

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság
Tanszék

Szőlőnövényről származó baktérium és antimikrobás
hatásának jellemzése

Kiss Lilla Klaudia Összegező

Kiss Lilla Klaudia
Budapest
2023

Az élelmiszerek, főként zöldségek és gyümölcsök előállítási folyamatai közül a termesztési körülmények mellett a „postharvest” technológiák (pl.: hűtve tárolás, módosított légterű csomagolás) alkalmazása is jelentős környezeti teherrel bír. A postharvest kezelések célja a betakarítás utáni patogén eredetű megbetegedések visszaszorítása, az eltarthatóság növelése, valamint a selejtezésre szoruló termények mennyiségének csökkentése. Ezen technológiák (i) energiaigényesek, (ii) a kemikáliák alkalmazásával terhelik környezetünket és szervezetünket, továbbá kihívást jelent az (iii) antibiotikus szerek alkalmazását követően megjelenő rezisztens fajok elleni védekezés is. Ezek a problémák az alternatív kezelési lehetőségek kifejlesztését sürgetik. Az elmúlt évtizedekben számos kutatás vizsgálta a biokontroll alkalmazási lehetőségét, mint alternatív postharvest kezelési módszer. A dolgozat keretein belül egy szőlőnövényről izolált baktériumtörzset és annak élelmiszerbiztonsági szempontból jelentős mikroorganizmusok elleni gátló hatását vizsgáltuk.

A baktériumtörzs jellemzéséhez hagyományos mikrobiológiai (Gram-festés, Oxidáz próba, Kataláz próba, Kálium-hidroxid teszt) és nagyműszeres analitikai módszereket (MALDI-TOF MS) alkalmaztunk, továbbá meghatároztuk a baktériumtörzs szaporodási hőmérséklet- és pH-optimumát. Baktériumokkal (*Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*) és élesztőgombákkal (*Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171, *Zygosaccharomyces lentus* Y1200, *Zygosaccharomyces rouxii* A9, *Candida parapsilosis* Y1011, *Pichia anomala* J121, *Zygosaccharomyces bailii* PM167, *Galactomyces geotrichum*) szembeni gátló hatását kontakt módszerrel vizsgáltuk. Extracelluláris antimikrobás vegyület termelési tulajdonságát agarlyuk diffúzió segítségével vizsgáltuk.

- Hagományos mikrobiológiai módszerek segítségével megállapítottuk, hogy a vizsgált izolátum (i) a Gram-negatív baktériumok csoportjába tartozik, (ii) Kataláz pozitív és (iii) Oxidáz negatív.
- MALDI-TOF MS segítségével sikerült faj szinten meghatározni a baktérium izolátumot, amely szerint a vizsgált törzs a *Pantoea agglomerans* fajhoz tartozik.
- A faj szintű azonosítást követően megállapítottuk, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények között (10 °C, 15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 41 °C-on, valamint pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 értékű pufferelt táplevesek) TGE táptalajon 30 °C-on, valamint 8 pH-jú pufferelt táplevesben volt a legintenzívebb szaporodás. A pH-optimum meghatározása során kontroll mintaként használt nem pufferelt TGE táplevesben a sejtszaporodás 8 óra elteltével hirtelen csökkenést mutatott. Összehasonlítva a kontroll görbe lefutását a pufferelt táplevest tartalmazó mintákéval, arra következtettünk, hogy a nem pufferelt táplevesben a baktériumsejtek savas kémhatású anyagot termeltek.

- A kiválasztott baktériumokkal szembeni gátló hatás vizsgálata során a beoltást követő 48 órában, a vizsgált hőmérsékleteken (30 °C, 37 °C) inkubált csészék egyikében sem volt megfigyelhető gátlásra utaló feltisztulási zóna.
- A kiválasztott élesztőgombákkal szembeni gátló hatás vizsgálata során a 25 °C-on inkubált mintákban a *P. agglomerans* képes volt az összes alkalmazott élesztőgomba szaporodását visszaszorítani. A 30 °C-on inkubált mintákban viszont nem volt megfigyelhető gátlásra utaló feltisztulási zóna.
- Az agarlyuk diffúziós vizsgálat során a feltételezett extracelluláris gátló vegyület termelésének hőmérséklet függését vizsgáltuk. Három különböző hőmérsékleten (25 °C, 30 °C, 37 °C) inkubált baktériumszuspenziót tartalmazó táplevest alkalmaztunk (álló tenyészet). Szemrevételezés alapján azt állapítottuk meg, hogy 25 °C-on és 30 °C-on sejtszaporodás csak kis mértékben valósult meg az álló táplevesekben, míg 37 °C-on szabad szemmel nem volt detektálható a sejtszaporodás. E három különböző hőmérsékleten inkubált baktériumtenyészetből származó szűrleteket juttattunk az élesztőgombákkal leoltott táptalajok fűrt mélyedéseibe, majd ezt 25 °C, 30 °C és 37 °C-on történő, 48 órás inkubálás követett. Az inkubációs idő letelte után egyik mintában sem volt megfigyelhető feltisztulási zóna a fűrt lyukakba jutott szűrlet körül, függetlenül a baktériumszuspenzió inkubálási hőmérsékletétől és a minták inkubálási hőmérsékletétől is.
- Az agarlyuk diffúziós vizsgálatot számos módosítást követően újra elvégeztük annak érdekében, hogy megállapítsuk a feltételesen termelt extracelluláris gátló vegyület termelése függ-e a baktériumsejtszámtól és/vagy a szaporodási fázistól. Két különböző kezdeti koncentrációjú (0,5 McFahrland standardnak megfelelő denzitású baktériumszuspenzió 10x-es és 100x-os hígítása) baktériumszuspenzióval dolgoztunk, amiket rázószekrényben 25 °C-on, 24 óráig inkubáltunk. A rázószekrény alkalmazása szemrevételezés alapján elősegítette a sejtszaporodást. Ezekből származó szűrletet juttattunk az élesztőgombákkal leoltott táptalajok fűrt mélyedéseibe, majd 25 °C és 30 °C-on, 24 óráig inkubáltuk a mintákat. A kísérlet végén nem volt megfigyelhető feltisztulási zóna a fűrt lyukakba jutott szűrlet körül.

Az átfogó kísérleti eredmények alapján az alábbi következtetéseket vontam le:

1. Az élesztőgombákkal elvégzett kontakt módszer pozitív eredménye alátámasztja, hogy a *Pantoea agglomerans* általunk vizsgált törzse rendelkezik biokontroll potenciállal. A

gátlómechanizmus pontosabb megértése érdekében további vizsgálatok elvégzése szükséges.

2. A kapott eredmények arra utalhatnak, hogy az általunk vizsgált *P. agglomerans* törzs élesztőgombákkal szembeni antagonista hatását versengés során fejtheti ki. Extracelluláris gátló vegyület termelését nem sikerült bebizonyítanunk. A felhasznált irodalomban talált információ alapján, miszerint a szűrlet 6-7 napos inkubálást követően volt a leghatékonyabb növénypatogén baktériumok ellen, a további módszerfejlesztés során ajánlott hosszabb inkubációs idővel tervezni.
3. Ezen dolgozat keretein belül a „quorum sensing” mechanizmust nem vizsgáltuk, viszont ez a mechanizmus magyarázhatja, hogy miért csak a sejt-sejt szintű érintkezés vezetett gátláshoz és a különböző körülmények között inkubált baktérium tenyészetekből (másik mikroba jelenléte nélkül) származó szűrletek miért nem tartalmaztak gátló hatású vegyületet. Elképzelhető, hogy a baktériumsejtek csak akkor termelnek antimikrobás vegyületet amikor érzékelik más szervezetek jelenlétét.