

# **Doktori értekezés tézisei**

**Kosztik Judit**

**Budapest**

**2021**



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**

**Egzotikus állatokból izolált tejsavbaktériumok  
azonosítása és jellemzése biotechnológiai  
hasznosíthatóság szempontjából**

**Kosztik Judit**

**Budapest**

**2021**

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Simonné Dr. Sarkadi Livia**

Egyetemi tanár, DSc

MATE Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Témavezető: **Batáné Dr. Vidács Ildikó**

Tudományos főmunkatárs, PhD

MATE Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Élelmiszer-biotechnológiai Kutatócsoport

### **A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:**

A jelölt a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

## 1. A munka előzményei, a kitűzött célok

A tejsavbaktériumok szénhidrát fermentálás során tejsavat termelnek. Erre sok baktérium faj képes, amelyek nem feltétlenül állnak rokoni kapcsolatban. A tejsavképzésük miatt az élelmiszeriparban régóta használják őket különböző tejtermékek, zöldségek és húskészítmények tartósítására, mivel a tejsav csökkenti a közeg pH-ját, ami gátolja a romlást okozó mikrobák elszaporodását.

Hosszú ideje folynak kutatások a tejsavbaktériumok mikotoxin-mentesítésre való alkalmazásával kapcsolatban is. A mikotoxinok penészgomba törzsek által termelt másodlagos anyagcsere termékek, amelyek a magasabb rendű gerincesekre egészségkárosító hatással lehetnek. Főként vese- és májkárosodást okozhatnak, de citotoxicitásuk és rákkeltő hatásuk is ismert. Ezen tulajdonságaik miatt a takarmányokban, illetve élelmiszerekben való megjelenésük meggátolása rendkívül fontos mind egészségvédő mind gazdasági szempontból is. Ezért fontos minél hatékonyabb módszerek kifejlesztése a mikotoxinok élelmiszerekben, valamint takarmányokban való megjelenésének megakadályozására, illetve egészségkárosító hatásaiknak gátlására.

Egyes tejsavbaktérium törzsekről ismert, hogy kis molekulatömegű anyagcseretermékeik révén képesek gátolni más mikroorganizmusok növekedését, szaporodását. Penészgombák növekedését gátló tejsavbaktériumok segíthetnek a mikotoxin-mentesítésben, hiszen, ha a penészgomba nem képes elszaporodni, akkor mikotoxint sem képes előállítani az adott termékben. Az is előfordulhat, hogy a penészgomba megjelenését és szaporodását nem sikerül megakadályozni, és a mikotoxin már jelen van a takarmányban, termékben. Mikotoxin-bontó mikroorganizmusok ugyan léteznek, de takarmányban, élelmiszerekben nagyüzemben történő alkalmazásuk erre a célra nem ismert. Ebben az esetben is hasznosak lehetnek egyes tejsavbaktérium törzsek, mivel szakirodalmi adatok alapján, bár toxint bontani nem tudnak, több törzs is képes sejtfelszínén megkötni a mikotoxin molekulákat. A felszínen megkötött toxin molekulák

érintetlenül áthaladhatnak az elfogyasztó állat/ember bélcsatornáján, ezáltal segítve a toxin kiürülését a szervezetből.

A legújabb kutatások szerint a gerincesek speciálisan adaptálódott tejsavbaktériumaikat a szülés-tojásrakás során továbbadják utódaiknak. Ez teszi lehetővé azt, hogy a gerinceseken belül akár adott fajokra specifikus mikroba törzsek jöhessenek létre. E mechanizmus miatt akár generációk óta állatkertben tartott egzotikus állatoknál is fennmaradnak a specializálódott tejsavbaktérium törzsek, melyek közé eddig fel nem fedezett fajok, vagy különleges képességű törzsek is tartozhatnak.

## **Munkám során a céljaim közt szerepelt:**

1. ***Egy nagy elemszámú tejsavbaktériumokból álló törzsgyűjtemény létrehozása.*** Ehhez 15, főként növényevő egzotikus állatkerti állat székletmintájából terveztem tejsavbaktériumok izolálását klasszikus mikrobiológiai módszerekkel, majd az izolátumok azonosítását molekuláris mikrobiológiai módszerekkel (genomi DNS kivonás, repetitív-PCR (rep-PCR), 16S rDNS PCR)
2. ***A törzsgyűjtemény tagjainak aflatoxin B1 termelő Aspergillus flavus penészgomba törzsekre kifejett esetleges gátló hatásának vizsgálata.*** Ehhez agar-diffúziós módszert terveztem alkalmazni, ahol a penészgomba és a tejsavbaktérium törzset szimultán tenyészttem.
3. ***A törzsgyűjtemény tagok aflatoxin B1 (AFB1), illetve szterigmatocisztin (ST) kötő képességének vizsgálata.*** A szakirodalom foglalkozik egyes tejsavbaktérium törzsek AFB1 kötő képességével, de a ST-nel kapcsolatban nincsenek adatok, így a törzsgyűjteményem AFB1 és ST adszorpciós képességének tesztelését, illetve összehasonlítását is szerettem volna elvégezni.

## 2. Anyag és módszer

**Törzsgyűjtemény létrehozása:** Munkám során a Fővárosi Állat és Növénykert következő 15 egzotikus állatának székletmintáival dolgoztam: Aldabrai óriásteknős (*Geochelone gigantea*), Bengáli botsáska (*Medauroidea extradentata*), Csupasz turkáló (*Heterocephalus glaber*), Emu (*Dromaius novaehollandiae*), Gorilla (*Gorilla gorilla*), Gyűrűsfarkú maki (*Lemur catta*), Indiai süllő (*Hystrix indica*), Koala (*Phascolarctos cinereus*), Mhorr-gazella (*Gazella dama mhorr*), Sisakos kazuár (*Casuaris casuaris*), Szélesszájú orrszarvú (*Ceratotherium simum*), Szürke óriáskenguru (*Macropus fuliginosus*), Tarvarjú (*Geronticus eremita*), Vombat (*Vombatus ursinus tasmaniensis*) és Vörös macskamedve (*Ailurus fulgens*). A kiválasztott állatok főként növényevők, habár közülük egyesek rovarokat is fogyasztanak. A választásban a táplálkozás azért játszott szerepet, mert a növényi eredetű táplálékkal bevitt mikotoxinja esetleg kialakult egy azzal boldogulni képes mikroflóra.

A mintavételt követően klasszikus mikrobiológiai módszerekkel tiszta tenyészetet hoztam létre az egyes törzsekből. A biomasszából genomi DNS-t vontam ki, majd rep-PCR-t készítettem, amiből agaróz gélelektroforézis révén mintázatot nyertem. A mintázat alapján csoportosítottam a törzseket és minden csoportból 2-3 darab törzsnek a 16S rDNS PCR amplikonját megszekvenáltattam a Baseclear Inc.-vel. A szekvencia adatokat az EzBioCloud adatbankban található 16S rRNS gén szekvenciákkal összevettem, ami alapján lehetővé vált az egyes csoportok faj szintű azonosítása.

***Aspergillus flavus* szaporodásának gátlása tejsavbaktériumokkal:** Négy különböző aflatoxin B1 termelő *A. flavus* penészgombatörzsből (Zt31, Zt41, Zt55, Zt80)  $10^6$  spóra/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettem Tween 80 tartalmú peptonvízben. A penészgomba törzseket 2009-ben izolálták kukorica silóból. Az így beoltott táptalajokból lemezeket öntöttem két lépésben. Előbb 10 ml-t öntöttem a Petri-csészébe, majd miután megszilárdult, a közepére 12 mm átmérőjű steril műanyag kupakot helyeztem, amit körbe öntöttem újabb 10 ml penészgombával beoltott táptalajjal. Szilárdulás után eltávolítottam a kupakot és a keletkezett mélyedésbe 100  $\mu$ l-t pipettáztam a vizsgálni kívánt tejsavbaktérium friss tenyészetének  $10^8$  sejt/ml koncentrációjú szuszpenziójából. Erre a módszerre azért volt szükség, mert így

kiküszöbölhetővé vált, hogy esetleg a baktérium szuszpenzió az agar és a Petri-csésze között szétszivárogjon, ami pontatlan eredményhez vezethetne. A Petri-csészéket 37 °C-os termosztátban 72 órán keresztül inkubáltam. Ezt követően lemértem a lyuk körüli gátlási zóna sugarát.

**Mikotoxin kötési vizsgálatok:** A tejsavbaktérium gyűjteményünk beazonosított mintáit, illetve a BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms) törzsgyűjteményből rendelt 25 db *Lactobacillus* faj típusörzset aflatoxin B1 és szterigmatocisztin megkötő képességük szempontjából is vizsgáltam.

Az optimális kísérleti paraméterek megállapítására előkísérleteket végeztem különböző *Lactobacillus* fajok törzseivel. Vizsgáltam a toxin hatását az egyes törzsek szaporodási képességére toxin jelenlétében, illetve az inkubációs idő hatását a toxin megkötődésére. Emellett azt is megvizsgáltam, hogy a toxin megkötődés mekkora csíraszámotól kimutatható.

Az előkísérletek eredményi alapján a vizsgált tejsavbaktérium törzseket 15 ml MRS táplevesben felnevesztettem és ehhez 0,2 ppm AFB1 vagy ST toxint adtam. Negatív kontrollként MRS táplevest használtam, míg pozitív kontrollként 0,2 ppm toxint tartalmazó MRS táplevest. A csöveket vortexeltem, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezt követően 40 percen keresztül 4.000 rpm-en centrifugáltam őket a felülúszó és a biomassza szétválásához. A felülúszót steril Falcon csöbe átöntöttem és további vizsgálatokig - 80 °C-on ultramélyhűtőben helyeztem el. A biomassza AFB1 vagy ST tartalmát HPLC segítségével határozták meg.

**Aflatoxin B1 és szterigmatocisztin mennyiségi meghatározása HPLC technikával:** A kontroll esetében a toxin extrakciójához a mintából 1 ml-t 2 ml térfogatú Eppendorf-csőbe mértem, majd 1 ml diklórmetánt adtam hozzá. 20 percig rázattam, mialatt a toxin átoldódott a táplevesből a diklórmetánba. Ebből pipettáztam át 0,2 ml-t 2 ml-es Eppendorf-csőbe, majd 50 °C-on bepároltam a mintákat a HPLC méréshez. A lecentrifugált biomasszát 0,2 ml metanol és 1,8 ml diklórmetán elegyével 20 percig rázattam, majd lecentrifugáltam. A metanol-diklórmetán fázisból 1 ml-t 50 °C-on bepároltam a HPLC méréshez.

**HPLC mérés:** A bepárolt mintákat 1 ml eluens oldatban feloldották és 0,45  $\mu\text{m}$  pórusméretű hidrofíl politetrafluoretilén filteren átszűrték a HPLC mérést megelőzően. Az izokromatikus folyadékkromatográfiás szeparációt követően a minták mikotoxin mennyiségét UV detektálással AFB1 esetében 365 vagy 240 nm hullámhosszon, míg a ST esetében 325 nm hullámhosszon határozták meg. A szeparáció Brisa (Technochroma, Spain) C18 oszlopon (5  $\mu\text{m}$ , 15 cm x 0.46 cm) 30 °C-on történt. A biomassza értékeit a pozitív kontroll (0,2 ppm AFB1, illetve ST tartalmú MRS tápleves) esetében kapott értékhez hasonlítottam.



### 3. Eredmények

#### **Egzotikus állatok székletmintáiból MRS táptalajon izolált mikrobák összetétele**

Állatkerti egzotikus növényevő állatok székletmintájából MRS tejsavbaktérium szelektív tápagon tenyésztettem ki a domináns baktériumokat. Állatonként 8-100 izolátumot gyűjtöttem. Legkevesebb a botsáskából (8), a legtöbb pedig a gyűrűsfarkú makiból (89) sikerült. A mintázatok vizsgálatánál szembetűnő felismerés, hogy egy állatfaj székletmintájából izolált törzsek, ha egy fajhoz tartoztak is, előfordult, hogy más mintázatot mutattak. Vagyis a mintázatok egy baktérium fajon belül törzsek szintjén is eltérőek lehetnek. Önmagában ez a tény megkérdőjelezhetné a módszer hasznosságát, ugyanakkor még így is jelentős költségmegtakarítással jár ennek a módszernek a használata, mivel előfordul ugyan egy-egy mintázat eltérés, de összességében a legtöbb törzs mintázata egyforma képet mutat egy adott fajon belül. Nagyon eltérő mikrobaösszetétel volt megfigyelhető a vizsgált minták között. Egyes állatok esetében, mint például a gorilla, a szürke óriáskenguru vagy épp az emu csak egy nemzetség különböző fajainak törzsei domináltak a mikrobiomban. Ezzel szemben a vombat, a szélesszájú orrszarvú és az tarvarjú esetében meglehetősen diverz mikrobiótát izoláltam. A koala esetében még ennél is diverzebb mikrobiótát találtam, sajnos azonban patogén fajokhoz tartozó törzsek is voltak közöttük, pl. *Shigella flexneri* vagy a fakultatív patogén *Escherichia coli*. Az MRS tápközegnek köszönhetően (amely szelektív a tejsavbaktériumokra nézve), néhány kivételtől eltekintve, a tejsavbaktériumokhoz tartozó nemzetségek fajainak törzseit sikerült izolálnom. Átlagosan elmondható, hogy ugyan állatonként 100 telepet izoláltam (kivételt képez a Bengáli botsáska, ahol csak 5 db telep nőtt ki a szélesztést követően), az izolátumok körülbelül 60% lett tartósan fenntartható. A fagyasztásra érzékenyebb törzsek a fagyasztást megelőzően hozzáadott glicerin ellenére sem voltak feléleszthetőek a későbbiekben.

**Aldebrai óriásteknős (*Geochelone gigantea*):** A 100 db fécész mintából izolált telepből mindösszesen 32 db minta szaporodott fel MRS táplevesben. Az izolátumok 41%-a tartozott a *Lactobacillus* nemzetség 3 különböző fajához, amik között a *L. paraplantarum* dominált. A

*Weisella* nemzetség egyetlen faja a *W. soli* képviseltette magát a minták között 22%-os részarányban. Az *Enterococcus* nemzetséghez a törzsek 9%-a tartozott 3 különböző faj között egyenlő eloszlásban, míg a *Pediococcus* nemzetséghez szintén 9%-a tartozott a törzseknek, ebben az esetben azonban minden törzs 1 fajhoz, a *P. pentosaceus*-hoz tartozott. Az izolátumok fennmaradó 19%-a a *Staphylococcus gallinarium* fajhoz tartozott, az ide tartozó izolátumok annak ellenére is felszaporodtak az MRS táplevesben, hogy az szelektív a tejsavbaktériumokra.

**Bengáli botsáska (*Medauroidea extrudentata*):** A székletmintából 12 db telep nőtt ki az MRS tápagar felszínén. Ebből az izolálás során 5 minta szaporodott fel MRS táplevesben, amelyek 80%-a *Enterococcus hormaechei* fajhoz tartozó törzs volt, míg a minták 20%-a, vagyis 1 törzs a *Cronobacterium zurichensis* fajhoz tartozott.

**Csupasz turkáló (*Heterocephalus glaber*):** A 100 db izolált telepből 85 db szaporodott fel MRS táplevesbe oltás során. Ezeknek a törzseknek 99%-a az *Enterococcus* nemzetség tagja. A fajok között a *E. faecalis* dominált, az összes törzs 91%-a ehhez a fajhoz tartozott. Mindösszesen 1 törzs tartozott a *Staph. epidermis* fajhoz, ami nem tartozik a tejsavbaktériumok közé, nevéből adódóan az állat bőrfelszínéről kerülhetett a féceszbe.

**Emu (*Dromaius novaehollandiae*):** A 100 db izolált telepből MRS táplevesben 45 db szaporodott fel. Ezek 100%-a az *Enterococcus* nemzetséghez tartozott. A törzsek 5 faj között nagyságrendileg egyenlő arányban oszlottak meg. A legnagyobb arányban az *E. mundtii* (26%) faj törzsei domináltak a minták között.

**Gorilla (*Gorilla gorilla*):** A 100 db izolált telep közül 51 db szaporodott fel MRS táplevesben. Ezek mindegyike a *Lactobacillus* nemzetséghez tartozott, és 6 különböző faj között oszlottak meg, dominánsnak a *L. kitatonis* faj bizonyult, amihez a minták 45%-a tartozott.

**Gyűrűsfarkú maki (*Lemur catta*):** Az izolált telepek közül 88 db szaporodott fel MRS táplevesben. A törzsek 81%-a (71 db) a *Lactobacillus paracasei*-hez tartozott, így ez a faj dominálta ezt a mikroba közösséget. A gorillához hasonlóan itt is a *Lactobacillus* nemzetség volt a domináns. A *Lactococcus* nemzetség *L. lactis* fajához a törzsek 11%-a tartozott. A *Leuconostoc lactis* fajhoz a törzsek 6%-a

tartozott, az *Escherichia coli* és az *E. pallensis* fajokhoz 1-1%-ban tartoztak törzsek.

**Indiai sül (*Hystrix indica*):** Az izolált mintákból 37 telep szaporodott fel MRS táplevesben. A törzsek 73%-a tartozott a *Lactobacillus* nemzetséghez. A *L. paraplantarum* dominált a teljes minta összetételt tekintve. A *Pediococcus* nemzetséghez a törzsek 24%-a tartozott (21% a *P. pentosaceus*, 3% *P. stilesii*).

**Koala (*Phascolarctos cinereus*):** Az izolált telepekből 55 db szaporodott fel MRS táplevesben. Sajnos a minták legnagyobb hányadát (45%) a kórokozó *Shigella flexneri* fajhoz tartozó törzsek tették ki. A törzsek 15%-a az *Enterococcus avium* fajhoz tartozott. Az *Escherichia* nemzetség két fajához a törzsek 12%-a tartozott. Az *E. coli* fakultatív patogén mikroba. Képviseltette magát 2-2%-ban a *Lactococcus*, a *Citrobacterium*, a *Leuconostoc*, az *Acinetobacterium* és a *Weissella* nemzetség is.

**Mhorr-gazella (*Gazella dama mhorri*):** Az izolált telepek közül 37 db szaporodott fel MRS táplevesben. A törzsek az 51%-a tartozott a *Pediococcus* nemzetség két fajához. A *P. acidilactici* volt a dominánsabb faj, összességében a törzsek 43%-a tartozott ide. Az *Enterococcus* nemzetséghez a törzsek 46%-a tartozott, a nemzetségen belül az *E. lactis* dominált. A *Lactobacillus* nemzetség *L. mucosae* fajához a törzseknek csak a 3%-a tartozott.

**Sisakos kazuár (*Casuarius casuarius*):** A 100 db izolált telepből 43 szaporodott fel MRS táplevesben. A törzsek döntő többsége (72%) a *Lactobacillus* nemzetséghez tartozott, ezen belül is a *L. salivarius* (58%) fajhoz. Az *Enterococcus* nemzetség fajainak törzsei is megtalálhatóak voltak a mintában, 12%-ban az *E. faecalis*, 7%-ban az *E. faecium*, 5%-ban az *E. hirae*, míg 2%-ban az *E. lactis*. A *Pediococcus* nemzetséghez a törzsek csupán 2%-a tartozott.

**Szélesszájú orrszarvú (*Ceratotherium simum*):** . Az izolált telepekből 40 db szaporodott fel MRS táplevesben. A törzsek legnagyobb része a *Lactobacillus* nemzetség (48%) *L. mucosae* (20%), *L. graminis* (13%) és *L. equi* (15%) fajaihoz tartozott. A *Pediococcus* nemzetségen belül a *P. pentosaceus* (18%) és a *P. acidilactici* (3%) fajok képviseltették magukat. Az *Enterococcus* nemzetség *E. hirae* és *E. mundtii* fajai 15-15%, illetve az *E. faecalis* faj törzsei 4%-ban voltak jelen.

**Nyugati szürke óriáskenguru (*Macropus fuliginosus*):** A székletmintából izolált 100 db telepből 69 db szaporodott fel az MRS táplevesben. A törzsek 93%-a az *Enterococcus* nemzetséghez tartozó 5 faj között oszlott meg, a legtöbb törzs az *E. faecalis* fajhoz tartozott, az összes izolátum 36%-ával. A *Lactobacillus* nemzetséghez a törzsek 7%-a tartozott (*L. pentosus*).

**Tarvarjú (*Geronticus eremita*):** Az MRS táplevesbe beoltott 100 telepből mindösszesen 32 db szaporodott fel. A törzsek 31%-a a *Lactobacillus* nemzetség fajihoz tartozott. A *L. crustorum* fajhoz tartozott a törzsek 19%-a, míg a *L. paraplantarum* fajhoz a törzsek 3%-a. Az *Enterococcus* nemzetséghez a törzsek 25%-a, míg *Pediococcus* nemzetséghez 22%-a tartozott.

**Vombat (*Vombatus ursinus tasmaniensis*):** Az MRS táplevesbe oltott 100 telepből 21 szaporodott fel. A törzsek 48%-a a *Pediococcus* nemzetséghez tartozott, egyenlő arányban a *P. lolii* (24%) és a *P. acidilactici* (24%) fajokhoz. A *Lactobacillus* nemzetséghez a törzsek 23%-a tartozott, leginkább a *L. reuteri* és a *L. salivarius* fajokhoz. Az *Enterococcus* nemzetséghez a törzsek 24%-a tartozott, míg a *Leuconostoc* nemzetséghez 5%.

**Vörös macskamedve (*Ailurus fulgens*):** Az MRS táptalajról izolált 100 telep közül 47 db szaporodott fel MRS táplevesben is. Az *Enterococcus* nemzetséghez tartozott a legtöbb izolált faj. A nemzetségen belül az *E. casseliflavus* faj dominált, a törzsek 32%-a tartozott ide. A *Lactococcus* nemzetséghez a törzsek 21%-a tartozott és a nemzetségen belül a *Lc. garvieae* faj dominált. A *Leuconostoc* nemzetségből egy faj, a *Leuc. lactis* jelent meg és a törzsek 13%-a tartozott ide.

### ***Aspergillus flavus* szaporodásának gátlása tejsavbaktériumokkal**

Meghatároztam tejsavbaktérium törzseim gátló hatását AFB1 termelő *A. flavus* penészgomba törzsek (Zt30, Zt40, Zt55, Zt80) szaporodására. Az élő tejsavbaktériumok mellett megvizsgáltam a sejtmentes felülűző valamint a heterofermentatív tejsavbaktériumok által termelt tejsav, ecetsav és etanol hatását is. A jó gátlási képességgel rendelkező SK29 felülűzőjét vizsgálva nem tudtam gátló hatást kimutatni egyik penészgomba törzs esetében sem. Ugyan így a tejsav, az ecetsav és az etanol sem mutatott gátló hatást. Ezekből az eredményekből arra

következtettem, hogy nem a tejsavbaktériumok által általánosan termelt szerves vegyületek okozzák a gátlást, hanem esetleg olyan bioaktív peptidek, amelyek csak a penészgomba jelenlétében termelődnek. Ezt erősítik meg a legújabb kutatások is a tejsavbaktériumok penészgomba gátlásával kapcsolatban (Luz *et al.* 2017, Muhialdin *et al.* 2020). A kísérlet során 19 különböző tejsavbaktérium fajhoz tartozó 82 törzset vizsgáltam. A négy aflatoxin termelésre képes *Aspergillus flavus* törzs esetében a *Lactobacillus salivarius*, a *L. crustorum*, a *L. paracasei*, a *L. plantarum* és a *Pediococcus pentosaceus* fajokhoz tartozó törzseknek volt a legjobb gátlási képességük. A legnagyobb gátlási zóna 5 mm széles volt és a sisakos kazuárból izolált egyik *L. salivarius* törzs esetében mértem.

Összefoglalva az eredményeimet elmondható, hogy mind a tejsavbaktériumok penészgomba gátló hatása mind pedig a penészgombák érzékenysége a tejsavbaktériumok jelenlétére erősen törzsfüggő, de kiválasztható néhány tejsavbaktérium faj, amelyek nagy valószínűséggel jó hatásfokkal gátolják penészgombák növekedését.

### Mikotoxin kötési vizsgálatok

A nagyszámú tejsavbaktérium törzsem toxin megkötési képességének vizsgálatához szükséges volt elvégezni néhány megelőző kísérletet az optimális paraméterek megtalálásához.

**A csíraszám hatása a toxin megkötésre:** A detektálható toxin megkötés csak a  $10^7$  sejt/ml koncentrációtól volt kimutatható mind az aflatoxin B1, mind a szterigmatocisztin esetében.

**Az inkubációs idő hatása a toxin megkötésre tejsavbaktériumok esetében:** Öt különböző *Lactobacillus* fajhoz tartozó törzset AFB1 toxinnal 10 percig, illetve 48 óráig inkubáltam. Három törzs esetében az inkubációs idő hossza érdemben nem befolyásolta a toxin megkötés hatékonyságát, egy esetben a hosszabb és egy esetben a rövidebb inkubációs idő volt hatékonyabb. A szakirodalmi adatok és praktikussági szempontból is a rövidebb időtartamot alkalmaztam a további mérések során.

**Toxinok hatása a tejsavbaktérium törzsek sejtszámára:** Mivel a mikotoxinok a magasabb rendű élőlények esetében komoly

egészségkárosító hatással bírnak, ezért felmerül a kérdés, hogy a baktériumok esetében is van-e bármilyen negatív hatásuk. Ezért a két toxinnak a baktériumok csíraszámára kifejtett esetleges negatív hatását is vizsgáltam. Méréseim alapján a vizsgált koncentrációban sem az AFB1 sem a ST nem okozott jelentős sejtszám csökkenést a kontrollhoz képest.

### **A *Lactobacillus* nemzetség AFB1 kötési kapacitása**

Aflatoxin B1 megkötés szempontjából 80 törzset teszteltem a saját törzsgyűjteményemből. Annak érdekében, hogy a *Lactobacillus* nemzetség fajainak AFB1 megkötő képességét minél átfogóbban tesztelhessem, törzsfát készítettem az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisban fellelhető összes *Lactobacillus* faj 16S rDNS szekvenciája alapján. A nagyobb kládok nem mindegyikéből volt törzs fellelhető a saját törzsgyűjteményemben, ezért a BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms) törzsgyűjteményből megrendeltem további 25 faj típus-törzset, amelyeket bevontam a toxinkötési vizsgálatokba. A saját törzsgyűjteményem 20 legjobb AFB1 kötési képességgel rendelkező törzsének, illetve a BCCM törzsgyűjteményből rendelt 25 törzs ST kötési képességét is vizsgáltam.

A legjobb kötési képességgel a vizsgált 105 törzs közül a *L. pentosus* TV3 (11,5%) és a *L. plantarum* faj AT26, AT3, AT1, AT27 (8-9%) törzsei rendelkeztek. Az összes vizsgált törzs közül 5% fölött csak 14 törzs volt képes a toxin kötésére. A vizsgált *Lactobacillus* fajok NCBI adatbázisban fellelhető típus-törzseinek 16S rDNS szekvenciáján alapuló törzsfát készítettem. Ezen megfigyelhető, hogy a legjobb toxinkötő képességgel rendelkező *Lactobacillus* törzsek közeli rokonságban állnak. További 33 törzs esetében 3-4% közötti kötési kapacitást kaptam. A további vizsgált 58 törzs esetében kevesebb, mint 3% volt a megkötés.

### **A *Lactobacillus* nemzetség szterigmatocisztin kötési kapacitása**

A 14 legjobb AFB1 megkötési eredménnyel rendelkező saját törzsgyűjteményemben megtalálható törzs mellett a 25 BCCM törzsgyűjteményből rendelt törzs szterigmatocisztin megkötő képességét is teszteltem. Nincs adat a szakirodalomban arról, hogy tejsavbaktériumok szterigmatocisztin megkötő képességét vizsgálták volna korábban. Az eredmények azt mutatják, hogy a *L. plantarum* TV1, AT1, AT3, AT5, a *L. paracasei* MA8 és a *L. pentosus* TV3 törzsek

rendelkeznek a legjobb ST kötő képességgel. Ezek a törzsek 0,2 ppm ST koncentráció mellett több mint 20%-os kötést mutattak. Ahogy az AFB1 esetében, úgy itt is a jó kötési képességekkel rendelkező törzsek közeli rokonágban álló fajokhoz tartoznak, mi több, a legjobb AFB1 és ST kötő fajok között átfedés van.

Munkám során kiemelt figyelmet szenteltem a *Lactobacillus* nemzetség toxinkötési potenciáljának vizsgálatára. Ugyanakkor más nemzetségek fajai is a tejsavbaktériumokhoz tartoznak. Egy átfogóbb képhez ezeknek a nemzetségeknek a törzseit is érdemes vizsgálni. A tejsavbaktérium törzsgyűjteményem számos nem *Lactobacillus* nemzetséghez tartozó törzset is tartalmaz, így ezek jelentős részének is megvizsgáltam AFB1 kötési képességét.

#### ***Enterococcus* törzsek AFB1 kötő kapacitása**

Hús *Enterococcus* törzs AFB1 kötő képességét vizsgáltam. A vizsgált törzsek között a legmagasabb kötési értékekkel az *E. hirae* AT12 (4,62%) és az *E. lactis* SK34 (3,40%) törzsek rendelkeztek. A többi törzs esetében a kötés 1,61% alatt volt.

#### ***Pediococcus* törzsek AFB1 kötési kapacitása**

A *Pediococcus* nemzetség 24 törzsének AFB1 kötési képességét vizsgáltam meg. Ezek közül 8 törzs a *P. acidilactici*, 3 törzs a *P. lolli*, 12 törzs a *P. pentosaceus* és 1 törzs a *P. stilesii* fajokhoz tartozott. A vizsgált törzsek közül a *P. acidilactici* OR83 törzs bizonyult a legjobb AFB1 megkötőnek. A többi törzs 4% körüli vagy az alatti megkötési értéket mutatott.

#### ***Pediococcus* törzsek ST kötési kapacitása**

Öt *Pediococcus* nemzetséghez tartozó törzs ST megkötő képességét vizsgáltam. A megkötési értékek 9-18% között voltak. Ezek az eredmények megerősítik a *Lactobacillus* nemzetség törzseinél látottakat, miszerint a vizsgált tejsavbaktérium törzsek ST megkötő képessége kétszerese az AFB1-nek. Ezidáig a szakirodalomban nem volt publikált adat *Pediococcus* nemzetséghez tartozó törzsek ST kötő képességével kapcsolatban.

## ***Lactococcus* és *Weissella* nemzetség törzseinek AFB1 kötő kapacitása**

A törzsgyűjteményben ezekhez a nemzetségekhez tartozó törzsekből kevés van. Ezért a *Lactococcus formonensis* fajnak egy törzsét, a *Lc. garviae* fajnak is egy törzsét, míg a *W. soli* faj 3 törzsét tudtam vizsgálni. A *Lactococcus* törzsek 2,2-2,5% között kötöttek, míg a *Weissella* törzsek 0,7- 1,2% között.



## Új tudományos eredményeim

1. A Fővárosi Állat- és Növénykert egzotikus állatainak fécesz mintáit feldolgozva egy több mint 600 törzsből álló tejsavbaktérium törzsgyűjteményt hoztam létre.
2. Az indiai sül székletmintájából sikerrel izoláltam egy új mikroba törzset, amelyről kiderült, hogy nemcsak új faj, hanem új nemzetség is. A törzs a tudomány számára *Micrococcooides hystricis* néven lett leírva (Tóth *et al.* 2017).
3. Tizenkilenc különböző tejsavbaktérium fajhoz tartozó 82 törzs vizsgálatával átfogó képet kaptam a tejsavbaktérium törzsek *Aspergillus flavus* AFB1 toxint termelő törzsekre gyakorolt gátlási képességéről. A *Lactobacillus salivarius*, a *L. crustorum*, a *L. paracasei*, a *L. plantarum* és a *Pediococcus pentosaceus* fajokhoz tartozó törzseknek volt a legjobb gátlási képességük.
4. A *Lactobacillus* nemzetség típusörzseinek 16S rDNS szekvenciája alapján törzsfát készítettem és minden nagyobb klád AFB1 megkötő képességét teszteltem, a legnagyobb megkötési értékekkel (10% fölött) az egymáshoz filogenetikailag közel álló *L. pentosus*, *L. plantarum* és *L. graminis* fajok törzsei rendelkeztek.
5. Tudomásom szerint először én vizsgáltam a tejsavbaktériumok közül a *Lactobacillus* és a *Pediococcus* nemzetségek szterigmatocisztin megkötő képességét. Legmagasabb kötési értékekkel a *L. plantarum* (23%) és a *P. acidilactici* (18%) fajok törzsei rendelkeztek és a tejsavbaktérium törzsek szterigmatocisztin megkötése megközelítőleg kétszerese volt az aflatoxin B1 megkötésének.

## 4. Következtetések és javaslatok

Tarajos sülből sikerült izolálni egy új faj, új nemzetség törzset, amivel igazoltam, hogy érdemes egzotikus állatok mikrobiomjával foglalkozni.

A rep-PCR költséghatékonyabbá tette közel 1000 törzs faj szintű azonosítását.

Egyes tejsavbaktérium törzsek valóban képesek gátolni a penészgombák növekedését. Arra lehet következtetni, hogy a penészgomba jelenléte váltja ki a gátló metabolitok termelését a tejsavbaktériumokból.

A tejsavbaktériumok mikotoxin megkötési képességét aflatoxin B1 és szterigmatocisztin esetében teszteltem. A szakirodalmi adatokhoz képest alacsonyabb megkötési értékeket kaptam az AFB1 esetében. A szakirodalmi cikkekben nagy általánosságban a vizsgálatokat PBS pufferben végezték, míg én MRS táplevest alkalmaztam, amely jobban reprezentálja a tejsavbaktériumok természetes közegét. Ebből kifolyólag nem vehetőek jól össze az eredményeim az irodalomban szereplőkkel. Az irodalmi és az általam mért eredmények közötti különbség másik oka lehet, hogy az azonos fajhoz tartozó törzsek kötési képessége is nagyon eltérhet egymástól, amit Chapot-Chartier *et al.* 2010-ben megjelent eredményei is alátámasztanak. Leírták, hogy a megkötésben eddig a legnagyobb szereppel rendelkezőnek vélt peptidoglikánhoz egy sejtfal poliszacharid kapcsolódik kovalensen, egy réteget létrehozva körülötte. Ennek a poliszacharidnak a mennyisége a peptidoglikánon törzs szinten eltérő változatosságát mutathat.

A szterigmatocisztint kétszer nagyobb mértékben kötötték a tejsavbaktérium sejtek, mint az AFB1-et. Ennek oka egyrészt lehet az, hogy a szterigmatocisztin molekuláris struktúrája eltér az aflatoxin B1-étől, másfelől az is elképzelhető, hogy a tejsavbaktérium sejtfelszínén azáltal kötődik meg több ST, hogy ez a mikotoxin vizes közegben aggregátumokat képez, így egy kötőhelyhez egyszerre több ST molekula is kötődhet (Jakšić *et al.* 2019).

Terveim közt szerepel, hogy a törzsgyűjtemény *Enterococcus*, *Lactococcus* és *Weisella* nemzetségekhöz tartozó törzseinek szterigmatocisztin kötő képességét is vizsgáljam.

A legjobb toxinkötő képességekkel rendelkező törzseinkkel jelenleg is zajlanak állatetelési vizsgálatok. A szarvasmarhák

aflatoxinnal dúsított takarmányát toxinmegkötő tejsavbaktériumokkal egészítjük ki, és a tej aflatoxin M1 tartalmát mérjük a kontroll (tejsavbaktérium-mentes) takarmánnyal összevetve. A cél annak igazolása, hogy a tejsavbaktériumok megkötik a toxint és az állat bélcsatornáján végighaladva végül kiürülnek a szervezetből anélkül, hogy a toxin a tejebe jutna.

A tejsavbaktérium törzsgyűjtemény törzseinek kötő képességét további mikotoxinok, pl. patulin, zearalenon, ochratoxin esetében is érdemes lenne tesztelni.

Chapot-Chartier, M.P.; Vinogradov, E.; Sadovskaya, I.; Andre, G.; Mistou, M.Y.; Trieu-Cuot, P., *et al.* (2010): The cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *J. Biol. Chem.*, 285(14), 10464–10471.

Jakšić, D., Klarić, M.S., Crnolatac, I., Vujičić, N.S., Smrečki, V., Górecki, M., Pescitelli, G. & Piantanida, I. (2019): Unique aggregation of sterigmatocystin in water yields strong and specific circular dichroism response allowing highly sensitive and selective monitoring of bio-relevant interactions. *Marine Drugs*, 17(11), 629.

Luz, C., Saladino, F., Luciano, F.B., Mañes, J. & Meca, G. (2017): *In vitro* antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT - Food Science and Technology*, 81, 128-135.

Muhalidin, B.J., Aliboory, H.L., Kadum, H., Mohammed, N.K., Saari, N., ... & Hussin, A.S.M. (2020): Antifungal activity determination for the peptides generated by *Lactobacillus plantarum* TE10 against *Aspergillus flavus* in maize seeds. *Food Control*, 109, 106898.

Tóth, Á., Baka, E., Bata-Vidács, I., Luzics, Sz., Kosztik, J., Tóth, E., Kéki, Zs., Schumann, P., Táncsics, A., Nagy, I., Sós, E. & Kukolya J. (2017): *Micrococcoides hystricis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Micrococcaceae, phylum Actinobacteria, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2758-2765.

## 5. Kapcsolódó publikációk

### IF cikk

- Bata-Vidács I., **Kosztik J.**, Mörtl M., Székács A., Kukolya J. (2020): Aflatoxin B1 and sterigmatocystin binding potential of non-*Lactobacillus* LAB strains. *Toxins*, 12, 799. (Q1 - IF.: 3,531)
- Kosztik J.**, Mörtl M., Székács A., Kukolya J., Bata-Vidács I. (2020): Aflatoxin B1 and sterigmatocystin binding potential of lactobacilli. *Toxins*, 12, 756. (Q1 - IF.: 3,531)
- Tóth Á., Baka E, Bata-Vidács I, Luzics Sz, **Kosztik J.**, Tóth E, Kéki Zs, Schumann P, Táncsics A, Nagy I, Sós E, Kukolya J (2017): *Micrococoides hystricis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micrococcaceae*, phylum Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 2758–2765. (IF.: 2,089)

### Könyv fejezet

- Sárány D., **Kosztik J.**, Dobolyi Cs., Gregosits B., Kukolya J., Batáné Vidács I. (2019): *Aflatoxinnal szennyezett és kontroll silók mikrobaközösségeinek vizsgálata*. In: Gyuricza Csaba-Borovics Attila: Lendületben az agrárinnováció, pp. 151-166.

### Konferencia poszter/prezentáció

- Bata-Vidács I., **Kosztik J.**, Mörtl M., Székács A., Kukolya J. (2020): Aflatoxin B1 and sterigmatocystin binding ability of lactic acid bacteria. Toxicology Congress 2020, 22nd World Congress on Toxicology and Pharmacology; Webinar, June 14-15, 2020
- Kosztik J.**, Bata-Vidács I., Csernus O., Kukolya J. (2019): Lactic acid bacteria isolated from ruminant animals. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2020. október 14-16, Kecskemét, Magyarország. Book of Abstracts, pp. 20-21.
- Kosztik J.**, Luzics Sz., Inotai K., Tóth Á., Sárány D., Dobolyi Cs., Szekeres A., Bencsik O., Bata-Vidács I., Kukolya J. (2019): Effect of lactic acid bacterium and yeast strains on aflatoxin B1

production of *Aspergillus flavus*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2019. július 3-5.

- Kosztik J.**, Mörrtl M., Székács A., Batáné Vidács I., Kukolya J. (2019): A Fővárosi Állatkert növényevőiből származó *Lactobacillus* törzsgyűjtemény kialakítása, aflatoxin- és szterigmatociszintkötő képességük átfogó vizsgálata. IX. Ökotoxikológiai Konferencia, Budapest, 2019. november 22. Absztraktfüzet pp. 11-12. ISBN 978-615-81449-0-2
- Kosztik J.**, Luzics Sz., Sárkány D., Inotai K., Tóth Á., Kukolya J., Bata-Vidács I. (2018): Building up a LAB strain-collection from exotic animals and screening it for biotechnological applications. *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése, 2018. október 17-19., Eger*. Book of Abstracts pp. 53-54.
- Bata-Vidács I., Inotai K., Tóth Á., **Kosztik J.**, Luzics Sz., Sárkány D., Kukolya J. (2018): Development of microbial inoculum for preventing aflatoxin contamination in corn silo. *20th World Congress on Nutrition & Food Sciences "Nutrition, Food Science & Public Health*. Book of Abstracts p. 45.
- Tóth Á., Bata-Vidács I., Inotai K., **Kosztik J.**, Luzics Sz., Sárkány D., Kukolya J. (2018): Improvement of stillage based forage by lignocellulolytic bacteria. 20th World Congress on Nutrition & Food Sciences "Nutrition, Food Science & Public Health. Book of Abstracts p. 46.
- Luzics Sz., Ferenczi Sz., **Kosztik J.**, Sárkány D., Inotai K., Tóth Á., Bata-Vidács I., Kukolya J. (2018): *Lactobacillus salivarius* can affect aflatoxin production of *Aspergillus flavus* at different temperatures. *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése, 2018. október 17-19., Eger*. Book of Abstracts pp. 59-60.
- Sárkány D., Dobolyi Cs., Kocsubé S., Kiss N., Gregosits B., Luzics Sz., **Kosztik J.**, Inotai K., Tóth Á., Bata-Vidács I., Kukolya J. (2018): Monitoring of the aflatoxin B1 contamination of corn-silages. *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése, 2018. október 17-19., Eger*. Book of Abstracts pp. 85-86.

Bata-Vidács I., **Kosztik J.**, Ferenczi Sz., Winkler Zs., Kuti D., Juhász B., Kukolya J., Kovács K. (2018): Lactobacilli as potential psychobiotics – tests on mice. *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése, 2018. október 17-19., Eger. Book of Abstracts* p. 8.

**Kosztik J.**, Bata-Vidács I, Baka E, Tóth Á, Luzics Sz, Sós E, Kukolya J (2017) Dominant lactic acid bacteria of the gut microflora of exotic animals of the Budapest Zoo and Botanical Garden, Hungary. Infectious diseases, zoonoses and the one health concept in zoo and wild animals, 24-26. March 2017, Abstract book pp. 80-81.

**Kosztik J.**, Bata-Vidács I, Baka E, Tóth Á, Luzics Sz, Sós E, Kukolya J (2016): Investigation of lactic acid bacteria isolated from the exotic animals of the Budapest Zoo and Botanical Garden. In: Dr Márialigeti Károly (szerk.) A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium: absztraktkötet. Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2016.10.19-2016.10.21. Keszthely: Magyar Mikrobiológiai Társaság (MMT), p. 33. 1 p.