÁT MUNKA).....	35
13. ÁBRA: A KAPOTT GÉLFOTÓ AZ AX-9 16S GÉN PCR TERMÉKEKRŐL, VALAMINT A GENOMI A DNS-RŐL (FORRÁS: SAJÁT MUNKA).....	36

Táblázatjegyzék

1. TÁBLÁZAT: LB BROTH (MILLER) TÁPTALAJ ELKÉSZÍTÉSÉHEZ SZÜKSÉGES KOMPONENSEK ÉS MENNYISÉGÜK (FORRÁS: INTERNET 3.).....	16
2. TÁBLÁZAT: TRYPTIC SOY BROTH TÁPTALAJ ELKÉSZÍTÉSÉHEZ SZÜKSÉGES KOMPONENSEK ÉS MENNYISÉGÜK (FORRÁS: INTERNET 4.).....	17
3. TÁBLÁZAT: A BAKTERIOLÓGIAI AGAR ÖSSZETEVŐI SZÁZALÉKBAN MEGADVA	18
4. TÁBLÁZAT: AZ R2A TÁPTALAJ ELKÉSZÍTÉSÉHEZ SZÜKSÉGES ADATOK (FORRÁS: INTERNET 6).....	18
5. TÁBLÁZAT: AZ API CHB/E TÁPKÖZEG ELKÉSZÍTÉSÉHEZ SZÜKSÉGES KOMPONENSEK ÉS MENNYISÉGEI (FORRÁS: BIOMÉRIEUX)	21
6. TÁBLÁZAT: A PCR REAKCIÓHOZ SZÜKSÉGES KOMPONENSEK ÉS MENNYISÉGÜK (FORRÁS: SAJÁT MUNKA).....	24
7. TÁBLÁZAT: AZ AGARÓZ GÉL KÉSZÍTÉS SORÁN FELHASZNÁLT ANYAGOK (FORRÁS: SAJÁT MUNKA).....	25
8. TÁBLÁZAT: A KÜLÖNBÖZŐ HŐMÉRSÉKLETEN (5-50 °C) KAPOTT ÉRTÉKEK, (+) SZAPORODOTT A BAKTÉRIUM, (-) NEM SZAPORODOTT A BAKTÉRIUM (FORRÁS: SAJÁT MUNKA)	29
9. TÁBLÁZAT: AZ AX-9 BAKTÉRIUM ÁLTAL HASZNOSÍTOTT ÉS NEM HASZNOSÍTOTT SZÉNHIDRÁTOK 48 ÓRA ELTELTE UTÁN. A HASZNOSÍTOTT SZÉNHIDRÁTOK (+), A NEM HASZNOSÍTOTT SZÉNHIDRÁTOK (-) JELÖLÉSSEL VANNAK ELLÁTVA.....	31
10. TÁBLÁZAT: AX-9 NUKLEINSAV KONCENTRÁCIÓJA ÉS TISZTASÁGI MUTATÓI.....	34

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőim, Dr. Tóth Ákos Gergely, Dr. Batáné Vidács Ildikó és Dr. Csernus Olívia felé, valamint Dr. Nguyen Duc Quang és Dr. Bujna Erika irányába, akik szakmai tudásukkal és önzetlen segítségükkel támogattak a dolgozatom elkészítése során.

Továbbá köszönöm szépen a Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék valamennyi oktatójának és dolgozójának odaadó munkáját és támogatását.

A kutatás a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal „A körforgásos gazdaság megvalósíthatósága a honvédelmi tevékenységek során” című, TKP2021-NVA-22 azonosítószámú Tématerületi Kiválósági Program támogatásával valósult meg.

Szakdolgozat - Kilián Zoltán

NYILATKOZAT

szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Kilián Kitti
A Hallgató Neptun kódja: EJNFGJ
A dolgozat címe: Új faj jelölt baktérium jellemzése
A megjelenés éve: 2025
A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlant állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelté után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Budapest, 2025.04.16



Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Kilián Kitti (Neptun azonosító: EJNFGJ) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: 2025. április 16.


belső konzulens