

DIPLOMADOLGOZAT

KISS LILLA KLAUDIA DIPLOMADOLGOZAT

Kiss Lilla Klaudia
2023

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 DIPLOMADOLGOZAT

Kiss Lilla Klaudia
Budapest
2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: MSc Élelmiszerbiztonsági és –minőségi mérnök

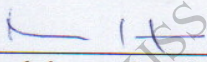
Diplomadolgozat készítés helye: Élelmiszer-mikrobiológia,-higiénia és -biztonság Tanszék

Hallgató: Kiss Lilla Klaudia

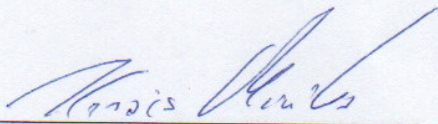
A diplomadolgozat címe: Szőlőnövényről származó baktérium és antimikrobás hatásának jellemzése

Konzulens: Dr. Kovács Mónika
Külső konzulens esetén tanszéki felelős

Beadás dátuma: 2023.05.09.



diplomadolgozat készítés helyének vezetője
Mohácsiné dr. Farkas Csilla



konzulens
Dr. Kovács Mónika



Mohácsiné dr. Farkas Csilla
szakfelelős

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. MUNKA CÉLJA	2
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
3.1. Biokontrollról általánosságban	3
3.1.1. Biokontroll típusai	3
3.1.2. Biokontroll szerepe és előnyei	3
3.1.3. Biokontroll szerek csoportosítása	4
3.2. Antagonista mikroorganizmusok gátló mechanizmusai	5
3.2.1. Versengés	5
3.2.2. Antibiózis	6
3.2.3. Parazitizmus	6
3.2.4. Elicitor hatás	6
3.3. Biológiai kontroll alkalmazási lehetőségei az élelmiszer eredetű patogén mikroorganizmusok elleni védekezésben	7
3.3.1. Bakteriofágok	7
3.3.2. Ragadozó baktériumok	9
3.3.3. Versengés, védőkultúrák alkalmazása és antimikrobás metabolitok alkalmazása	9
3.3.4. „Quorum sensing” mechanizmus	10
3.4. <i>Pantoea agglomerans</i> bemutatása, előfordulása	10
3.4.1. <i>Pantoea agglomerans</i> alkalmazási lehetőségei az agráriumban	11
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
4.1. Baktérium azonosításához alkalmazott anyagok	15
4.2. Vizsgálatokhoz felhasznált tápközegek	15
4.3. Vizsgálatok során alkalmazott mikroorganizmusok	16
4.3.1. Baktériumok	16
4.3.2. Élesztőgombák	17
4.4. Vizsgálatok során alkalmazott módszerek	17
4.4.1. Gram-festés	17
4.4.2. Kataláz próba	17
4.4.3. Oxidáz próba	18
4.4.4. Kálium-hidroxid teszt	18

4.4.5. Hőmérséklet-optimum meghatározása	18
4.4.6. pH-optimum meghatározása	19
4.4.7. Baktérium identifikálása mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometriával (MALDI-TOF MS)	20
4.4.8. <i>Pantoea agglomerans</i> gátló hatásának vizsgálata baktériumokkal szemben	22
4.4.9. <i>Pantoea agglomerans</i> gátló hatásának vizsgálata élesztőgombákkal szemben	22
4.4.10. Agarlyuk diffúzió	23
4.4.11. Módosított agarlyuk diffúzió	24
5. EREDMÉNYEK.....	25
5.1. Szőlőnövényről izolált ismeretlen baktérium azonosítása	25
5.1.1. Gram-festés	25
5.1.2. Kataláz próba	25
5.1.3. Oxidáz próba	25
5.1.4. Kálium-hidroxid teszt	25
5.1.5. MALDI-TOF MS.....	26
5.1.6. Hőmérséklet-optimum meghatározása.....	28
5.1.7 pH-optimum meghatározása.....	29
5.1.8. <i>Pantoea agglomerans</i> gátló hatása a vizsgált baktériumokkal szemben.....	30
5.1.9. <i>Pantoea agglomerans</i> gátló hatása a vizsgált élesztőgombákkal szemben	32
5.1.10. Agarlyuk diffúzió- feltételezett antimikrobás vegyület termelésének és hőmérséklet függésének vizsgálata.....	35
5.1.11. Módosított agarlyuk diffúzió- feltételezett antimikrobás vegyület termelésének baktérium koncentráció függésének vizsgálata	37
6. ÖSSZEFOGLALÁS	41
IRODALOMJEGYZÉK	43
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	
NYILATKOZATOK	

1. BEVEZETÉS

Napjaink egyik legjelentősebb globális kihívása az élelmezésbiztonság, ehhez szorosan kapcsolódik többek között a növénytermesztést folytonosan nehezítő kártevők elleni védekezés, továbbá a termőföldek minőségének degradációja. Talán még sosem kapott akkora figyelmet a fenntarthatóság, mint napjainkban. Nem csak az ipar, de a háztartások számára is egyre nagyobb jelentőséggel bír a „fenntarthatóbb” működés és életmód kialakítása. Magyarországon az összes kibocsátott üvegházhatású gázok megközelítőleg 25%-a köthető a mezőgazdasági, élelmiszerelőállítási és ellátási láncához kapcsolódó folyamatokhoz (Internet 1.). Szintén fontos megemlíteni az erdőirtás, az állattenyésztés és a nitrogéntartalmú műtrágyák alkalmazásának szerepét, mint a klímaváltozás főbb okai, a nem megújuló energiaforrások felhasználása mellett. 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 alkalmazása több kihívást is jelent napjainkban. Nem csak nagyon energiaigényesek (pl.: hűtve tárolás, szállítás), hanem a kemikáliák (pl.: peszticidek) megnövekedett alkalmazása miatt azok fokozott egészségkárosító hatásaival is számolnunk kell (szermaradékok az élelmiszereken, környezetünkben). Továbbá az antibiotikus szerek széles körű és gyakori alkalmazását követően megjelenő rezisztens fajok elleni védekezés problémája is az alternatív kezelési lehetőségek kifejlesztését sürgetik. Az elmúlt évtizedekben számos kutatás vizsgálta a biokontroll alkalmazási lehetőségét, mint alternatív postharvest kezelési módszer. Dolgozatban szeretném bemutatni a biokontroll jelenlegi gyakorlatait és alkalmazásának hatásait, továbbá egy általunk vizsgált baktérium, a *Pantoea agglomerans*, potenciális mikrobagátló hatását élelmiszer patogén mikroorganizmusokkal szemben, lehetséges alkalmazásait a biológiai növényvédelemben és postharvest kezelések során.

2. A MUNKA CÉLJA

Egy a MATE Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék törzsgyűjteményében fenntartott, szőlőnövényről izolált baktériumot vizsgáltunk. A kísérleti célkitűzéseink közé tartozott:

- A vizsgált baktérium jellemzése hagyományos módszerekkel (Gram-festés, Oxidáz próba, Kataláz próba, Kálium-hidroxid teszt).
- A vizsgált baktériumtörzs faj szintű azonosítása MALDI-TOF-MS nagyműszeres analitikai módszerrel.
- A vizsgált baktériumtörzs szaporodási hőmérséklet optimumának meghatározása.
- A vizsgált baktériumtörzs szaporodási pH optimumának megállapítása.
- Különböző élelmiszerbiztonsági szempontból jelentős baktérium (*Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*) elleni gátló hatásának vizsgálata kontakt módszerrel.
- Különböző élelmiszerbiztonsági szempontból jelentős élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171, *Zygosaccharomyces lentus* Y1200, *Zygosaccharomyces rouxii* A9, *Candida parapsilosis* Y1011, *Pichia anomala* J121, *Zygosaccharomyces bailii* PM167, *Galactomyces geotrichum*) elleni gátló hatásának vizsgálata kontakt módszerrel.
- Valamint extracelluláris gátló komponens termelésének vizsgálat, különböző kísérleti beállítások (különböző inkubációs hőmérsékletek, kezdeti baktériumkoncentráció) mellett.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Biokontrollról általánosságban

A Biokontroll avagy biológiai növényvédelem az IBMA (Nemzetközi Biokontroll Gyártók Egyesülete) definíciója szerint nem más mint az élő szervezeteken és természetes eredetű vegyületeken alapuló növényvédelmi kártevők és betegségek elleni védekezés (Internet 4.). Tágabb értelemben biológiai kontrollnak nevezzük egy kiválasztott élő szervezet egy másik élő szervezetre kifejtett antagonista hatását is, mely alkalmazható akár élelmiszereredetű patogén mikroorganizmusok elleni védekezésben.

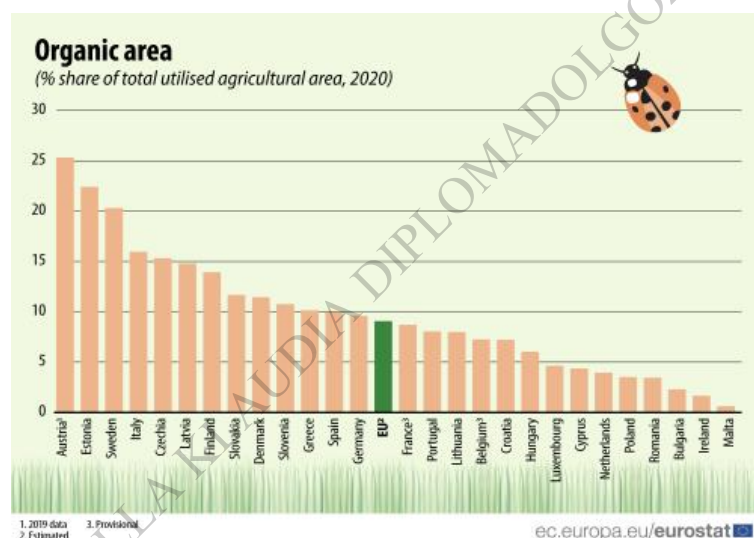
3.1.1. Biokontroll típusai

A biológiai növényvédelemnek négy különböző típusát különböztetik meg melyek a következők: természetes, természet megőrző, augmentatív és klasszikus. A természetes biokontroll alatt egy olyan ökoszisztéma rendszer értendő, ahol a kártevőket természetes ellenségeik szabályozzák emberi beavatkozás nélkül, pl. trópusi erdők. A természet megőrző biokontroll arra törekszik, hogy megvédje és fokozza a természetben előforduló ellenségek és mikrobák, továbbá beporzók jelenlétét különböző praktikák alkalmazásával, pl.: alternatív gazdaszervezetek, menedék, élőhely és tápanyag biztosításával. Az augmentatív vagyis támogató biokontroll nagyszámú természetes ellenség vagy mikroba időszakos bejuttatását jelenti egy adott területen. A klasszikus biokontroll alkalmazása során pedig a kártevőre nézve gazda-specifikus ellenség vagy mikroba bevezetése történik. Ez a megközelítés általában akkor használatos, ha egy idegen invazív organizmus jelenik meg egy adott területen, melynek nincs jelen természetesen előforduló ellensége (Internet 3.).

3.1.2. Biokontroll szerepe és előnyei

Az Európai zöldmegállapodásban vagyis a „Green Deal”-ben megfogalmazott célok között szerepel a növényvédelemben alkalmazott kemikáliák és veszélyes rovarirtók használatának 50%-kal történő csökkentése, továbbá organikus művelés alá kell eszen a mezőgazdasági területek 25%-a környezeti teher csökkentése végett 2030-ig. Az 1. ábra bemutatja, hogy az Európai Unió országai közül Ausztriában a legmagasabb az organikusan művelt mezőgazdasági területek aránya az összes mezőgazdasági területhez képest, míg

Magyarországon kicsivel az európai átlag alatt, a megművelt mezőgazdasági területek 5-6%-a minősül organikusnak. Ezzel összhangban a biológiai növényvédelem alkalmazásának jelentős növekedésére számíthatunk a következő évek során, ugyanis a biokontroll alapvető értékei közé tartozik, hogy az alkalmazott szereknek nincs károsító hatása a környezetünkre, az emberekre és a nem-célzott élőlényekre. A kibocsátott kemikáliák szignifikáns csökkentésével és mivel kártevő specifikus célzott intézkedéseket használ alkalmazása kedvez a biodiverzitásnak. A talaj minőségére is pozitív hatással van, mivel csökkenti a káros szermaradványok és szennyeződések jelenlétét, ezáltal a biokontroll elősegíti a kedvező mikrobiális közösségek kialakítását. Nem vegyi mivoltából adódóan a biokontroll egy rendszerszintű és kiegyensúlyozott megoldást kínálhat a fenntartható mezőgazdaság számára (Hulot et al., 2021).



1 ábra: Az Európai Unió országaiban organikusan művelt mezőgazdasági területek százalékos aránya 2020-ban. (Internet 2.)

3.1.3. Biokontroll szerek csoportosítása

A biológiai növényvédelem során alkalmazott szerek alatt azokat a természetből származó organizmusokat értjük, amelyek kártevők ellen használatosak. Hatásmechanizmusuk szerteágazó, alapulhat például a kártevők elpusztításán, elriasztásán és elterelésén is. E szereket a következő csoportokba sorolja a szakirodalom (Internet 5.):

- Makro szervezeteket: rovarok, atkák és jótékony fonálférgek, amelyek kártevőkkel táplálkoznak; pl.: *Amblyseius swirskii* alkalmazása melegházas növénytermesztés során.

- Mikro szervezetek: baktériumok, gombák, vírusok és származékaik, melyek rendelkeznek valamilyen kártevő gátló hatással; pl: Mycostop készítmény mely hatóanyaga *Streptomyces* K61 (korábban *S. griseoviridis*) a fuzáriumos hervadás ellen alkalmazható (Internet 6.).
- Szemiokémiai anyagok: növények, állatok és egyéb mikroorganizmusok által kibocsátott anyagok, amelyek fajon belüli vagy fajok közötti kommunikációra alkalmasak, hatásmechanizmusuk specifikus és nem toxikus; pl.: feromonos légértéltetés-nőivarú lepkék természetes illatanyagának elfedése által gátolja a párosodást.
- Természetes anyagok: közvetlenül növényekből, ásványokból vagy állatokból kivont, vagy természetes anyag utánzására gyártott anyagok melyek elűzhetik és/vagy kontrollálhatják a kártevőket; pl.: Neem Azal T/S készítmény mely hatóanyaga az azadirachtin, biológiai kitinszintézis gátló és táplálkozás blokkoló rovarölő szer (László Gy., 2013).

3.2. Antagonista mikroorganizmusok gátló mechanizmusai

Az antagonista mikroorganizmusok között lezajló gátló hatásmechanizmusok Darvas és munkatársai (2008) általánosítva négy fő csoportba sorolta, kiemelve, hogy a különböző résztvevő feleket vizsgálva egyre specifikusabb hatásmódok deríthetők fel. Vannak viszont olyan esetek is, ahol a gátlóhatás kifejtésének módja nem ismert pontosan.

3.2.1. Versengés

Az antagonista mikroorganizmusok közötti egyik legjellemzőbb kölcsönhatás a valamilyen környezeti létfeltételért, pl.: tápanyagért, térért történő versengés. A kompetíció során az egyik faj egyedei képesek gyorsabban, hatékonyabban hasznosítani az adott vegyületet, ami a gátolt faj egyedei szaporodásának visszaszorítását, elhalását idézheti elő. A versengés tényére sokszor csak következtetni lehet így a versengés tárgyát képző anyag vagy vegyületcsoport beazonosítása nem mindig lehetséges.

3.2.2. Antibiózis

A legrégebben ismert és legtöbbet tanulmányozott mechanizmus, melynek során az egyik faj a másik egyedeit károsítja antibiotikus hatású anyagok termelése révén. A különböző antibiotikus anyagok hatásmódja és hatásspektruma nagy változatosságot mutat. Léteznek mikrobacsoportokra specifikus antibiotikus anyagok, viszont vannak olyan antibiotikus hatású anyagok (pl.: mikotoxinok), amik magasabb rendű szervezetek (növények, állatok, emberek) számára is toxikus vagy egyéb módon kedvezőtlen hatásúak pl.: karcinogén hatásúak. Ezek az anyagok kémiaiailag is nagyon eltérőek. Kérdéses továbbá, hogy a környezeti feltételek hogyan befolyásolják az antibiotikus hatású anyagok termelését. Egyes vizsgálatok szerint a viszonylag bőséges és egyenletes tápanyagellátás kedvező.

3.2.3. Parazitizmus

Parazitizmus során az antagonista szervezet fizikai kontaktusba kerül a gazdaszervezettel, behatol abba, majd tápanyagként hasznosítja annak biomasszáját. Ez a mikroorganizmusok közötti kapcsolatban ez elsősorban a gombákra jellemző.

3.2.4. Elicitor hatás

A növényvédelemben alkalmazott mikroorganizmusoknak azon hatása, amikor a velük kapcsolatba kerülő növényekben képesek rezisztenciát indukálni növényi kórokozókkal szemben, azaz megnövelni a növény ellenállóképességét. A szakirodalomban található említés pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) sejtfalkivonatával kezelt árpa növényről, amelynek lisztharmattal szembeni ellenálló képessége a kezelést követően megnőtt. Az elicitor hatás bekövetkezése akkor tekintő bizonyítottnak, „ha a növény ellenálló képessége a kórokozóval szemben a rezisztenciát kiváltó mikrobával történt oltástól térben és/vagy időben elválasztva figyelhető meg, tehát például a növény gyökérzetének a kezelése után a föld feletti részekén (is) kifejeződik a fokozott ellenálló képesség.” (Darvas B., 2008)

3.3. Biológiai kontroll alkalmazási lehetőségei az élelmiszer eredetű patogén mikroorganizmusok elleni védekezésben

A patogén mikroorganizmusokkal fertőzött élelmiszerek világszintű egészségügyi kockázatot jelentenek, ennek csökkentése érdekében az élelmiszeripar különböző tartósítási eljárásokat fejlesztett ki és alkalmaz napjainkban. A legtöbb ilyen eljárás a patogén mikroorganizmus elpusztítására és szaporodásának gátlására összpontosít. Az egyik talán leggyakrabban alkalmazott fizikai eljárás a hőkezelés, ami a mikrobák ellen hatásos módszer, de a kezelt élelmiszer tápérték összetételére és érzékszervi tulajdonságaira egyaránt negatívan hathat. Másik nagyon gyakran alkalmazott hagyományos tartósítási technika, ami sok esetben negatív fogyasztói véleményt vált ki, a kémiai tartósítószer (pl.: szulfitok, nitritek) alkalmazása. Alternatív megközelítésként az elmúlt évtizedekben számos kutató vizsgálta az élelmiszerek biológiai tartósításának lehetőségeit, vagyis élő szervezetek alkalmazását a patogén mikroorganizmusok elleni védekezésben. A vizsgálatok során különböző hatásmechanizmusokat azonosítottak. Belák (2014) jelentésében hat csoportba sorolta a biológiai kontroll potenciális „eszközeit”. Ezek a következők: bakteriofágok, ragadozó baktériumok, védőkultúrák és antimikrobás metabolitok alkalmazása, továbbá mikroorganizmusok közötti versengés és a „quorum sensing” mechanizmusai.

3.3.1. Bakteriofágok

A bakteriofágok olyan vírusok, amelyek kizárólag baktérium sejtek megfertőzésére képesek. A bakteriofágokat életciklusuk alapján két csoportba sorolhatjuk: lítikus és lizogén fázisúak. A lítikus fágok a baktériumsejtek lízisét okozzák, a sejt szétesésével a gazdasejtben elszaporodott számos fág partikulum kikerül a környezetbe, amik további baktériumsejtek megtámadásával szorítják vissza a fertőzést. A lizogén fágok nem okoznak sejtlízist, viszont nukleinsavuk beépítésével képesek a gazdasejt fenotípusának megváltoztatására. Élelmiszeripari jelentősége a lítikus fágoknak van, alkalmazásukkal számos élelmiszer patogén baktérium gátlása megvalósítható. A 1. táblázat tartalmazza a szakirodalomban fellelhető bakteriofággal gátolt élelmiszer patogén baktériumok listáját, a vizsgált körülmények rövid leírását és a referenciákat, a teljesség igénye nélkül.

1. táblázat.: Bakteriofággal sikeresen gátolt élelmiszer patogén baktérium példák és vizsgálati körülményeik.

Gátolt patogén baktérium	Vizsgálati körülmények rövid leírása	Referencia
<i>E. coli</i>	2 napos fág koktéllal (ECP-100) történő permetezést követően salátán és sárgadinnyén, a telepkepző egységek jelentős csökkenése volt megfigyelhető.	Sharma et al. (2009)
<i>Campylobacter</i>	Folyékony élelmiszerekben kis számban jelenlévő kórokozók biokontrollja elérhető kellően magas hozzáadott fágkoncentráció (Cj6) mellett.	Bigwood et al. (2009)
<i>Salmonella</i>	6 napos, 15 °C-os inkubálás során az FO1-E2 fág alkalmazása 5 logaritmusos nagyságrenddel csökkentette a <i>S. typhimurium</i> számát pulyka felvágott vizsgálatokor.	Guenther et al. (2012)
<i>L. monocytogenes</i>	Fág alkalmazásával <i>L. monocytogenes</i> telep képző egységeinek csökkenése 2,5 logaritmusos nagyságrenddel volt detektálható 30 °C-on fogyasztásra kész csirketermékben, idő előrehaladtával újbóli növekedés volt megfigyelhető a patogén mennyiségében.	Bigot et al. (2011)
<i>Staph. aureus</i>	Fág koktél hozzáadása <i>S. aureus</i> -szal fertőzött pasztörözött tejhez. Ebből készült friss sajtban 6 óra elteltével detektálási szint alá csökkent a patogén mennyisége, kemény sajt esetében folyamatosan csökkenés volt detektálható a kontrollhoz képest.	Bueno et al. (2012)
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Csecsemőtápszerekben, 40 vizsgált törzsből 35 törzs növekedését volt képes gátolni egy öt fágból álló koktél.	Zuber et al. (2008)
<i>Shigellae</i>	Mind a fág koktél, mind az individuális fágok külön-külön alkalmazása során a <i>Shigellae</i> telep képző egységeiben csökkenés volt megfigyelhető. A fág koktél alkalmazása hatékonyabbnak bizonyult, mint az egyes fágok külön-külön történő alkalmazása.	Zhang et al. (2013)

A bakteriofágok élelmiszer patogénekkal szemben történő alkalmazásának előnyei között érdemes megemlíteni, hogy gazdasejt specifikusságuknak köszönhetően a környezetre és emlősök sejtjeire nincsenek hatással. Alkalmazásukkal elkerülhető a kihívásokkal teli, antibiotikum rezisztens patogén törzsek kialakulása is. A fágok előállításuk relatív egyszerű és változó környezeti viszonyok között stabilan tárolhatóak, továbbá auto-replikatív tulajdonságuk miatt akár kis koncentrációjú fág szuszpenziók alkalmazásával is elérhető a kívánt eredmény. Alkalmazásuk mégis kellő körültekintést igényel, hiszen további

kutatásokra van szükség a fág rezisztencia mechanizmusának és a kialakult rezisztencia legyőzésének jobb megismerése érdekében. (Kazi et al., 2016).

3.3.2. Ragadozó baktériumok

A ragadozó baktériumok olyan Gram-negatív, mobilis baktériumok, amik képesek megtámadni és sejtlyízist előidézni más, főként Gram-negatív baktériumokban. Az 1960-as évek óta ismert *Bdellovibrio* nemzetség tagjai jellemzően ilyen ragadozó életmódot folytatnak. Életciklusuk két részből áll, a támadási szakaszból, amikor a flagellumokkal rendelkező mobilis sejtek megtámadják a préda sejteket, és egy növekedési-szaporodási szakaszból, aminek következtében a préda sejt szétesik és elpusztul. Fratamico et al., (1995) laboratóriumi körülmények között sikeresen bebizonyította a *Bdellovibrios bacteriovorus* 109J törzs hatékonyságát számos élelmiszer patogén baktériummal (*E. coli*, *Shigella flexneri* különböző törzsei) szemben. Kutatói munkásságuk során kimutatták, hogy a ragadozó baktériumok hatásukat képesek kifejteni relatív széles spektrumú környezeti tényezők között, így potenciális biokontroll szerként azonosították különböző élelmiszercsoportok esetében is.

3.3.3. Versengés, védőkultúrák és antimikrobás metabolitok alkalmazása

A versengés, védőkultúrák és antimikrobás metabolitok alkalmazási lehetőségei szorosan összefüggenek és elméleti hátterük azonos a 3.2.1. és 3.2.2. fejezetekben leírtakéval. Mind versengés, mind a védőkultúrák alkalmazása során részt vehet a gátló mechanizmusban valamilyen antimikrobás metabolit, amit a biokontroll szerként alkalmazott szervezet termel. Mindhárom kategóriában kiemelkedő élelmiszerbiztonsági jelentősége van a bakteriocint termelő tejsavbaktériumoknak, melyek a hagyományos tartósítási eljárásokon (pl.: erjesztés) túl, biokontroll szerként is sikeresen alkalmazhatóak például a *L. monocytogenes* ellen. Bakteriocin termelés mellett számos anyagcsere termékük (pl.: tejsav, H₂O₂ alkalmazható) rendelkezik védő funkcióval penészek és romlást okozó baktériumok ellen (Arena et al., 2016).

3.3.4. „Quorum sensing” mechanizmus

A „quorum sensing” a baktériumok saját populáción belüli, fajok közötti és más magasabb rendű szervezetekkel történő „kommunikációját” jelenti. Többek között a molekuláris biológia tudományterület fejlődésének köszönhetően, a 20. század utolsó évtizedeiben megdőlt az a nézet miszerint a baktériumok „egysejtű, független életmódot” folytatnak. Ekkor ismerték fel, hogy a baktériumok specifikus szerves vegyületek kibocsátásával képesek a környezetükkel kommunikálni, ezekkel a vegyületekkel befolyásolni saját populációik, illetve más szervezetek viselkedését. A „quorum sensing” mechanizmusa hatással van a baktériumközösségek térbeli szerveződésére, segítségével a résztvevő sejtek képesek észlelni a populáció sejtsűrűségének nagyságát. A kibocsátott szignál-molekulák koncentrációjától függően, adott közösség tagjaiban génkifejeződési változásokat idézhetnek elő (pl.: virulencia növekedés), amik segítik a baktériumok adaptációját szélsőséges környezeti viszonyok között. A „quorum sensing”-gel magyarázható többek között, hogy egyes patogén baktériumok miért váltanak ki gyulladásos reakciót az emberi szervezet bélcsatornájában, ellentétben a hasznosnak ítélt, probiotikus hatású baktériumokkal. Ez a megállapítás azt bizonyítja, hogy a káros és hasznos mikrobióta esetén másfajta érzékelés és kommunikáció megy végbe. A „quorum sensing” hatásmechanizmusának pontosabb megértése, az azt gátló hatású vegyületek felderítése élelmiszerbiztonsági és élelmiszerbiztonsági szempontból is szignifikáns fejlesztési lehetőségeket rejt magában. Például az élelmiszer által közvetített patogén baktériumok kommunikációjának gátlásával visszaszorítható a szaporodásuk, ezáltal növelni lehet mind az élelmiszer eltarthatóságát, illetve biztonságosságát (Farkas és Mohácsiné Farkas, 2014).

3.4. *Pantoea agglomerans* bemutatása, előfordulása

A vizsgálatok megkezdésének idején még egy ismeretlen baktériumként kezeltük az érintett tenyészetet, de a vizsgálatok előrehaladtával megállapításra került a baktérium kiléte, MALDI-TOF-MS eljárás során *Pantoea agglomerans*-ként történt meg a beazonosítása. Az Anyagok és módszerek fejezetben bővebben kifejtem az azonosítás érdekében elvégzett műveleteket.

A *P. agglomerans* (korábbi nevén *Enterobacter agglomerans*) egy sárga telepet képző, pálcika alakú, aerob, Gram-negatív, fakultatív patogén baktérium az *Erwiniaceae* család tagja. Ubiquiter, általában növények felületéről, emberi és állati székletből izolálható. A

Pantoea nemzetség leggyakrabban izolált tagja. A gyakori előfordulásából kiindulva széles környezeti tényezők között képes növekedni (Costa et al., 2002).

A *P. agglomerans* baktériumot gyakran izolálták kórházakban, elfertőződött sebekből, ahol a penetráló sérüléseket növényi részek okozták (pl.: fa, tüske), illetve főként immunszupresszált egyéneknél kórházi fertőzésként is azonosították. A kórházi fertőzés leggyakrabban fertőzött eszközök (pl.: katéter) közvetítésével valósult meg, szeptikus ízületi gyulladást, csontthártya- és szívhártyagyulladást okozva. Endotoxinját toxikus tüdőgyulladás kórokozójaként is azonosították kelet Lengyelországban mezőgazdasági munkát végző egyének csoportjában, gabonapor belélegzését követően (Dutkiewicz et al., 2016a). Viszonylag kevés esetet jelentettek, ahol a *P. agglomerans* gerinces állatokban váltott volna ki fertőző megbetegedést, delfineknél vetélés és vérzéses megbetegedés volt megfigyelhető. Rovarok körében gyakran fordulnak elő *P. agglomerans* törzsek, főként szimbiontaként. Növényekben főként mutualistaként van jelen, de néhány haszonnövénynél (pl. gyapot, rizs, hagyma, kukorica) betegséget okoz (Dutkiewicz et al., 2016b).

3.4.1. *Pantoea agglomerans* alkalmazási lehetőségei az agráriumban

Az elmúlt évtizedekben számos kutató vizsgálta a *P. agglomerans* antagonista hatását és lehetséges alkalmazását a biológiai növényvédelemben, illetve az élelmiszerekkel kapcsolatos patogén mikroorganizmusok elleni védekezésben.

A *P. agglomerans* egyes törzsei képesek antibiotikus vegyületek termelésre, ami hatásosnak bizonyult emberi, állati és növényi megbetegedések kezelésében is. Ezek az antibiotikus anyagok kémiaiilag igen változatosak. Az 2. táblázatban soroltam fel a teljesség igénye nélkül, néhány szakirodalomban fellelhető példát a *P. agglomerans* által termelt antibiotikus anyagok kémiai változatosságára.

2. táblázat: *P. agglomerans* által termelt antibiotikus anyagok kémiai csoportosítása.
(Dutkiewicz et al., 2016c munkája alapján)

Antibiotikus vegyület kémiai csoportja	Antibiotikus vegyület elnevezése	Gátolt patogén mikroorganizmus(ok)
lipopeptid	herbicolin A és B	Szterol tartalmú gombák
dapdiamide	herbicolin I.	<i>Erwinia amylovora</i>
-	pantocins A and B	különböző <i>Enterobacteriaceae</i> törzsek, pl.: <i>E. amylovora</i>
Peptid	microcin	<i>E. amylovora</i>
Savas	agglomerins A, B, C and D	<i>Clostridium difficile</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>Propionibacterium acnes</i>
Pszeuropeptid	andrimid	Gram + és Gram – baktériumokat egyaránt, pl.: methicillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), vancomycin-rezisztens <i>Enterococcus</i> (VRE) és <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Peptid	2-amino-3-(oxirane-2,3-dicarboxamido)-propanoyl-valine (APV)	<i>E. amylovora</i> (soybean pathogen)

A *P. agglomerans* számos termesztett növényt veszélyeztető patogén baktérium és gomba antagonista szervezeteként ismert. Forgalomban kapható E325 és P10c törzsei a legismertebbek, ami az *Erwinia amylovora* baktérium elleni védekezésben bizonyult sikeresnek. Az *E. amylovora* alma- és körtetermésű növények tűzelhalás betegségéért felelős baktérium. Khadija Faraj Al-Arabi doktori értekezésében arról számolt be, hogy „a tűzelhalás betegség tüneteit a *Pantoea agglomerans* több gazdanövényfajon redukálta, így különböző almafajtán, birs- és körtegyümölcsön. Az alkalmazott pre- és poszt kezelés eredményes volt, de a fertőzés előtti kezelés hatásosabbnak bizonyult. Almalevélen az előkezelés 50-98%-os, az utókezelés pedig 34-51%-os tünetcsökkenést eredményezett” (Al-Arabi, 2002).

A *P. agglomerans* fő gátló hatásmechanizmusa az *Erwinia amylovora*-val szemben elsősorban az antimikrobás szer termelő tulajdonsága. Az 1. táblázatban bemutatott antibiotikus vegyületek közül néhány képes a patogén aminosav szintézisére hatni, továbbá a *P. agglomerans* versengés során eredményesebb, sikerebben telepedik meg az alma- és körtetermésűek virágzatában, mint a patogén baktérium (Dutkiewicz et al., 2016c). Kim és munkatársai (2022) munkájuk során az E325 törzset alignát mikrokapszulába (AMC) zárta és gátló hatékonyságát a relatív nedvességtartalom függvényében vizsgálta. A változó relatív

nedvességtartalommal kívánta utánaizni a nyílt szántóföld változatos körülményeit. A vizsgálatok során az AMC közvetített E325 törzs hatékonyan visszaszorította az *Erwinia amylovora* által okozott fertőzést. A tanulmány alapján a mikrokapszulába zárt biokontroll szer használata ígéretes praktika lehet a tűzelhalás visszaszorításában akár nem kontrollált körülmények között is.

P. agglomerans hatásosnak bizonyult zöldségek termesztése során is. Kanadában burgonyagumókról izolált *P. agglomerans* törzsek sikeresen visszaszorították a feketerothadásért felelős *Peptobacterium atrosepticum* növekedését. Hsieh és munkatársai (2005) munkájuk során kimutatták, hogy a *P. agglomerans*-al kezelt vetőmagok használatával sikeresen szabályozható a babfélék *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* által okozott bakteriális hervadása. Továbbá rizs és különböző gabonafélék bakteriális fertőzéseivel szemben is pozitív eredményeket értek el a kutatók a *P. agglomerans* alkalmazásával.

Az antibiózis és versengés mellett, a *P. agglomerans* kevésbé ismert hatásmechanizmusa, amit a biológiai növényvédelem során hasznosítani lehet, az a növényi rezisztencia indukálása például: bakteriális levélfoltosodását okozó *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* patogén elleni rezisztencia alakult ki retkeknél *P. agglomerans*-szal történő kezelést követően (Han et al., 2000).

Számos kutató vizsgálta a *Pantoea agglomerans* növény patogén penészgombákkal szembeni gátló hatását is. Alkalmazása sikeresnek bizonyult számos búza patogén mikroorganizmus visszaszorításában (*Fusarium culmorum* és *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Fusarium avenaceum*-mitotoxin termelő, *Fusarium graminearum*). Verhagen és munkatársai (2011) tanulmányukban arról számoltak be, hogy a *P. agglomerans* képes volt szőlőnövényben rezisztenciát kiváltani a szürkerothadás kórokozója, a *Botrytis cinerea*-val szemben.

Külföldi tanulmányokban (Dutkiewicz et al., 2016c) pozitív eredményekről számoltak be a kutatók a *P. agglomerans* penészgátló hatásával kapcsolatban a termények tárolása során is. Kimutatták, hogy a *Pantoea agglomerans* CPA-1 és CPA-2 törzsei kiváló védekezést biztosítottak a következő patogének által indukált megbetegedések ellen: *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer*; és gátolta az emberi egészségre is ártalmas *Penicillium expansum* által termelt mikotoxin, a patulin felhalmozódását. A CPA-2 törzsszel kezelt citrusfélék esetében kevesebb kék- és zöldrothadással (*Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*) kapcsolatos incidenst jelentettek. Az EPS125 törzs csonthéjasok

tárolásának vizsgálatakor ért el pozitív eredményt a *Monilinia laxa* és *Rhizopus stolonifer* által előidézett rothadásos megbetegedésekkel szemben.

Összegezve, a *P. agglomerans* különböző törzsei nagy potenciállal rendelkeznek a biológiai növényvédelem és élelmiszer-tartósítás területén. Széles hatásspektrumuknak köszönhetően mind bakteriális, mind penészes fertőzések elleni védekezésben fontos szerepet játszhat a jövőben. Gátló hatásmechanizmusa is sokoldalú, egyes törzsek képesek antibiotikus anyagok termelésére, és/vagy a növény rezisztenciáját indukálják továbbá tápanyagért, térért történő versengés következtében is képesek a patogén mikroorganizmusokon felülkerekedni.

KISS LILLA KLAUDIA DIPLOMADOLGOZAT

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A baktérium azonosításához alkalmazott anyagok:

- Gram-festés:
kristályibolya festék
lugol oldat
95 % etanol oldat
szafranin
desztillált víz
- Kataláz próba:
H₂O₂ 3% oldat
- Oxidáz próba:
oxidáz reagens (5 % tetrametil-fenil-diamin hidroklorid)
- Kálium-hidroxid próba:
KOH 3% oldat
- MALDI-TOF-MS
hangyasav HCOOH 70 %
mátrix, alfa-ciano-4-hidroxifélsav

4.2. Vizsgálatokhoz felhasznált tápközegek

- TGE táptalaj, 1000 ml végtérfogat:
5 g pepton
2,5 g élesztőkivonat
1 g glükóz
15 g agar
- YEPD táptalaj, 1000 ml végtérfogat:
5 g pepton
10 g élesztőkivonat
10 g glükóz
15 g agar

- Különböző pH értékű, pufferelt TGE táplevesek, 100 ml végtérfogatra:

3. táblázat: Különböző pH értékű pufferelt táplevesek előállításához szükséges alapanyagok és mennyiségük.

pH	pepton (g)	élesztőkivonat (g)	glükóz (g)	1M Na ₂ HPO ₄ (ml)	1M citromsav (ml)
3.0	1	0,5	0,2	0,822	1,589
4.0	1	0,5	0,2	1,542	1,229
5.0	1	0,5	0,2	2,060	0,970
6.0	1	0,5	0,2	2,526	0,737
7.0	1	0,5	0,2	3,294	0,353
8.0	1	0,5	0,2	3,890	0,055

- Végtérfogatok eléréséhez: desztillált víz

4.3. Vizsgálatok során alkalmazott mikroorganizmusok

A felhasznált baktériumok és élesztőgombák egy része a MATE Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék saját gyűjteményéből származik. Az élesztőgombák közül a *Saccharomyces cerevisiae* a CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) törzsgyűjteményből származott, a *Zygosaccharomyces lentus* és *Candida parapsilosis* pedig a NCAIM (Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye) törzsgyűjteményéből származik.

4.3.1. Baktériumok:

- *Pseudomonas lundensis* (azonosítási tesztek során pozitív kontrollként alkalmazott)
- *Listeria innocua*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bacillus cereus*

4.3.2. Élesztőgombák

- *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171
- *Zygosaccharomyces lentus* Y1200
- *Zygosaccharomyces rouxii* A9
- *Candida parapsilosis* Y1011
- *Pichia anomala* J121
- *Zygosaccharomyces bailii* PM167
- *Galactomyces geotrichum*

4.4. Vizsgálatok során alkalmazott módszerek

4.4.1. Gram-festés

A baktériumok két eltérő csoportba sorolhatóak a sejtfalszerkezetük alapján. Gram-festés során a Gram-pozitív baktériumok sejtjei megfestődnek kékes/lilás színűre, míg a Gram-negatív baktériumok rózsaszínűekké. Láng mellett dolgozunk. Műanyag oltókacs segítségével, tárgylemezre felvitt egy csepp vízben szuszpendálunk egy kacsnyi baktériumsejtet. Levegőn beszárítjuk és láng fölött fixáljuk, majd pár csepp kristályibolya festéket csöpögtetünk rá, fontos, hogy elfedje a tárgylemezre felvitt mintát. 1 perc várakozás után, desztillált vízzel leöblítjük a felesleges kristályibolya oldatot. Ezt követően pár csepp lugol oldatot adunk a mintához, szintén 1 perc várakozás után desztillált vízzel öblítjük. Következő lépésként 95%-os etanollal folyamatos öblítést végzünk, amíg a lefolyó etanol elszíntelenedik, utána ismételt öblítünk desztillált vízzel. Utófestékként safranint alkalmazunk, amit szintén 1 percig állni hagyunk a mintán majd desztillált vízzel öblítjük. Ezután óvatosan láng fölött szárítjuk a mintát és mikroszkóp alatt kiértékeljük. Kontrollként, a Gram-negatív *Pseudomonas lundensis* tenyészzettel megismételjük a fenti lépéseket.

4.4.2. Kataláz próba

Az ismeretlen baktériumtenyészetből műanyag oltókacs segítségével felviszünk egy kacsnyit egy tárgylemezre. H₂O₂ oldatot csöpögtetünk a mintára, pozitív eredmény esetén kataláz enzim jelenlétére utaló oxigén keletkezése figyelhető meg buborékformálódásként.

Kontrollként, a kataláz-pozitív *Pseudomonas lundensis* tenyésztettel megismételjük a fenti lépéseket.

4.4.3. Oxidáz próba

A teszt elvégzésével az állapítható meg, hogy a vizsgált baktérium rendelkezik-e citokróm-oxidáz c enzimmal, ezáltal szűkítve a szóba jövő nemzetségek számát. Egy szűrőpapírt átitatunk oxidáz reagenssel és a vizsgálni kívánt baktériumtenyészetből egy kacsnyit eldörzsölünk rajta. Sötétbíbor színreakció jelzi a pozitív eredményt, amikor is a használt reagenst szubsztrátként érzékeli az enzim komplex és oxidálja azt. Kontrollként, az oxidáz pozitív *Pseudomonas lundensis* tenyésztettel megismételjük a fenti lépéseket.

4.4.4. Kálium-hidroxid teszt

A vizsgálat során, a KOH oldat roncsolja a Gram-negatív baktériumok sejtfalát, aminek következtében kromoszómális anyag távozik a sejtekből. Pozitív eredmény esetén ragadós, nyúlós állagúvá változik a minta. A teszt elvégzéséhez műanyag oltókaccsal felviszünk egy kacsnyi vizsgálni kívánt baktérium tenyészetet egy tárgylemezre, és pár csepp KOH oldatot cseppentünk rá és a kaccsal óvatosan elkeverjük. A kacsot a mintából kicsit kiemelve, pozitív eredmény esetén megfigyelhető a nyúlósodás. Kontrollként, a kálium-hidroxid próbára pozitív eredményt adó *Pseudomonas lundensis* tenyésztettel megismételjük a fenti lépéseket.

4.4.5. Hőmérséklet-optimum meghatározása

A vizsgálat célja, hogy megállapítsuk, milyen hőmérsékleti viszonyok között szaporodik a leggyorsabban az azonosítani kívánt baktérium. Összesen hat különböző hőmérsékletet vizsgáltuk, két párhuzamossal dolgozva. 12 darab Petri-csészébe TGE táptalajt öntünk, és hagyjuk megdermedni. Majd a friss, 24 órás baktérium tenyészetből 0,5 McFarland-standardnak megfelelő denzitású szuszpenziót készítünk McFarland denzitométer segítségével. Lamináris fülke alatt, lelángolt oltókacs segítségével szélesztéssel felvisszük a mintát a Petri-csészékbe. Az így elkészített Petri-csészéket ezután 10 °C, 15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C és 41 °C-on termosztáljuk. A növekedést 24 és 48 óra elteltével szemrevételezéssel értékeljük.

4.4.6. pH-optimum meghatározása

A vizsgálat célja, hogy megállapítsuk, milyen pH viszonyok között szaporodik leggyorsabban az azonosítani kívánt baktérium. Ehhez előkészítünk hat különböző pH-jú táplevest a 3. táblázat szerint és autoklávban sterilizáljuk őket. Használat előtt Duotest segítségével ellenőrizzük a pH értéküket. A vizsgálni kívánt baktériumból 0,5 McFarland-standardnak megfelelő denzitású szuszpenziót készítünk McFarland denzitométer segítségével. Így biztosítani tudjuk, hogy a különböző vizsgálatok során alkalmazott baktérium szuszpenziók nagyságrendileg megegyező mennyiségű baktérium sejtet tartalmaznak (0,5 McFarland 10^7 és 10^8 TKE/ml közötti baktérium-mennyiségnek felel meg). A mérés során vizsgált mintákat 500-500 µl különböző pH-jú táplevesekből, 100-100 µl baktérium szuszpenzióból (vortexelés után) és 400-400 µl desztillált vízből állítjuk össze, automata pipetta segítségével, Eppendorf csövekbe. A Multiskan mintatartó egységébe vortexelés után 3 x 300 µl mintát viszünk fel a különböző előkészített pH-jú mintákból. A 4. táblázat szemlélteti a minták elhelyezkedését a mintatartóban.

4. táblázat: A Multiskan mintatartóóra felvitt vizsgálati minták elhelyezkedése.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
B	⊗	C	C	C	⊗	pH 3	pH 3	pH 3	⊗	⊗	⊗	⊗
C	⊗	pH 4	⊗	pH 5	pH 5	pH 5	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
D	⊗	pH 4	pH 4	⊗	pH 6	pH 6	pH 6	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
E	⊗	pH 7	pH 7	pH 7	⊗	pH 8	pH 8	pH 8	⊗	⊗	⊗	⊗
F	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
G	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
H	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗

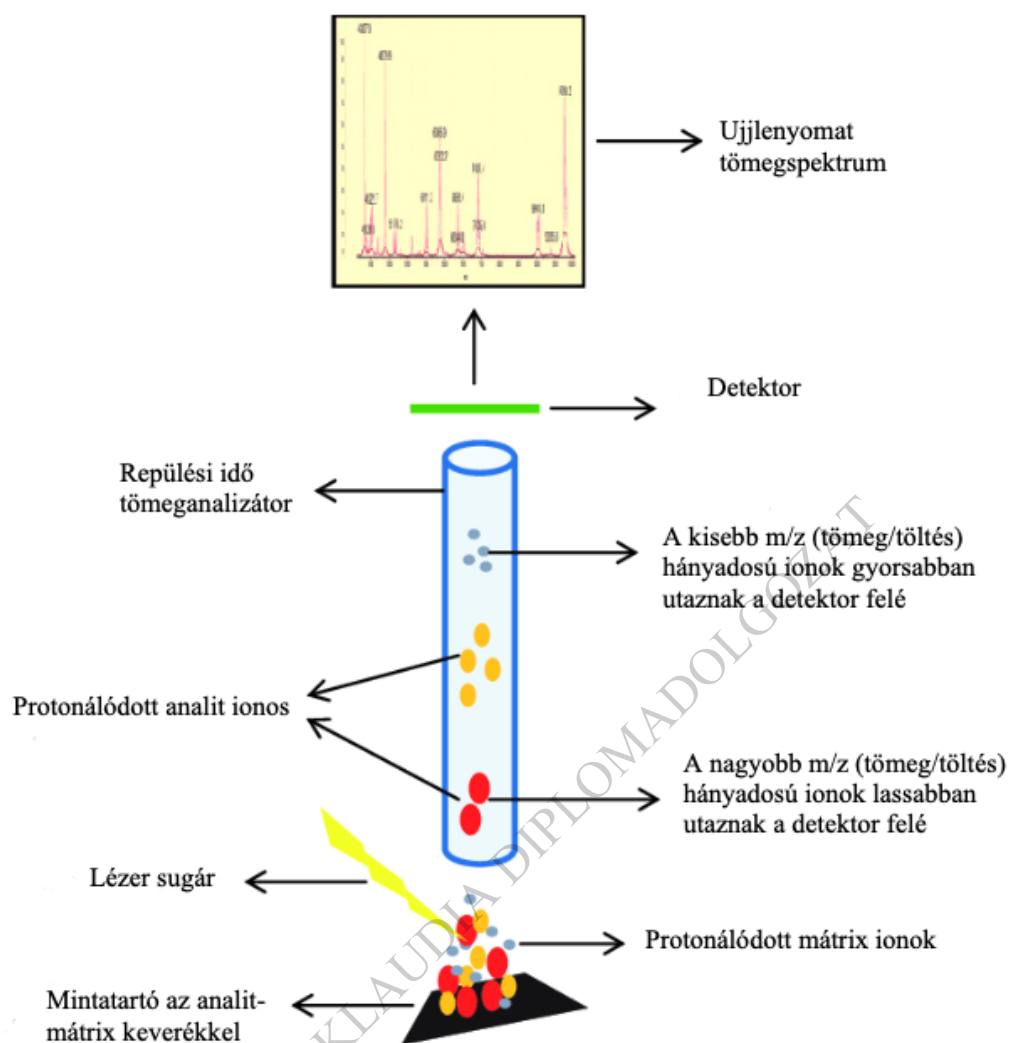
C= kontroll: Nem pufferealt táplevessel készült minta oldat.

⊗ = 300 µl desztillált vízzel feltöltött cellák, a párolgás visszaszorítása végett.

A mintatartót behelyezzük a berendezésbe fedő nélkül, beállítjuk a hőmérsékletet 30 °C-ra és elindítjuk a számítógépen az Ascent programot. A műszer 24 órán keresztül minden fél órában mérést végez a mintacellákban lévő baktériumok szaporodását nyomonkövetve. A Multiskan készülék 595 nm hullámhosszon méri a minták abszorbancia értékeit. A kapott abszorbancia értékek pozitív korrelációt mutatnak a baktérium sejtszámmal. Az eredmények kiértékelése Excel segítségével történt.

4.4.7. Baktérium identifikálása mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometriával (MALDI-TOF-MS).

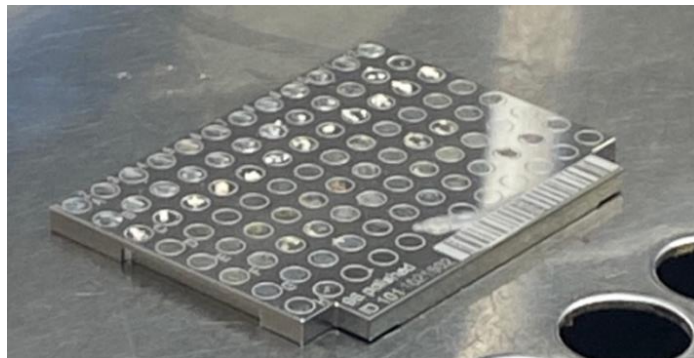
A mikroorganizmusok azonosításának egy relatív újszerű módszere a MALDI-TOF tömegspektrometria alkalmazása. A berendezés sematikus felépítését a 2. ábra szemlélteti. Az azonosítás alapja, hogy a mikrobák egyedi fehérjeprofillal rendelkeznek, ami fajra/nemzetségre specifikus ujjlenyomatként szolgál. Az ismeretlen baktérium tömegspektrumát egy szoftver (Bruker Daltonic Compass programja) az adatbázisba gyűjtött referencia tömegspektrumokkal összehasonlítja és egyezés esetén azonosítja.



2. ábra: MALDI-TOF MS berendezés sematikus ábrája. (Internet 7.)

Lamináris fülke alatt, az azonosítani kívánt baktérium friss tenyészetéből steril fogpiszkáló segítségével felvisszük a sejteket a 3. ábrán bemutatott MSP 96 polírozott acél mintatartóra. Automata pipetta segítségével 1 µl 70 % hangyasavat adunk a felvitt mintához, ami sejtroncsoló hatása végett segít feltárni a sejteket. Szintén automata pipettával 1 µl mátrix oldatot adunk a mintákhoz az ionizáció elősegítése végett. Levegőn hagyjuk beszáradni a mintákat majd elhelyezzük a Bruker MALDI-TOF mintatartó egységében. Kísérő dokumentum segítségével követjük nyomon, hogy melyik mintahelyre milyen mikroorganizmus került. A berendezés 96 mintát kevesebb mint egy óra alatt képes beazonosítani. A program, mintáról mintára halad és valós időben nyomonkövethető beépített kamera segítségével. A spektrumok felvételét követően a program kiértékeli a spektrumok minőségét és az azonosítás minőségét is. Akkor fogadható el az eredmény, ha

mindkét tényezőt elfogadhatóra értékelte a program (2-3 közötti pontszám esetén elfogadható). Az általunk azonosítani kívánt baktérium a D1 és D2 helyre került felvitelre.



3. ábra: MALDI-TOF berendezéshez használt MSP 96 polírozott acél mintatartó a felvitt mintákkal.

4.4.8. *Pantoea agglomerans* gátló hatásának vizsgálata baktériumokkal szemben

A vizsgálat célja, hogy megállapítsuk a *P. agglomerans* rendelkezik-e antagonista hatással a következő baktériumokkal szemben: *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*. Lamináris fülke alatt 3 ml, 0,5 McFarland standardnak megfelelő denzitású baktérium szuszpenziókat készítünk a gátolni kívánt mintákból, a kapott szuszpenziókat vortex segítségével elegyítjük majd 100x-os hígítást végzünk. A hígítással kapott baktérium szuszpenziókból automata pipettával 1-1 ml mérünk TGE táptalajra, amit óvatos mozdulatokkal egyenletesen eloszlatunk. A tápközeg felszínén főlegben maradt szuszpenziót leszívjuk, majd hagyjuk láng mellett megszáradni a mintákat. Utána steril fogpiszkáló segítségével, friss tenyészetből két párhuzamos vonalban felyisszük a *P. agglomerans* sejteket. A beoltott Petri-csészéket 30 °C és 37 °C-on inkubáljuk. Az eredményeket szemrevételezéssel 24, illetve 48 óra után ellenőrizzük.

4.4.9. *Pantoea agglomerans* gátló hatásának vizsgálata élesztőgombákkal szemben

A vizsgálat célja, hogy megállapítsuk a *P. agglomerans* rendelkezik-e antagonista hatással a következő élesztőgombákkal szemben: *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171, *Zygosaccharomyces lentus* Y1200, *Zygosaccharomyces rouxii* A9, *Candida parapsilosis* Y1011, *Pichia anomala* J121, *Zygosaccharomyces bailii* PM167, *Galactomyces geotrichum*. Lamináris fülke alatt 3 ml, 0,5 McFarland standardnak megfelelő denzitású

élesztő szuszpenziókat készítünk a gátolni kívánt mintákból, a kapott szuszpenziókat vortex segítségével elegyítjük majd 10x hígítást végzünk. A hígítással kapott élesztőgomba szuszpenziókból automata pipettával 1-1 ml-t mérünk YEPD táptalajra, amit óvatos mozdulatokkal egyenletesen eloszlátunk. A tápközeg felszínén főlegben maradt szuszpenziót leszívjuk, majd hagyjuk láng mellett megszáradni a mintákat. Utána steril fogpiszkáló segítségével, friss tenyészetből, két párhuzamos vonalban felvisszük a *P. agglomerans* sejteket. A beoltott Petri-csészéket 25 °C és 30 °C-on inkubáljuk. Az eredményeket szemrevételezéssel 24 és 48 óra után ellenőrizzük.

4.4.10. Agarlyuk diffúzió

A vizsgálat célja a *P. agglomerans* antagonista hatásmechanizmusának jobb megismerése. A vizsgálat során megállapítható, hogy a *P. agglomerans* termel-e antimikrobás hatású vegyületet. Lamináris fülke alatt 3 darab Erlenmeyer lombikba 30-30 ml TGE táplevest mérünk, majd 3 ml, 0,5 McFarland standardnak megfelelő denzitású baktérium szuszpenziót készítünk, friss, *P. agglomerans* tenyészetből majd 100x-os hígítást végzünk. Mindhárom Erlenmeyer lombikba automata pipetta segítségével 300-300 µl hígított baktérium szuszpenziót adunk. Homogenizáljuk a baktérium sejteket tartalmazó táplevest és 24 óráig különböző hőmérsékleten (25 °C, 30 °C, 37 °C) inkubáljuk őket. Az inkubációs idő letelte után automata pipetta segítségével 2x 1,5-1,5 ml mennyiséget mérünk ki a három Erlenmeyer lombik tartalmából Eppendorf csövekbe a különböző hőmérsékleteken inkubált tenyészetekből (összesen 3-3 ml szűrletre van szükségünk). A hat darab Eppendorf cső tartalmát öt percen keresztül, 12 000 rpm fordulatszámon, 4 °C-on centrifugáljuk. Centrifugálás után a felülúszót 0,45 µm pórusméretű fecskendőszűrőn átszűrjük. Majd három párhuzamossal dolgozva, YEPD táptalajt tartalmazó Petri-csészékbe a vizsgálni kívánt hét különböző (4.3.2.-es fejezetben ismertetett) élesztőgomba szuszpenzióját vesszük fel, a korábbi módszerek során bemutatott lépéseket követve. Miután megszáradtak a minták, hat-hat lyukat fúrunk lyukasztó segítségével. Fülke alatt dolgozunk, az lyukasztót és a használt spatulát alkoholba mártjuk és lelángoljuk a különböző élesztőgombákkal beoltott táptalajok lyukasztása között. Az összegyűjtött szűrletekből az előkészített, élesztőkkel beoltott, YEPD táptalaj fűrt mélyedéseibe 50-50 µl mennyiséget mérünk. Ezután 25 °C, 30 °C, 37 °C-on inkubáljuk a mintákat, 24 és 48 óra eltelte után szemrevételezéssel értékeljük.

4.4.11. Módosított agarlyuk diffúzió

Következő lépésként megismételtük a 4.4.10-es kísérletet az alábbi módosításokkal:

- 2 darab, TGE táplevest tartalmazó Erlenmeyer lombikba, két különböző koncentrációjú *P. agglomerans* baktérium szuszpenziót mérünk be. Egy a 0,5 McFarland standardnak megfelelő denzitású baktérium szuszpenzió 100x-os hígítását, illetve egy a 0,5 McFarland standardnak megfelelő denzitású baktérium szuszpenzió 10x-es hígításából mérünk a lombikokba 300-300 µl mennyiséget.
- A különböző koncentrációjú baktérium szuszpenziókkal beoltott tápleveseket, azonos hőmérsékleten, 25 °C-on inkubáljuk rázószekrényben, 160 rpm fordulatszámon, 24 óráig.
- Az előző kísérlethez hasonlóan előkészítjük az élesztőgombákkal beoltott YEPD táptalajokat és 4 db lyukat fúrunk minden egyes Petri-csészébe. Két párhuzamossal dolgozunk.
- Az inkubációt követően, a minta centrifugálása, fecskendőszűrőn történő átszűrése és a fúrt mélyedésekbe történő adagolása megegyezik a 4.4.10-es kísérletben leírtaknak.
- Az elkészített mintákat 25 °C és 30 °C-on inkubáljuk 24 óráig majd szemrevételezéssel kiértékeljük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Szőlőnövényről izolált ismeretlen baktérium azonosítása

5.1.1. Gram-festés

A Gram-festés során azt határoztuk meg, hogy a vizsgált baktérium a Gram-pozitív vagy a Gram-negatív baktériumok csoportjába tartozik. A festés elvégzése után mikroszkóp alatt 100x-os objektívvel megvizsgáltuk a sejteket. A mikroszkóp látóterében pálcika alakú, rózsaszín színű sejtek voltak láthatóak, ami arra utal, hogy az azonosítani kívánt törzs a Gram-negatív baktériumok csoportjába tartozik.

5.1.2. Kataláz próba

A Kataláz próba elvégzésével arra kapunk választ, hogy a vizsgált baktérium rendelkezik-e a hidrogén-peroxidot lebontó kataláz enzimmel. Az enzim jelenléte utal a baktérium légzési folyamataira és az eredmény segítségével tovább szűkíthető a nemzetség szintű beazonosítás. A mintára cseppentet 3%-os hidrogén-peroxid oldat hatására gyors és erőteljes buborékképződés volt megfigyelhető, ami utal a kataláz enzim jelenlétére. Így a vizsgált törzs kataláz-pozitív.

5.1.3. Oxidáz próba

A teszt elvégzésével az állapítható meg, hogy a vizsgált baktérium rendelkezik-e citokróm-oxidáz c enzimmel, ezáltal szűkítve a szóba jövő nemzetségek számát. Az oxidáz reagenssel átitatott szűrőpapír a felvitt baktériumminta hatására nem adott sötétbíborszínű színreakció, így a vizsgált minta oxidáz-negatív.

5.1.4. Kálium-hidroxid teszt

A kálium-hidroxid tesztet minőségbiztosítási céllal végeztük el, a korábbi Gram-negatív megállapítás igazolására. A tárgylemezre felvitt mintát pár csepp KOH oldattal óvatosan elkeverve a sejtfal felbomlására utaló nyúlósodás volt megfigyelhető, amely megerősítette, hogy a vizsgált törzs Gram-negatív.

5.1.5. MALDI-TOF-MS

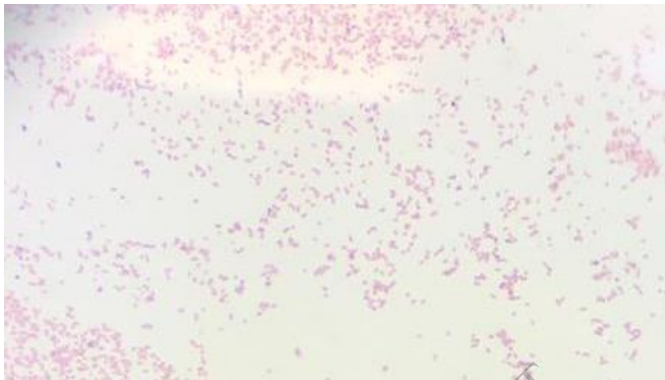
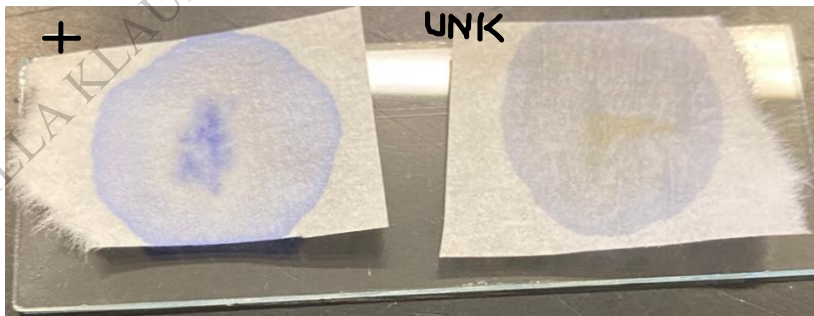
A vizsgálat alapja, hogy a mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometriával kapott fehérjeprofílok, ujjlenyomatként a faj alapú beazonosítás alapjául szolgálnak. A felvett spektrumokat a szoftver (Bruker Daltonic Compass programja) az adatbázisba gyűjtött referencia tömegspektrumokkal összehasonlítja. Az program azonosítási paramétereit és a kapott eredményt a 5. táblázatban összegeztem.

5. táblázat: Bruker MALDI-TOF MS azonosítási program paraméterek.

Mintahely	D1, D2				
Minta elnevezése	UNK 26/10				
Vizsgálat időpontja	2022-10-27T11:41:01.501				
Minta típusa	Standard				
Azonosítási módszer	MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1				
Feldolgozási módszer	MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1				
ACQ módszer	D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par				
ACQ időbélyeg	2022-10-27T12:00:12.011				
AutoXecute módszer:	MBT_AutoX				
Használt taxonómiai fa	Taxonomy, Bruker Taxonomy, Projects, Saját izolatumok				
Mintahely	Minta elnevezése	Szervezet (legjobb egyezés)	Pontszám (1-3)	Szervezet (második legjobb egyezés)	Pontszám (1-3)
D1	UNK 26/10	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.15	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.03
D2	UNK 26/10	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.20	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.01

A vizsgált baktérium hagyományos módszerekkel és nagyműszeres analitikai berendezéssel történt vizsgálatainak eredményét az 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat: A baktérium azonosítása érdekében elvégzett tesztek szemléltető összefoglalása.

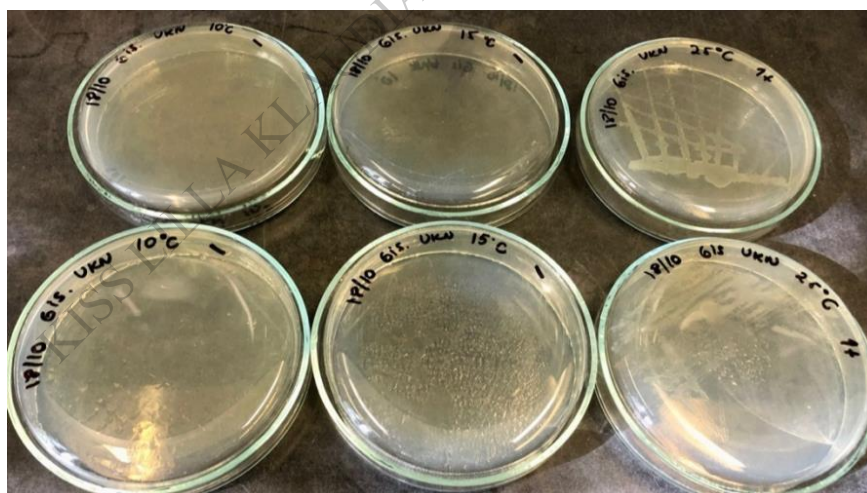
Teszt megnevezése	Eredmény
Gram-festés	Gram-negatív 
Kataláz próba	Kataláz pozitív 
Oxidáz próba	Oxidáz negatív 
Kálium-hidroxid teszt	Nyúlósodás megfigyelhető= Gram-negatív baktérium 
MALDI-TOF-MS	<i>Pantoea agglomerans</i>

5.1.6. Hőmérséklet-optimum meghatározása

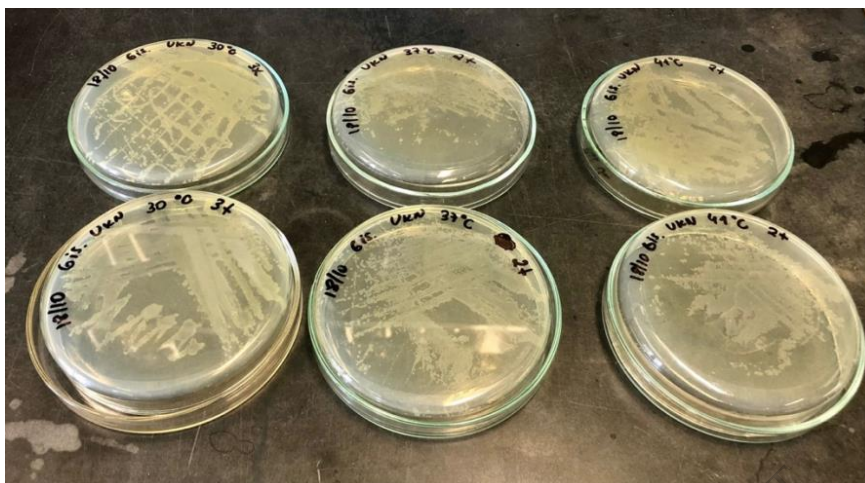
A hőmérséklet-optimum meghatározásához a törzsből készített szuszpenzióból kacsával történt a táptalaj felületére a leoltás, majd a leoltott csészék különböző hőmérsékleten lettek inkubálva. A *P. agglomerans* baktérium 24 óra elteltével (4. ábra és 5. ábra) 30 °C-on növekedett a leggyorsabban, 37 °C és 41 °C-on is számottevő növekedés volt megfigyelhető. 48 óra elteltével 15 °C-on is detektálhatóvá vált a növekedés. A 7. táblázatban szemléltetem a vizsgálat eredményeit.

7. táblázat: Hőmérséklet-optimum meghatározás értékelése

Hőmérséklet	10 °C	15 °C	25 °C	30 °C	37 °C	41 °C
Növekedés mértéke 24 óra után	-	-	+	+++	++	++
Növekedés mértéke 48 óra után	-	+	+	+++	++	++



4. ábra: *P. agglomerans* telepek növekedése 48 óra elteltével, különböző hőmérsékleti viszonyok mellett. Adott hőmérsékleten elvégzett két párhuzamos minta egy oszlopban, egymás alatt látható. Az első oszlop csészéi 10 °C-on, második oszlopé 15 °C-on, harmadik oszlop csészéi pedig 25 °C-on kerültek inkubálásra.

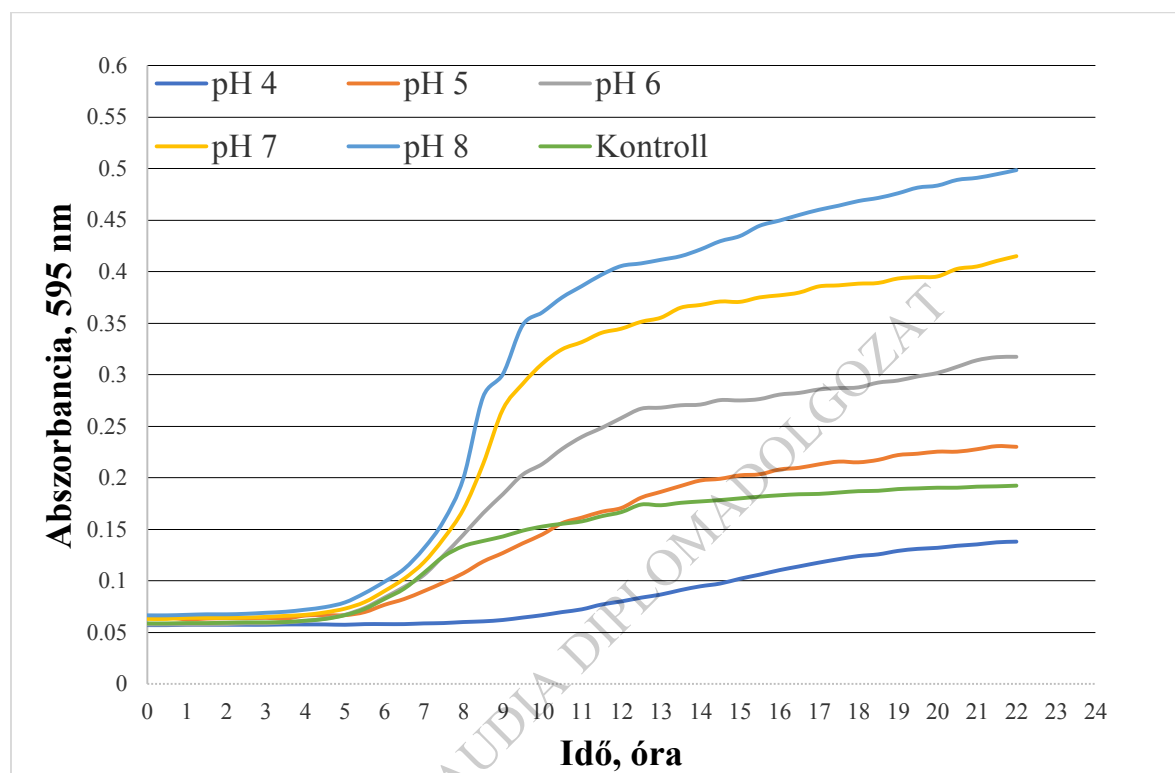


5. ábra: *P. agglomerans* telepek növekedése 48 óra elteltével, különböző hőmérsékleti viszonyok mellett. Adott hőmérsékleten elvégzett két párhuzamos minta egy oszlopban, egymás alatt látható. Az első oszlop csészéi 30 °C-on, második oszlopé 37 °C-on, harmadik oszlop csészéi pedig 41 °C-on kerültek inkubálásra.

5.1.7. pH-optimum meghatározása

A vizsgálat célja az volt, hogy megállapítsuk a *Pantoea agglomerans* szaporodásának optimális pH körülményeit. A Multiskan berendezés által rögzített abszorbancia értékek feldolgozása után (kiugró értékek törlése, három párhuzamosból származó mérési adatok átlagolása) ábrázolni tudjuk a különböző pH-jú táplevesekben történő sejtszaporodást az idő függvényében (a mért abszorbancia érték egyenesen arányos a sejtszámmal ezáltal közvetett információt szolgáltat a szaporodási sebességről). Az 6. ábráról leolvassva megállapítható, hogy a vizsgálat során felhasznált pufferelt táplevesek közül a 8-as pH értékű táplevesben volt a legintenzívebb a sejtszaporodás, Az exponenciális fázis ez esetben a legmeredekebb, ami a gyors sejtszaporodásra utal, továbbá ez a görbe éri el leghamarabb, legmagasabb abszorbancia értékkel, a kezdeti stacioner fázist. Szorosan követi a pH 7-es minta és pH 6-os minta. Savas környezeti viszonyok mellett is megfigyelhető szaporodás, de csak lassan és kis mértékig. Emellett 4-es pH-n nagyon kitolódott a lag fázis. A kontrollként vizsgált nem pufferelt TGE táplevesben a sejtszaporodás lag és exponenciális fázisa kezdetekben a 6-os pH-jú mintáéval megegyező, megközelítőleg 8 óra elteltével viszont hirtelen csökkenést tapasztalhatunk a szaporodási sebességben és legkorábban ez esetben áll be a

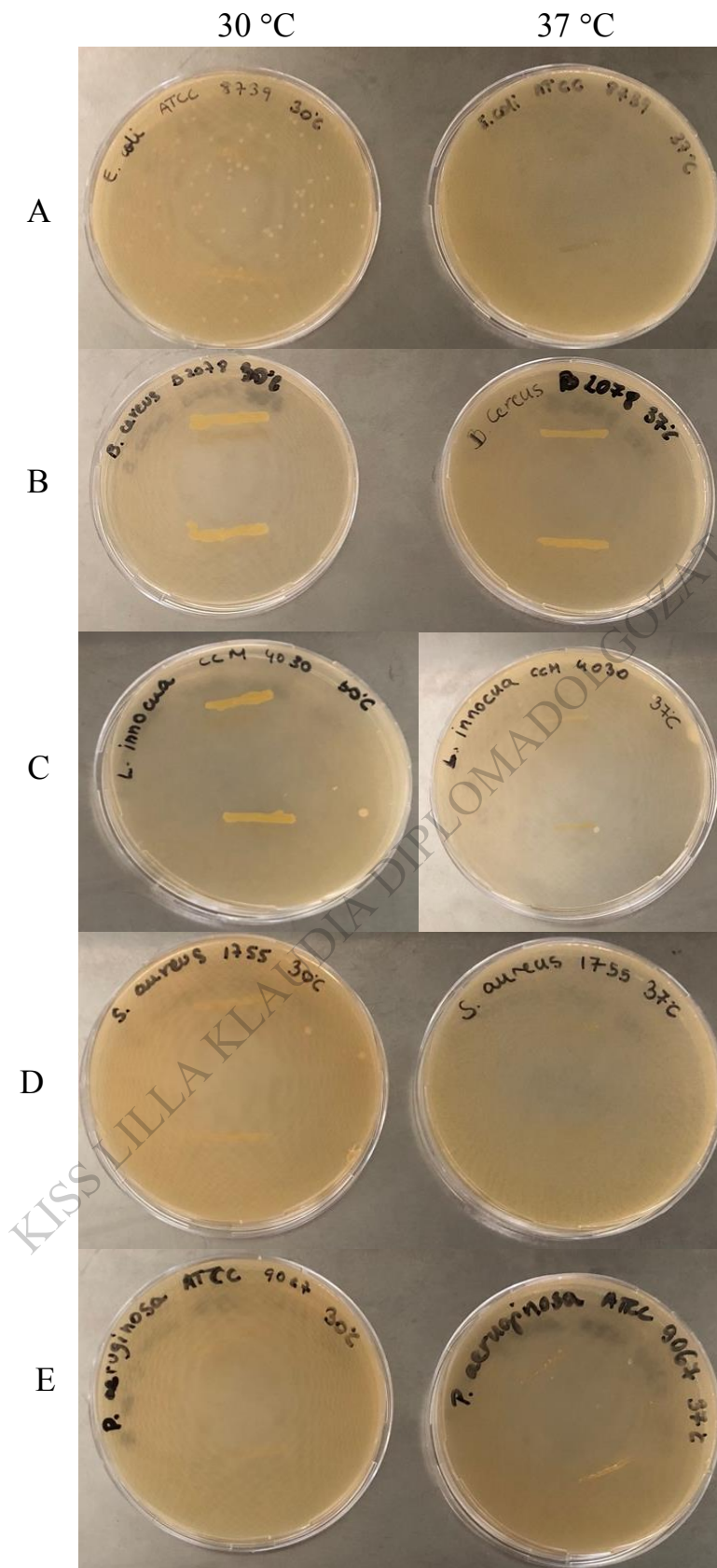
korai stacioner fázis. Ebből arra következtethetünk, hogy a nem pufferelt táplevesben a baktériumsejtek savas kémhatású anyagot termeltek. A vizsgálati eredmények összefüggenek a szakirodalomban talált adatokkal, miszerint a *P. agglomerans* szaporodása neutrális, enyhén lúgos környezetben a legintenzívebb.



6. ábra: A *Pantoea agglomerans* szaporodási sebessége a pH függvényében.

5.1.8. *Pantoea agglomerans* gátló hatása a vizsgált baktériumokkal szemben

Feltételezhető, hogy a *P. agglomerans* gátló mechanizmusai között szerepelhet antibakteriális vegyület termelése. A kísérlet során az általunk vizsgált *Pantoea agglomerans* törzs esetleges antibakteriális vegyület termeléséről kívántunk információt kapni. A beoltást követő 48 órában, a vizsgált hőmérsékleteken (30 °C, 37 °C) inkubált csészék egyikében sem volt megfigyelhető gátlásra utaló feltisztulási zóna.



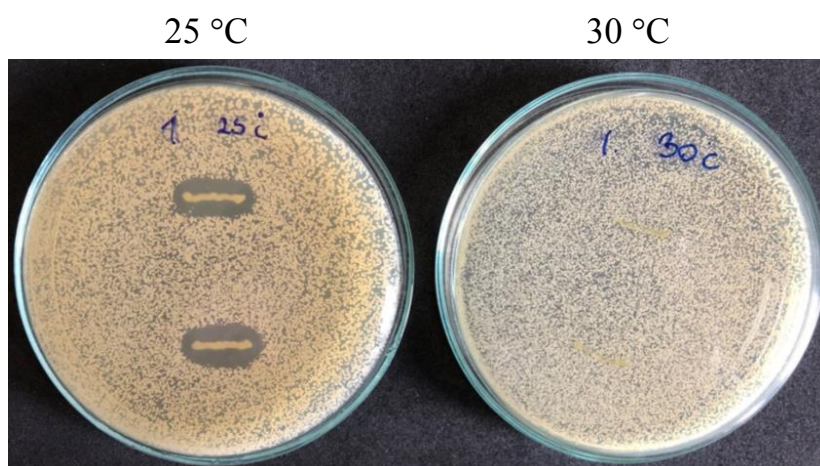
7. ábra: *P. agglomerans* hatásának vizsgálata különböző baktérium tenyészetekkel szemben 30 °C és 37 °C-on inkubálva. (A: *Escherichia coli*; B: *Bacillus cereus*; C: *Listeria innocua*; D: *Staphylococcus aureus*; E: *Pseudomonas aeruginosa*)

Különbség figyelhető meg a *P. agglomerans* telepek fejlődésében a korábbi megállapítással összhangban, átlagosan elmondható, hogy 30 °C-on a sejtek gyorsabban szaporodtak, mint 37 °C-on (beoltott vonal vastagságából következtethetünk). A gátlás hiánya a 7. ábrán bemutatott *E. coli* -t tartalmazó 30 °C-on inkubált csészében látszik a legjobban, ahol a gátolni kívánt baktérium egyértelműen benövi a *P. agglomerans* oltások helyét is. Érdekesség továbbá, hogy néhány gátolni kívánt baktérium esetében szemmel csak nehezen látható mértékű telepképződés történt. A jobb kiértékelés érdekében célszerű lehet a kísérletet magasabb sejtszámú baktérium szuszpenzióval elvégezni, esetleg a táptalaj optimalizálásával elősegíteni a gyorsabb növekedést. Továbbá nagyobb hangsúlyt szükséges fektetni a szennyeződések elkerülésére, mivel több csésze esetében megfigyelhető szennyezőtől származó telepképződés (pl. *L. innocua* esetében).

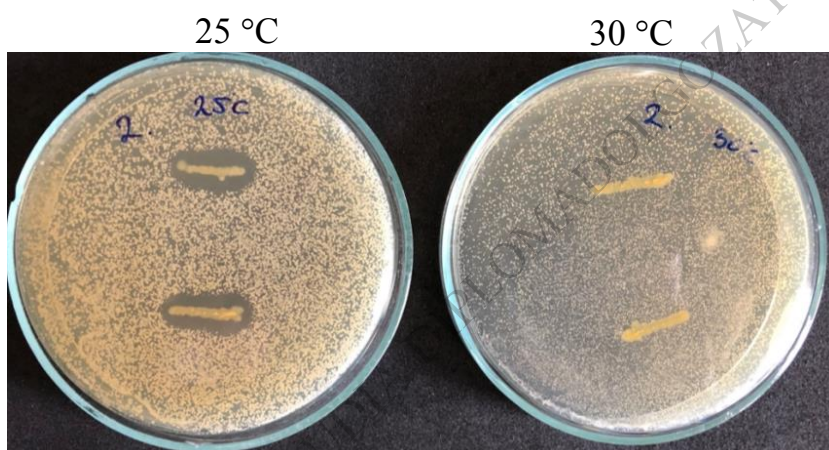
A vizsgálati eredmény arra enged következtetni, hogy az antimikrobás vegyület termelése esetleg több időt vesz igénybe vagy más hőmérséklet tartományban mehet végbe. Illetve azzal is számolnunk kell, hogy az általunk vizsgált törzs nem képes antibakteriális vegyület termelésére.

5.1.9. *Pantoea agglomerans* gátló hatása a vizsgált élesztőgombákkal szemben

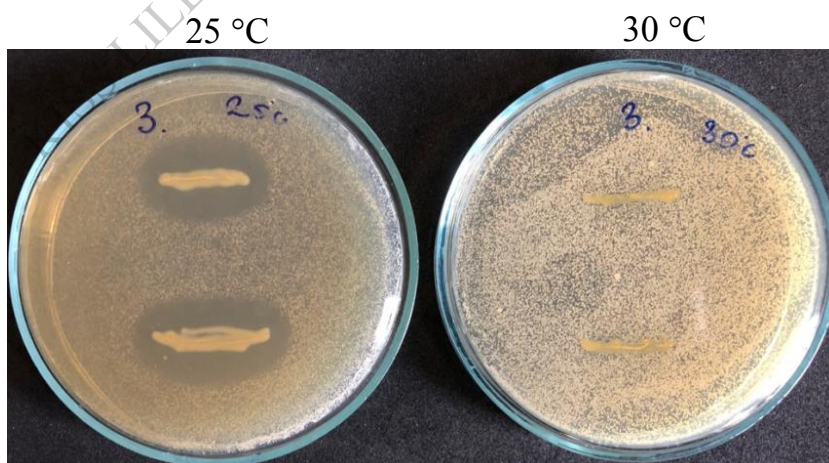
Az élesztőgombák általános szaporodási hőmérsékletigényét figyelembe véve a gátló hatás vizsgálatát 25 °C és 30 °C-os inkubációs hőmérsékleten végeztük el, eltérően a baktériumok gátlását vizsgálni kívánt 30°C és 37 °C-os kísérleti beállítástól. A vizsgálat során a 25 °C-on inkubált mintákban a *P. agglomerans* képes volt az összes alkalmazott élesztőgomba szaporodását visszaszorítani. A 30 °C-on inkubált mintákban viszont nem volt megfigyelhető a feltisztulási zóna. Az eredményeket a 8-14. ábrákon mutatom be.



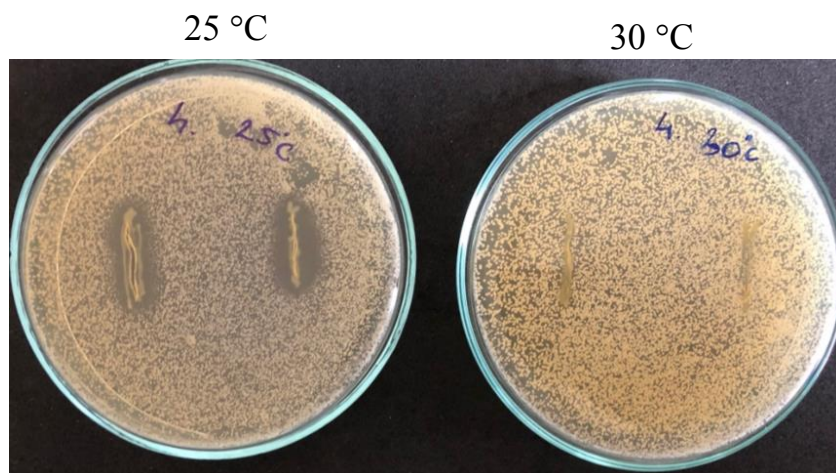
8. ábra: *P. agglomerans* gátló hatásának vizsgálata *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171 tenyészetekkel szemben 25 °C és 30 °C-on.



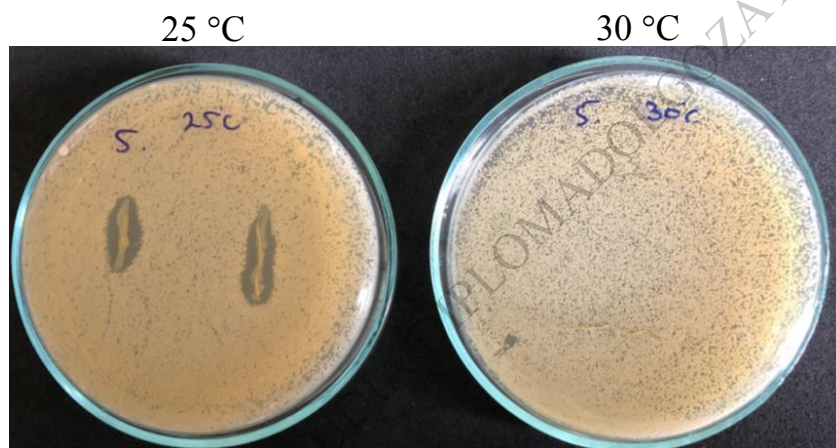
9. ábra: *P. agglomerans* gátló hatásának vizsgálata *Zygosaccharomyces lentus* Y1200 tenyészetekkel szemben 25 °C és 30 °C-on.



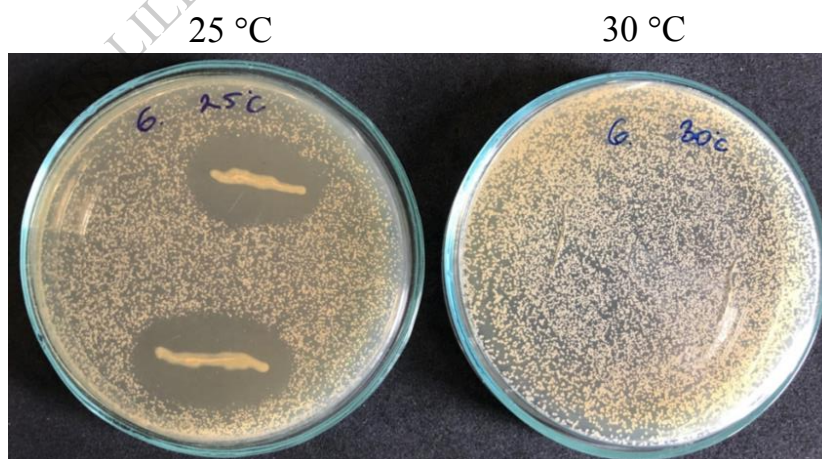
10. ábra: *P. agglomerans* gátló hatásának vizsgálata *Zygosaccharomyces rouxii* A9 tenyészetekkel szemben 25 °C és 30 °C-on.



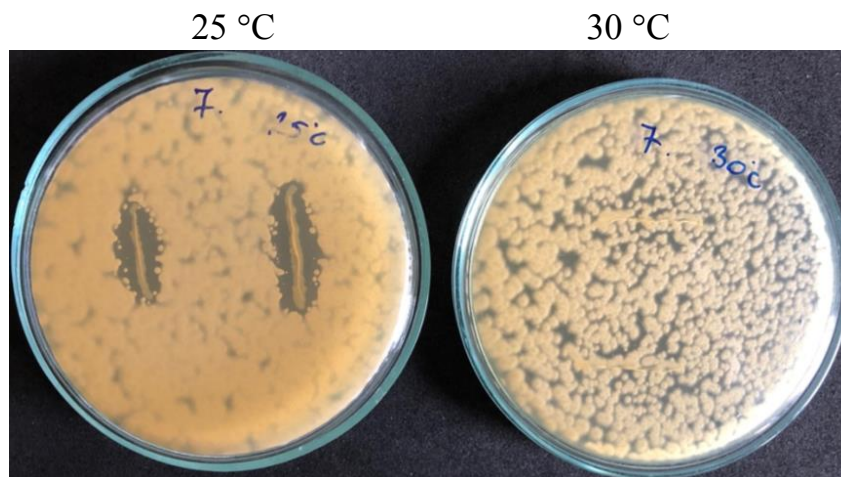
11. ábra: *P. agglomerans* gátló hatásának vizsgálata *Candida parapsilosis* Y1011 tenyészetekkel szemben 25 °C és 30 °C-on.



12. ábra: *P. agglomerans* gátló hatásának vizsgálata *Pichia anomala* J121 tenyészetekkel szemben 25 °C és 30 °C-on.



13. ábra: *P. agglomerans* gátló hatásának vizsgálata *Zygosaccharomyces bailii* PM167 tenyészetekkel szemben 25 °C és 30 °C-on.



14. ábra: *P. agglomerans* gátló hatásának vizsgálata *Galactomyces geotrichum* Y1011 tenyészetekkel szemben 25 °C és 30 °C-on.

A kapott eredmény alapján arra következtethetünk, hogy a *P. agglomerans* antimikrobás hatásáért felelős vegyület termelődése hőmérséklet függő, 25 °C-on termelődik, de 30 °C-on már nem. Tehát az 5.1.8. fejezetben bemutatott eredményekből levont következtetésünk, miszerint az általunk vizsgált törzs nem termel gátló hatású vegyületet a baktériumokkal szemben, megkérdőjelezhető. Az ott tapasztalt feltisztulási zóna hiánya magyarázható az ott alkalmazott magasabb hőmérsékleti körülményekkel. Annak érdekében, hogy kimutassuk a termelt antimikrobás vegyület termelését és bebizonyítsuk hőmérséklet függését következő lépésként az agarlyuk diffúziós vizsgálatot végeztük el.

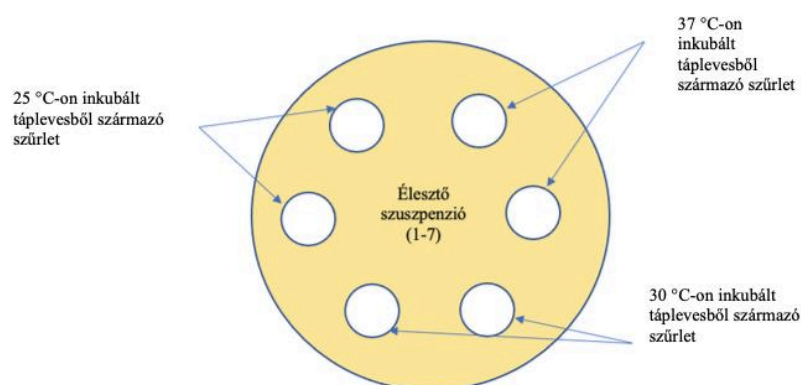
5.1.10. Agarlyuk diffúzió- feltételezett antimikrobás vegyület termelésének és hőmérséklet függésének vizsgálata

A vizsgálat célja a *P. agglomerans* antagonista hatásmechanizmusának jobb megismerése. Három különböző hőmérsékleten (25 °C, 30 °C, 37 °C) inkubált baktériumszuszpenziót tartalmazó táplevest alkalmaztunk (álló tenyészet). A 15. ábrán látható, hogy inkubációs idő leteltével a 25 °C-on és 30 °C-on inkubált minták enyhén zavarossá váltak, míg a 37 °C-on inkubált minta szinte teljesen áttetsző maradt. 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.



15. ábra: TGE táplevesben, különböző hőmérsékleten 24 óráig inkubált *P. agglomerans* tenyészetek. (Jobbról balra: 25 °C-on inkubált, 30 °C-on inkubált, 37 °C-on inkubált minta.)

E három különböző hőmérsékleten inkubált baktériumtenyészetből származó szűrleteket juttattunk az élesztőgombákkal leoltott táptalajok fűrt mélyedéseibe a 16. ábrán bemutatott elrendezés szerint. A minták 25 °C, 30 °C és 37 °C-on történő, 48 órás inkubálását követően nem volt megfigyelhető feltisztulási zóna a fűrt lyukakba jutott szűrlet körül. Függetlenül a baktériumszuszpenzió inkubálási hőmérsékletétől és a minták inkubálási hőmérsékletétől is. A megfigyelt eredmények alapján arra következtethetünk, hogy nem termel antimikrobás vegyületet a vizsgált baktérium. Előfordulhat, hogy a gátló hatását versengéssel fejt ki, vagyis a baktériumsejtek jobban képesek hasznosítani a rendelkezésre álló erőforrásokat az anyagcsere folyamataik során, mint az alkalmazott élesztőgomba sejtek. Mivel eredményeink ellentmondásosak a kontakt módszer eredményeivel, végső lépésként elvégeztünk egy módosított agarlyuk diffúziós vizsgálatot.



16. ábra: Agarlyuk diffúziós vizsgálat kísérleti elrendezése.

5.1.11. Módosított agarlyuk diffúzió- feltételezett antimikrobás vegyület termelésének baktérium koncentráció függésének vizsgálata

A 4.4.11. fejezetben leírt módosításokat annak érdekében végeztük el, hogy megállapítsuk a feltételeken termelt extracelluláris gátló vegyület termelése köthető-e a baktériumsejtszámhoz és/vagy a szaporodási fázishoz. A rázószekrényben történő inkubáció szemmel láthatóan elősegítette a gyorsabb szaporodást. A 17. ábrán megfigyelhető, hogy a kezdetben áttetsző táplevesek jelentősen bezavarosodtak.

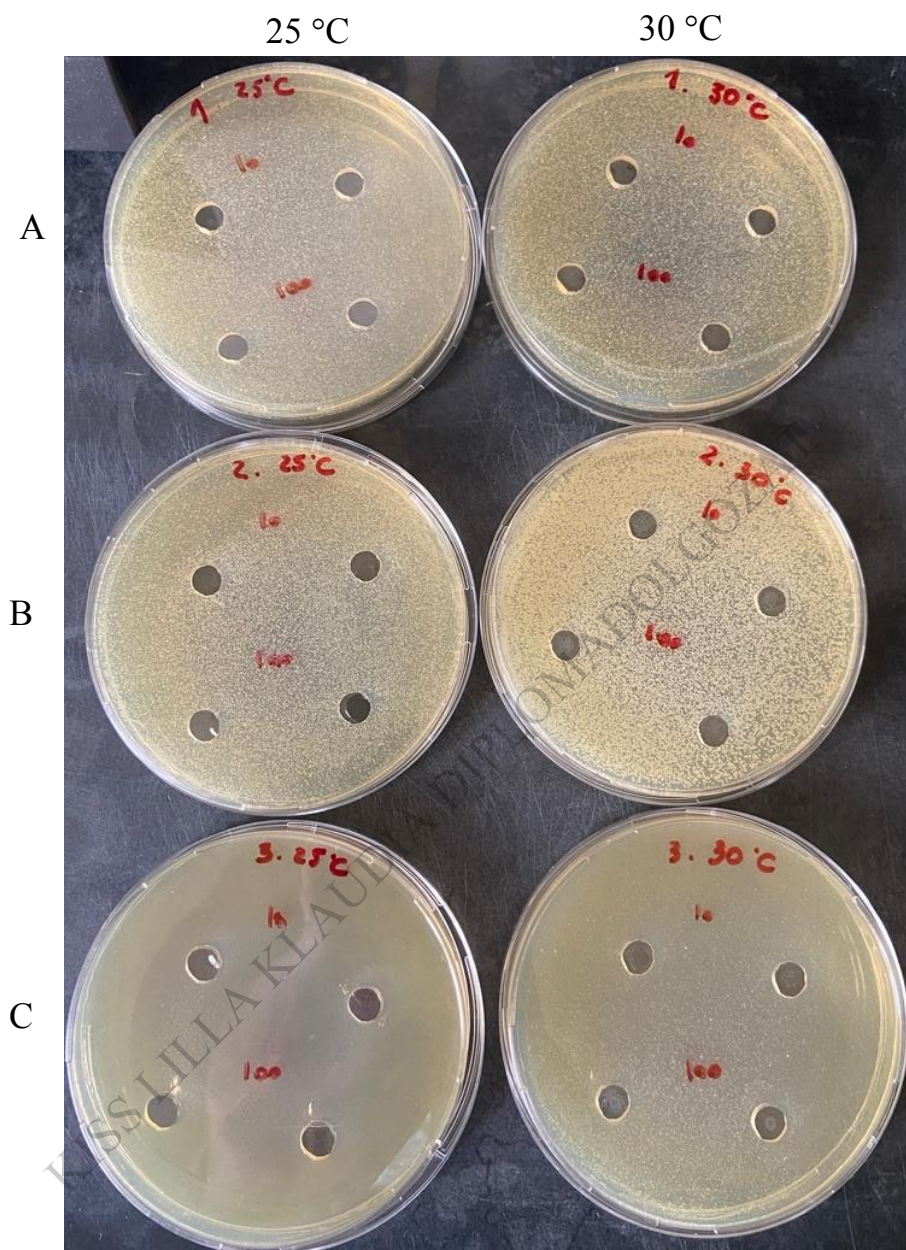


17. ábra: Különböző koncentrációjú baktériumszuszpenziókat tartalmazó táplevesek, 24 óra rázószekrényben töltött inkubáció után.

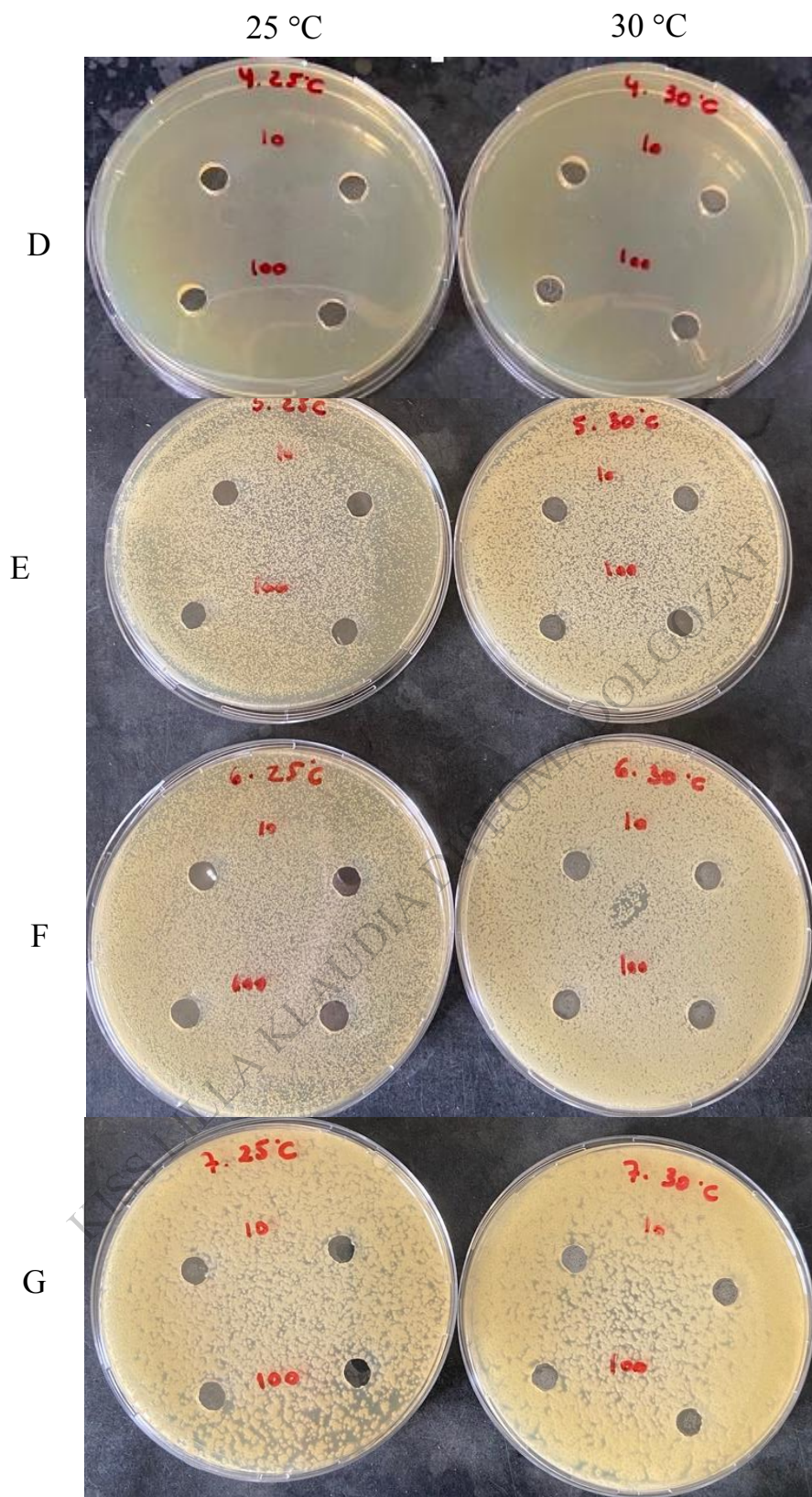
Két különböző kezdeti koncentrációjú (0,5 McFarland standardnak megfelelő denzitású baktériumszuszpenzió 10x-es és 100x-os hígítása) baktérium szuszpenziókból származó szűrletet juttattunk az élesztőgombákkal leoltott táptalajok fűrt mélyedéseibe. A mintákat azonos hőmérsékleten (25 °C-on) azonos ideig (24 óra) inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után, nem volt megfigyelhető feltisztulási zóna a fűrt lyukakba jutott szűrlet körül.

Függetlenül a kezdeti baktériumszuszpenzió koncentrációjától és a minták inkubálási hőmérsékletétől is. A kapott eredmény nem támasztja alá a feltevést, miszerint hőmérséklet

függő, extracelluláris antimikrobás vegyület termelése okozná a *P. agglomerans* élesztőgomba gátló hatását.



18. ábra: Különböző kezdeti sejtkoncentrációjú szuszpenzióból nyert szűrlet hatásának vizsgálata különböző élesztőgomba tenyészetekkel szemben 25 °C és 30 °C-on. (A: *Zygosaccharomyces lentus* Y1200; B: *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171; C: *Zygosaccharomyces bailii* PM167.)



19. ábra: Különböző kezdeti sejtkoncentrációjú szuszpenzióból nyert szűrlet hatásának vizsgálata különböző élesztőgomba tenyészetekkel szemben 25 °C és 30 °C-on. (D: *Zygosaccharomyces rouxii* A9; E: *Pichia anomala* J121; F: *Candida parapsilosis* Y1011; G: *Galactomyces geotrichum*.)

Érdekes továbbá, hogy a 19. ábrán bemutatott minták közül a *Zygosaccharomyces rouxii* A9, a korábbi vizsgálatok során azonos körülmények között szaporodott, jelen kísérlet során viszont nem látható telepképződés. Elképzelhető, hogy az élesztőszuszpenzió készítése közben valamilyen random hibát vétettünk, esetleg a vortex-elés nem volt elégséges és nem jutott elég sejt a YEPD táptalajra ahhoz, hogy az inkubációs időn belül láthatóvá váljon a telepképződés.

KISS LILLA KLAUDIA DIPLOMADOLGOZAT

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Hagyományos 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 az általunk vizsgált *Pantoea agglomerans* törzs szaporodásához szükséges hőmérséklet és pH optimumát vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy TGE táptalajon 30 °C-on, valamint 8 pH-jú pufferelt táplevesben volt a legintenzívebb szaporodás.

Kontakt módszerrel vizsgáltuk esetleges antagonista hatását élelmiszerbiztonsági jelentőségű baktériumokkal (*Escherichia coli*; *Bacillus cereus*; *Listeria innocua*; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*) szemben. A vizsgált kísérleti körülmények között (30 °C, 37 °C, 48 óra) nem volt megfigyelhető gátlásra utaló feltisztulási zóna a *P. agglomerans* beoltások körül. A szakirodalom számos élelmiszer eredetű patogén baktérium (köztük *E. coli*, *S. aureus*) sikeres gátlásáról számol be *P. agglomerans* törzsek által termelt bakteriocinek alkalmazásával. Így arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált *Pantoea agglomerans* törzs az alkalmazott kísérleti viszonyok között nem képes bakteriocin termelésére. Fontosnak tartom további vizsgálatok elvégzését, módosított beállítással (pl.: hosszabb inkubációs idő, pufferelt pH-jú táptalaj alkalmazása) annak érdekében, hogy a vizsgált törzs bakteriocin termelő képességét bebizonyítsuk vagy kellő biztonsággal megcáfolhassuk.

Kontakt módszerrel vizsgáltuk továbbá a *P. agglomerans* tenyészetünk antimikrobás hatását élelmiszerbiztonsági szempontból nagy jelentőségű élesztőgombákkal (*Zygosaccharomyces lentus* Y1200; *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171; *Zygosaccharomyces bailii* PM167; *Zygosaccharomyces rouxii* A9; *Pichia anomala* J121; *Candida parapsilosis* Y1011; *Galactomyces geotrichum*) szemben. A vizsgált kísérleti körülmények között (25 °C és 30 °C, 48 óra) YEPD táptalajon 25 °C-on minden vizsgált élesztőgomba esetében megfigyelhető volt feltisztulási zóna a *P. agglomerans* beoltások körül. Ellentétben 30 °C-on nem történt gátlás. Valószínűsíthető, hogy az általunk vizsgált törzs 25 °C-on képes termelni valamilyen antimikrobás hatású vegyületet.

További vizsgálatokat végeztünk az antimikrobás extracelluláris vegyület termelésének beigazolására. Az agarlyuk diffúziós vizsgálatok során alkalmazott szűrletek egyike sem eredményezett feltisztulási zónát a különböző élesztőkkel beoltott táptalajokon az

alkalmazott beállítások mellett (i) a baktériumtenyészet inkubálási hőmérséklete (25 °C, 30 °C, 37 °C), (ii) kiindulási koncentrációja (0,5 McFahrland standardnak megfelelő denzitású baktériumszuszpenzió 10x-es és 100x-os hígítása) (iii) álló vagy ráztatott tenyésztés alkalmazása, valamint (iv) a leoltott minták inkubációs hőmérséklete.

Az átfogó kísérleti eredmények alapján az alábbi következtetéseket vontam le:

- A kontakt módszer pozitív eredménye alátámasztja, hogy a *Pantoea agglomerans* rendelkezik biokontroll potenciállal. A gátlómechanizmus pontosabb megértése érdekében további vizsgálatok szükségesek.
- Ezen dolgozat keretein belül elvégzett kísérletek nem bizonyítják egyértelműen antimikrobás vegyület termelését. Al-Arabi (2002) kísérlete során azt bizonyította, hogy a szűrlet hatásossága 6-7 napos inkubálást követően volt a leghatékonyabb, ez alapján módszerfejlesztés során ajánlott hosszabb inkubációs idővel tervezni.
- A kapott eredmények arra utalhatnak, hogy a *P. agglomerans* élesztőgombákkal szembeni antagonista hatását versengés során fejtheti ki.
- 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.

IRODALOMJEGYZÉK

- Al-Arabi K. F. (2002): Biológiai védekezés lehetősége antagonist baktériumok felhasználásával néhány fontos baktériumos növénybetegséggel szemben. Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növénykórtani Tanszék, Doktori értekezés, Budapest. http://phd.lib.uni-corvinus.hu/368/2/khadija_faraj_alarabi_thu.pdf
- Arena, M. P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., Fiocco, D. (2016): Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. *Frontiers Microbiology, Section Food Microbiology*. 7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00464>
- Belák A., (2014): A biológiai kontroll alkalmazási lehetőségei élelmiszer eredetű patogén baktériumok gátlására. *Élelmiszervizsgálati közlemények*. 60(3): 56-64.
- Bigot, B., Lee, W. J., McIntyre, L., Wilson, T., Hudson, J. A., Billington, C. (2011): Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. *Food Microbiology*. 28(8):1448-1452. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.07.001>
- Bigwood, T., Hudson, J. A., Billington, C. (2009): Influence of host and bacteriophage concentrations on the inactivation of food-borne pathogenic bacteria by two phages. *FEMS Microbiology Letter*. 291(1):59-64. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01435.x>
- Bueno, E., García, P., Martínez, B., Rodríguez, A. (2012): Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 158(1):23-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.012>

- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Delgado, J., Viñas, I. (2002): Water activity, temperature, and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Canadian Journal of Microbiology*. 48(12):1082-1088. DOI: <https://doi.org/10.1139/w03-001>
- Darvas B. (szerk.) (2008): A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon. MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, Budapest, ISBN 978-963-87178-2-5
https://mek.oszk.hu/09900/09969/html/#_Toc305227494
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., Skórska, C., Góra-Florek, A., and Milanowski, J. (2016a): *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part II. Deleterious effects: Dust-borne endotoxins and allergens – focus on grain dust, other agricultural dusts and wood dust. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*., 23(1): 6-29.
DOI: <https://doi.org/10.5604/12321966.1196848>
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Kinga Lemieszek, M., Golec, M., and Milanowski, J. (2016b): *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 23(2):197-205.
DOI: <https://doi.org/10.5604/12321966.1203878>
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., and Milanowski, J. (2016c): *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 23(2): 206-222. DOI: <https://doi.org/10.5604/12321966.1203879>
- Farkas J., Mohácsiné Farkas Cs. (2014): Baktériumok kommunikációja és annak élelmiszer-tudományi jelentősége. Élelmiszervizsgálati Közlemények (60)1: 38-43
http://epa.oszk.hu/03100/03135/00255/pdf/EPA03135_elelmiszervizsgalati_kozlemenyek_2014_01_038-043.pdf

- Fratafico, P. M., Whiting, R. C. (1995): Ability of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J to Lyse Gram-Negative Food-Borne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Journal of Food Protection*. 58(2): 160-164. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.2.160>
- Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J., Loessner, M. J. (2012): Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *International Journal of Food Microbiology*. 154(1-2):66-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.023>
- Han D. Y., Coplin D. L., Bauer W. D., Hoitink H. A. (2000): A rapid bioassay for screening rhizosphere microorganisms for their ability to induce systemic resistance. *Phytopathology*. 90(4): 327–332. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.4.327>
- Hsieh T.F., Huang H. C., Erickson R. S. (2005): Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans*. *Journal of Phytopathol.* 10: 608–614. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01027.x>
- Hulot, J.F., Hiller, N. (2021): Exploring the benefits of biocontrol for sustainable agriculture – A literature review on biocontrol in light of the European Green Deal, Institute for European Environmental Policy. <https://ibma-global.org/wp-content/uploads/2021/06/IEEP-Exploring-the-benefits-of-biocontrol-for-sustainable-agriculture-2021.pdf>
- Kazi, M., Annapure, U.S. (2016): Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of Food Science and Technology* 53: 1355–1362. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1996-8>
- Kim, IY., Lew, B., Zhao, Y., Korban, S. S., Choi, H., Kim, K. (2022): Biocontrol of fire blight via microcapsule-mediated delivery of the bacterial antagonist *Pantoea agglomerans* E325 to apple blossoms. *BioControl*. 67: 433–442. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10526-022-10150-w>

- László Gy. (2013): Biológiai növényvédelem Magyarországon. *Biokultúra*. 24(2):18-23. https://www.biokontroll.hu/wp-content/uploads/2018/06/Biokultura_2013-2.pdf
- Sharma, M., Patel, J. R., Conway, W.S., Ferguson, S., Sulakvelidze, A. (2009): Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce. *Journal of Food Protection*. 72(7):1481-1485. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.7.1481>
- Verhagen B., Trotel-Aziz P., Jeandet P., Baillieul F., Aziz A. (2011): Improved resistance against *Botrytis cinerea* by grapevine-associated bacteria that induce a prime oxidative burst and phytoalexin production. *Phytopathology*. 101(7): 768–777. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHTO-09-10-0242>
- Zhang, H., Wang, R., Bao, H. (2013): Phage inactivation of foodborne *Shigella* on ready-to-eat spiced chicken. *Poultry Science*. 92(1): 211-217. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02037>
- Zuber, S., Boissin-Delaporte, C., Michot, C., Iversen, C., Diep, B., Brüssow, H., Breeuwe, P. (2008): Decreasing *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) food contamination level with bacteriophages: prospects and problems. *Microbial Biotechnology*. 1(6): 532-543. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00058.x>

Internetes oldalak:

- Internet 1.:

<https://www.portfolio.hu/uzlet/20220217/nagy-pofont-kaphat-a-klimavaltozas-miatt-az-agrarium-mit-lehet-ellene-tenni-526245>

utoljára megtekintve: 2023.05.07.

- Internet 2.:

https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Organic_farming_statistics

utoljára megtekintve: 2023.05.07.

- Internet 3:

<https://bioprotectionportal.com/resource/definition-of-biocontrol>

utoljára megtekintve: 2023.05.07.

- Internet 4.:

<https://ibma-global.org/wp-content/uploads/2020/12/ibma-definition-leaflet-web.pdf>

utoljára megtekintve: 2023.05.07.

- Internet 5.:

<https://bioprotectionportal.com/hu/resource/types-of-biocontrol-agents>

utoljára megtekintve: 2023.05.07.

- Internet 6.:

https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/746963/%C3%96KO_szerlista_PPnotPPP_20221213.pdf/4b3d7468-27b7-39d2-ee8d-11657db990ce?t=1670931090855

utoljára megtekintve: 2023.05.07.

- Internet 7.:

https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-MALDI-TOF-MS-mechanism-Note-The-analyte-matrix-mixture-is_fig4_282774426

utoljára megtekintve: 2023.05.07.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni konzulensemnek, Dr. Kovács Mónikának, a szakmai iránymutatását, megértő és támogató hozzáállását, amivel segítette munkámat. Köszönöm a megbeszélések és e-mailváltások során adott hasznos ötleteit és jó tanácsait, valamint, hogy rövid határidőn belül is mindig bizalommal fordulhattam hozzá kérdéseimmel.

Köszönet illeti az Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék munkatársait, főként Giseli Arruda PhD hallgatót, akivel a laboratóriumi kísérleteket közösen végeztük. Segítsége és együttműködése túlmutatott a laboratóriumi munkán, felmerülő kérdéseimet és kéréseimet mindig nyitottan fogadta, ezáltal nagyban hozzájárult a dolgozat elkészüléséhez. Thank you Giseli!

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom férjemnek és barátaimnak a sokoldalú támogatásáért, hogy megfelelő környezetet teremtettek a dolgozat elkészítéséhez, valamint születendő kislányunknak, az extra motivációért.

NYILATKOZAT

a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Kiss Lilla Klaudia
A Hallgató Neptun kódja: PEA4M2
A dolgozat címe: Szőlőnövényről származó baktérium és antimikrobás hatásának jellemzése
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: Élelmiszer-mikrobiológia,-higiénia és -biztonság Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió² egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

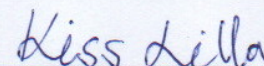
Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

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.

Kelt: Budapest, 2023.05.09.


Hallgató aláírása

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

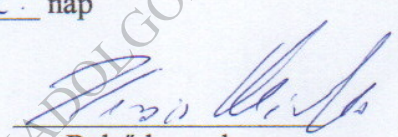
KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

A Kiss Lilla Klaudia (hallgató Neptun azonosítója: PEA4M2) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfólió¹ áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*3}

Kelt: 2023 év május hó 02 nap


Belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

³ A megfelelő aláhúzendő.