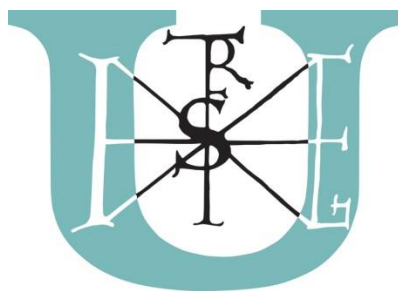


Doktori (PhD) értekezés tézisei

FÜSTÖS ZOLTÁN

Budapest

2016



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**ÉTKEZÉSI PAPRIKA (*CAPSICUM ANNUUM L. VAR. GROSSUM*)
TENYÉSZTHETŐ ENDOFITA BAKTÉRIUMAINAK BIODIVERZITÁSA
ÉS KOLONIZÁCIÓJUK MODELLEZÉSE**

FÜSTÖS ZOLTÁN

Budapest

2016

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Vatai Gyula
Egyetemi tanár, DSc
SZIE, Élelmiszertudományi Kar,
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

Témavezető: Dr. Maráz Anna
Professzor emerita, CSc
SZIE, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

Témavezető: Dr. Belák Ágnes
Egyetemi docens, PhD
SZIE, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az étkezési paprika világszerte ismert és kedvelt zöldségnövény, amelyet mind nyersen, mind főtt ételekben előszeretettel fogyasztanak, mivel kedvező íz és érzékszervi, valamint táplálkozás-élettani tulajdonságokkal bír.

Ezen terményt nagyon gyakran nyersen fogyasztják, tehát érdemes foglalkozni vele élelmiszerbiztonsági és mikrobiológiai szempontból is, mivel világszerte és európai szinten is egyre növekvő tendenciát mutatnak a nyers növényi élelmiszerekkel kapcsolatos megbetegedések. Ezek legnagyobb hányadát olyan baktériumokkal hozzák összefüggésbe, amelyek elsősorban állati eredetűek, de nem ismeretlenek a terményen/ben lévő opportunistá patogének okozta megbetegedések sem.

Ahhoz, hogy a növény - baktérium kapcsolatokat jobban megérthessük és ezen keresztül a termény élelmiszerbiztonsági kockázatát csökkenthessük, szükséges megismernünk a manapság szokványos agrotechnikákkal termesztett növények belsejében élő baktériumokat (endofitákat) mind minőségi, mind mennyiségi szempontból. Mivel az endofita baktériumok diverzitását nagymértékben befolyásolja az éghajlat, a termesztési körülmények, a növény faja és termesztett fajta, ezért kutatásom során két különböző termesztési körülmény között nevelt két eltérő paprika fajtát vizsgáltam. A növényekben élő baktériumok azonosításának szerepe azonban nemcsak biodiverzitásuk felderítésében lehet jelentős, hanem a humánpatogén és az opportunistá patogén baktériumok esetleges jelenlétének igazolásában is.

Az endofita baktériumok megnevezésük alapján két részre oszthatók. A feltételezett (véltetően, potenciálisan) endofita baktériumokra, amelyek felületileg fertőtlenített, tünetmentes növények belső szöveteiből detektált mikroorganizmusok, függetlenül a kimutatási technikától (hagyományos tenyésztéses vagy molekuláris technikák), valamint a valódi endofita baktériumokra. Ez utóbbi megnevezés odaítéléséhez az előbbieken túl mikroszkópos bizonyítékok is szükségesek a belső növényi szövetekben való lokalizációjukat illetően. A növény és az endofita baktériumok kapcsolatát általában mutualista jellegűnek tekintik, ahol a baktériumok a növény által szolgáltatott tápanyagokat használják fel és a számukra káros környezeti hatásokkal szemben védelmet nyújtó, belső növényi környezet oltalmát is élvezik. Ezzel szemben a növények stressz-tűrőképességük, valamint növekedésük serkentését köszönhetik a jótékony endofita baktériumoknak. Ezen baktériumok növényre kifejtett hatásukat egyrészt direkt módon a fito-hormonszerű anyagok termelése és az etilén szintjének szabályozása révén, másrészt indirekt módon a növénypatogénekkal szemben kifejtett inhibíciós hatásuk és a méreganyagok degradációja révén fejtik ki. Ismeretesek azonban olyan endofita baktériumok is, amelyek a humánpatogénekkal szemben fejtenek ki antagonista hatást. Az ilyen

tulajdonsággal bíró baktériumok esetlegesen felhasználhatók, mint biokontroll ágensek. Itt főként a tenyészthető endofiták emelendők ki, amelyeket a gyakorlatban is fel lehet használni ilyen célokra.

Doktori kutatásaim során célul tűztem két, manapság elterjedt termesztési körülmény között nevelt, két étkezési paprikafajta tenyészthető endofita baktériumainak izolálását, azonosítását, biodiverzitásuk vizsgálatát, valamint a paprikamagok csírázására gyakorolt hatásának vizsgálatát. Céлом volt továbbá kiválasztani mutualista törzseket és igazolni valódi endofita voltukat is. Végül vizsgálni kívántam humánpatogén, valamint ezeket modellező baktériumok paprika növénybe való bejutását paprikamag mesterséges fertőzésén keresztül, valamint *in vitro* inhibíciójukat kiválasztott valódi endofita törzsek hatására.

A célkitűzések megvalósításának a következő fő lépései voltak:

1. Feltételezhetően endofita baktériumok izolálása hagyományos (talajkultúrás) és új (hidroponikus) körülmények között nevelt Hó és Kárpia étkezési paprika fajtákból.
2. A feltételezhetően endofita izolátumok hasonlósági csoportokba rendezése fenotipizálás és RAPD-PCR-es (**R**andom **A**mplification of **P**olymorphic **D**N**A**-**P**olymerase **C**hain **R**eaction) genotipizálás alapján, majd ezt követően az egyes csoportokból kiválasztott reprezentatív törzsek molekuláris identifikálása az rRNS, illetve az *rpoB* gének szekvenciái alapján.
3. A törzsek biodiverzitásának és rokonsági kapcsolatainak vizsgálata filogenetikai analízissel: filogenetikai törzsfá szerkesztése a baktérium törzsek 16S rRNS génszekvencia adatai alapján, ezt követően egy-egy reprezentatív törzs kiválasztása a törzsfák taxonómiai egységeiből a valódi endofita jelleg igazolásához.
4. Az feltételezett endofita törzsek paprikamag csírázásra gyakorolt hatásának vizsgálata.
5. Módszerfejlesztés a feltételezeten endofita baktériumok és humánpatogén vagy ezeket modellező törzsek PCR-rel és FISH-CLSM-mel (**F**luorescence **I**n **S**itu **H**ybridisation-**C**onfocal **L**aser **S**canning **M**icroscopy) való kimutatásához.
6. A kiválasztott feltételezeten endofita és humánpatogén vagy ezeket modellező törzsek növénybe való bejutásának és kolonizációjának vizsgálata paprikamag mesterséges fertőzésével.
7. A valódi endofita törzsek humánpatogén, illetve ezeket modellező törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro* kontaktinhibíciós és lyukdiffúziós vizsgálatokkal.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az **endofita baktériumok izolálása** talajkultúrásan és hidroponikusan termesztett édes étkezési paprika (*Capsicum annuum* var. *grossum*) Kárpia és Hó fajtákból, valamint a termesztéshez használt magokból történt hagyományos mikrobiológiai tenyésztési módszerek segítségével. A paprika növényeket a Szent István Egyetem Kertészettudományi Karához tartozó Soroksári Kísérleti Üzem és Tangazdaság termesztette 2012-ben és ugyaninnen származtak a magok is.

Az izolátumokat egyes fenotípusos jellemvonásaik (makro- és mikromorfológiai) alapján **fenotípusos csoportokba rendeztem**, majd mindegyik fenotípusos csoportból egy reprezentatív izolátummal dolgoztam a továbbiakban.

A reprezentatív izolátumok genomiális DNS-ét ezt követően **RAPD-PCR módszerrel típizáltam**, majd mindegyik RAPD típusból egy reprezentatív törzset választottam ki a további munkára.

A következő lépésben a ***Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzseket** egy specifikus PCR-rel **detektáltam**, majd az *rpoB* génjüket felszaporítottam az *rpoB* génre specifikus PCR alkalmazásával. Továbbá, az összes reprezentatív törzs 16S rRNS-t kódoló rDNS génjét is amplifikáltam.

Az *rpoB* gén esetében az **amplikonok szekvenálása** egy irányból történt, a reverz primer alkalmazásával. Ugyanígy, a reverz primer segítségével történt a 16S rRNS gén esetében is a nukleotid sorrend meghatározás, azonban egyes esetekben majdnem a teljes 16S rRNS gén szekvenálása megtörtént a belülről kifelé irányuló primerek alkalmazásával. A meghatározott bázissorrendű szekvenciákat az *rpoB* gén esetében a BLAST program, míg a 16S rRNS gén esetében az EzTaxon server segítségével hasonlítottam az adatbázisában lévő típus-törzsek szekvenciájához.

A **filogenetika vizsgálatok** elvégzéséhez a törzsek 16S rRNS génszekvenciáit használtam, amelyek közül az azonosakat KTE-kbe (**K**ezelhető **T**axonómiai **E**gység, angol rövidítése OTU) soroltam, és mindegyik KTE-ből egy-egy reprezentatív törzset választottam ki a további munkához. Ezt követően a szekvencia-gyűjteményhez legjobban illeszkedő nukleotid szubsztitúciós modell és a Maximális Valószínűség statisztikai módszer (Felsenstein, 1981) alkalmazásával filogenetikai törzsfát készítettem.

A reprezentatív baktériumtörzsek **paprikamag csírázásra gyakorolt hatásának** vizsgálatához ötven darab, felületileg fertőtlenített paprikamagot használtam törzsenként. A magokat megközelítőleg 10^8 TKE/ml koncentrációjú baktérium szuszpenziókban inkubáltam hat órán át, majd csíráztató papírt alkalmazva csíráztattam őket 10 napon keresztül. A kicsírázott magokat

leszámoltam és a kontrollhoz viszonyítva értékeltem (ISTA, 2003; Niranjana Raj *et al.*, 2003; Chandrashekhara *et al.*, 2007).

A **baktériumok növényi szövetekbe való bejuttatását** a paprikamagok baktériumokkal való megfertőzésével szimuláltam, ahol öt különböző baktérium törzs (*Chryseobacterium hispalense* FPBSKK1 és *Pseudomonas* sp. HPBBIK3 mint potenciális endofiták, *Listeria innocua* 1010, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* CCM 4699 mint patogén modell és patogén törzsek) internalizációját vizsgáltam külön-külön, valamint két kontrollt (steril és nem steril) is felhasználtam. A magokból felnövő palántákat 35-40 napos növekedési stádiumig neveltem, majd ezután dolgoztam fel őket.

A ***C. hispalense* FPBSKK1-gyel és a *P. sp.* HPBBIK3-mal beoltott, valamint a kontroll palántákból** hagyományos tenyésztési módszerrel izoláltam baktériumokat, amelyeket telepmorfológiájuk alapján csoportokba rendeztem. A továbbiakban az egyes csoportokból kiválasztott egy-egy reprezentatív izolátummal dolgoztam. A reprezentatív izolátumok és a paprikamagok beoltásához használt potenciális endofita baktériumtörzsek DNS-ét (mint pozitív kontroll) a munkám során tervezett specifikus primerpárokkal vizsgáltam. A megfelelő méretű PCR terméket adó izolátumok 16S rRNS génjét felszaporítottam, majd szekvenáltam. Ezt követően összehasonlítottam a meghatározott nukleotid szekvenciákat a beoltáshoz használt törzsek 16S rRNS génszekvenciájával. Az izolátumokból és a beoltáshoz használt törzsekből származó genomiális DNS RAPD-PCR-es tipizálását is elvégeztem.

Az ***E. coli* ATCC 8739-cel beoltott** palántaszöveteket Chromocult® kóliform szelektív táptalajon, míg a ***L. innocua* 1010-zel és *L. monocytogenes* CCM 4699-cel beoltott** palántaszöveteket ALOA *Listeria* szelektív kromogén táptalajon vizsgáltam.

A **palántából kivont DNS-ek vizsgálatát** a munkám során tervezett, illetve már korábban publikált primerekkel végeztem. A *L. innocua* 1010-zel és *L. monocytogenes* CCM 4699-cel beoltott mintákat a 27f/ Lis659R, míg az *E. coli* ATCC 8739-cel beoltottakat a 27f/ Ec/Sh473R primerpárral próbáltam amplifikálni. A Chr22F/ Chr818R (*C. hispalense* FPBSKK1-re) specifikus primerpárral kapott megfelelő ampikonok szekvenálásra kerültek, majd a szekvenciákat összehasonlítottam a *C. hispalense* FPBSKK1 törzs 16S rRNS génszekvenciájával és az EzTaxon szerver adatbázisában szereplő szekvenciákkal is. A Pse393F/ Pse618R (*P. sp.* HPBBIK3-re) specifikus primerpárral kapott megfelelő ampikont adó mintákat a bakteriális rDNS-re specifikus 1070F/ 1492R primerpárral amplifikáltam, majd a kisebb (448 bp) ampikont megtisztítottam és szekvenáltattam. A meghatározott szekvenciákat összehasonlítottam a *P. sp.* HPBBIK3 törzs 16S rRNS génszekvenciájával, majd az EzTaxon szerver adatbázisában szereplő szekvenciákkal is.

A FISH-CLSM vizsgálatok során a mintákban jelenlévő összes baktériumsejtet mindig az EUB mix próbakeverékkel, míg a beoltáshoz használt baktériumokat az alábbiakban szereplő specifikus próbákkal próbáltam kimutatni (*- munkám során tervezett próbák): *C. hispalense* FPBSKK1 – **Chryseo_643***; *P. sp.* HPBBIK3 – **Pseudo_828***; *L. innocua* 1010 vagy *L. monocytogenes* CCM 4699 – **Lis-637** és **Lis-comp***; *E. coli* ATCC 8739 – **Ec/sh_453**; Steril és nem steril kontroll palántákban lévő baktériumsejteket – mindegyik specifikus próbával külön-külön. A mikroszkópos vizsgálatok egy Zeiss LSM 710 típusú (Carl Zeiss AG, Németország) CLSM-mel végeztem, valamint a felvételek formázását a ZEISS ZEN 2 lite (Carl Zeiss AG, Németország) programmal készítettem.

A kiválasztott endofita baktériumok (*C. hispalense* FPBSKK1 és *P. sp.* HPBBIK3) **patogén és patogént modellező** (*L. monocytogenes* CCM 4699, *E. coli* ATCC 8739, *L. innocua* 1010) **baktériumokra gyakorolt hatását** kontakt inhibíciós és lyukdiffúziós módszerekkel vizsgáltam. A kontakt inhibíciós vizsgálat során a patogént modellező és a patogén törzsek szuszpenzióit masszív oltással vittem fel PGES agarokra, majd az endofita baktérium törzsek szuszpenziójából három-három cseppet cseppentettem a felületükre és különböző hőmérsékleteken inkubáltam. A lyukdiffúziós vizsgálat annyiban tért el, hogy 100 – 100 µl sejtmentes fermentelevet pipettáztam az agarba fúrt lyukakba.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. Feltehetően endofita baktériumok izolálása

Összesen 170 darab feltehetően endofita baktériumot sikerült izolálnom. A magokból kevés izolátumot sikerült kinyerni, ezzel szemben a palántákból 142 izolátum tenyésztett ki. A kifejlett növényekből szintén kevés baktérium volt izolálható, mindössze 23 darab. A paprika fajták tekintetében majdnem feleannyi izolátum (60) származott a Hó fajtából, mint a Kárpiából (110). A termesztési körülményeket figyelembe véve megállapítható, hogy több izolátum került kitenyésztésre a hidroponikus (98), mint a talajkultúrás (67) termesztésű növényekből.

3.2. A potenciális endofita izolátumok fenotípusos jellemzése

Az izolátumok nagy száma és a könnyebb kezelhetőség miatt külön fenogramot készítettem a Gram-pozitív és a Gram-negatív izolátumokból. Ebben a felosztásban a 69 Gram-pozitív izolátum 56, míg a 101 Gram-negatív baktérium 82 csoportba, összességében pedig a 170 izolátum 138 klaszterbe volt csoportosítható. Az azonos csoportba tartozó izolátumok valószínűleg azonos törzsekhez tartoznak, ezért a további vizsgálatokhoz mindegyik klaszterből csak egy reprezentatív izolátum került kiválasztásra az izolátumok számának csökkentése érdekében. Az azonos izolátumok kiszűrése azért is fontos, hogy a teljes mikrobapopuláció kvantitatív diverzitásának eredményeit ne torzítsák el.

3.3. Az izolátumok tipizálása RAPD-PCR módszerrel

Az 56 Gram-pozitív reprezentatív izolátum 45, míg a 82 Gram-negatív baktérium 55 klaszterbe csoportosult, így a fenotípus alapján elkülönített összesen 138 reprezentatív izolátum 100 RAPD típusba volt sorolható. A Gram-pozitív, egyedi fenotípusú izolátumok száma több mint 19%-kal, míg a Gram-negatívoké ennél is nagyobb mértékben, több mint 32%-kal csökkent a genotipizálásnak köszönhetően.

Itt is, mint az előző alfejezetben, valamennyi klaszterből egy reprezentatív izolátum lett kiválasztva a további vizsgálatokhoz, amelyek törzsnek tekinthetők. Így összesen 100 törzssel dolgoztam az identifikálási munkamenetben.

3.4. Az izolált törzsek molekuláris identifikálása az *rpoB* és a 16S rRNS gének szekvenálása alapján

A 16S rRNS gén felszaporítását mind a 100 törzs esetében elvégeztem. A szekvenálás első lépésben részlegesen történt a reverz primerrel, majd azon esetekben, ahol ezen információk

alapján nem volt lehetséges a pontos faj szintű azonosítás, a teljes gén szekvenálására is sor került.

Az *rpoB* gén felszaporítására azért került sor, mert a *Pseudomonas* nemzetség tagjainak faj szinten történő azonosításához a 16S rRNS gén önmagában nem nyújt elég információt. Azonban sok esetben nem elégséges csupán az *rpoB* gén vizsgálata, mert ahogy Bennisar és munkatársai (2010), valamint Mulet és munkatársai (2010) megállapításai is alátámasztják, egyre több más háztartási gén (mint pl. a *gyrB*, *rpoD*, stb.) és specifikus gén szekvencia információja is szükséges a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek pontos faji azonosításához.

A molekuláris identifikálási eredményeket összegezve elmondható, hogy az általam vizsgált gének alapján a 100 törzs több mint 50%-át (53 darabot) sikerült faj szinten is azonosítanom, a többi csak nemzetség szinten. Azonban ha csak a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzseket tekintjük, akkor ez az arány 29%-ra csökken. Esetemben tehát szekvenálással elsősorban a nemzetség szintű meghatározás volt lehetséges a *Pseudomonas* izolátumoknál, illetve néhány további olyan izolátumnál, amelyek széles faji diverzitással rendelkeznek vagy esetlegesen még le nem írt fajok.

3.5. A filogenetikai vizsgálatok eredményei

A 100 darab törzs 16S rRNS génszekvenciáit összehasonlítottam a megegyező szekvenciák azonosítása céljából, így összesen 64 darab különböző KTE-t sikerült elkülöníteni. A 64 KTE-t reprezentáló törzs felhasználásával készített filogenetikai törzsfá segítségével analizáltam a törzsek rokonsági kapcsolatait és biodiverzitását. Ezen vizsgálatok alapján megállapítható a törzsek nagy fokú diverzitása.

A γ -Proteobacteria volt a legnépesebb osztály 21 KTE-vel (33%), amelyet a DNS-ben alacsony GC tartalmú Gram-pozitív Bacilli osztály (17 KTE, 27%) és a magas GC tartalmú Gram-pozitív Actinobacteria osztály (14 KTE, 22%) követ a sorban. Továbbá hét KTE (11%) tartozott az α -Proteobacteria osztályba, míg a β -Proteobacteria osztály 3 KTE-vel (5%) képviseltette magát. A Flavobacteria osztályt csak a *C. hispalense* FPBSSK1, míg a Deinococci osztályt csak a *Deinococcus* sp. SEFSRH1 törzs képviselte.

A KTE-k filogenetikai törzsfán való eloszlása alapján megállapítható, hogy a *Pseudomonas* KTE-k voltak a dominánsok (12 KTE, 19%) nem csak γ -Proteobacteria osztályban, hanem az összes osztály között.

Kiemelendők a *Pseudomonas* sp. HPBBIK3, *Cupriavidus campinensis* SEPRH20, *Deinococcus* sp. SEFSRH1, *Brevundimonas* sp. FPBTIH1, *Paenibacillus* sp. SESRK1, *Brevibacillus centrosporus* SESRK14, *Leucobacter tardus* HPBSKH1, *C. hispalense* FBBSKK1 törzsek,

amelyek rokonsági szempontból eléggé távol állnak a többi törzstől, és amelyek alapján lehetővé vált azon törzsek kiválasztása, amelyekre nagy valószínűséggel specifikus oligonukleotid próbák tervezhetők a FISH vizsgálatok kivitelezéséhez.

3.6. A feltehetően endofita törzsek megoszlása a paprikákban

A termesztési körülmények tekintetében megállapítható, hogy összességében több törzs (54) származott a hidroponikus növényekből, mint a talajkultúrákból (43), ami még inkább igaz, ha a palántákra szűkítjük a kört (48 törzs a hidro- és 31 a talajkultúrák palántákból). Az előbbiekkal ellentétben a termések esetében ez az arány fordított és még nagyobb mértékű volt. Összegezve a növényi szervekből származó törzseket, a legtöbb (61) - amint várható volt - a gyökerekből származott, míg a zöld szervek és a termések esetében kevesebb, mint a harmadát, 18-18 törzset sikerült izolálni, míg a magokból származott a legkevesebb (3) törzs. A termés tekintetében, ami élelmiszerbiztonsági szempontból a legfontosabb, az *Enterobacter cancerogenus* és a *Pantoea brenneri* oportunista humánpatogénként leírt fajokba tartozó törzseket sikerült kimutatni. A termesztési fajtákat vizsgálva elmondható, hogy összességében közel kétszer több (66) törzs származott a Kárpiából, mint a Hó fajtából (34). Részletesebben nézve is ez volt tapasztalható, azonban a hidroponikus termésekből származó izolátumok kivételt képeztek ezalól.

A hidroponikus paprikák esetében a *Pseudomonas* és a *Bacillus* nemzetség, míg a talajkultúrák paprikáknál a *Rhizobium* és a *Microbacterium* nemzetség képviseltette magát a legnagyobb számban, azonban mind a négy nemzetség jelen volt mindkét termesztési körülmény esetében. Kisebb számban, de szintén jelen voltak mindkét termesztésű paprikában a *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus* és *Enterobacter* nemzetségbe tartozó törzsek is. A kizárólag hidroponikus paprikákban előforduló nemzetségek a *Cupriavidus*, *Delftia*, *Acidovorax*, *Stenotrophomonas*, *Leucobacter*, *Kocuria*, *Cohnella*, *Brevibacillus* és *Lysinibacillus* voltak, míg a *Pantoea*, *Leclercia*, *Deinococcus*, *Brevundimonas*, *Ochrobactrum*, *Curtobacterium*, *Clavibacter* és *Leifsonia* nemzetségek tagjai csak talajkultúrák paprikákból voltak izolálhatók.

A Hó és Kárpia fajtákból származó törzsek nagy számban a *Pseudomonas* és *Rhizobium* nemzetségekből kerültek ki, továbbá a Hó fajta esetében a *Microbacterium*, míg Kárpiánál a *Bacillus* nemzetségbe tartozó törzsek fordultak elő nagyobb számban. Kisebb mennyiségben, azonban mindkét fajtából izolálhatók voltak a következő nemzetségek tagjai: *Enterobacter*, *Leclercia*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Curtobacterium*. Az egyedien előforduló nemzetségek tekintetében a Hó fajta esetében kevesebb (*Pantoea*, *Cupriavidus*, *Acidovorax*, *Deinococcus*, *Leucobacter*), míg a Kárpia esetében több (*Delftia*, *Brevundimonas*,

Ochrobactrum, *Cohnella*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Rothia*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Clavibacter*, *Leifsonia*, *Staphylococcus*) nemzetséghez tartozó törzs volt izolálható.

3.7. A különböző KTE-kbe tartozó, feltehetően endofita törzsek paprikamag csírázására gyakorolt hatása

Ahhoz, hogy a valódi endofitákat megkülönböztethessem a feltételezett endofitáktól, szükséges igazolnom vizuálisan a sejtek jelenlétét (kolonizációt) a belső növényi szövetekben, amit nehéz lett volna teljesítenem mind a 64 KTE-t reprezentáló törzsre. Ezért egy új módszert használtam a nem endofita törzsek kiszűrésére és egyben a csírázást direkt módon serkentő, mutualista endofita jellegek felderítésére.

A továbbiakban csupán azokat tekintetem vélhetően endofita baktérium törzseknek, amelyek a kontrollhoz képest minimálisan 90%-os paprikamag csírázási arányt indukáltak. A törzsek 10,9%-a nagymértékben, míg 9,4%-a enyhén gátolta a magok csírázását. A törzsek többsége (közel 64,1%-a) a semleges kategóriába tartozott és csak kevés számú törzs, mintegy 15,6%-uk volt képes lényeges stimulálásra. Valószínűleg ezen 79,7% között keresendők a valódi endofiták.

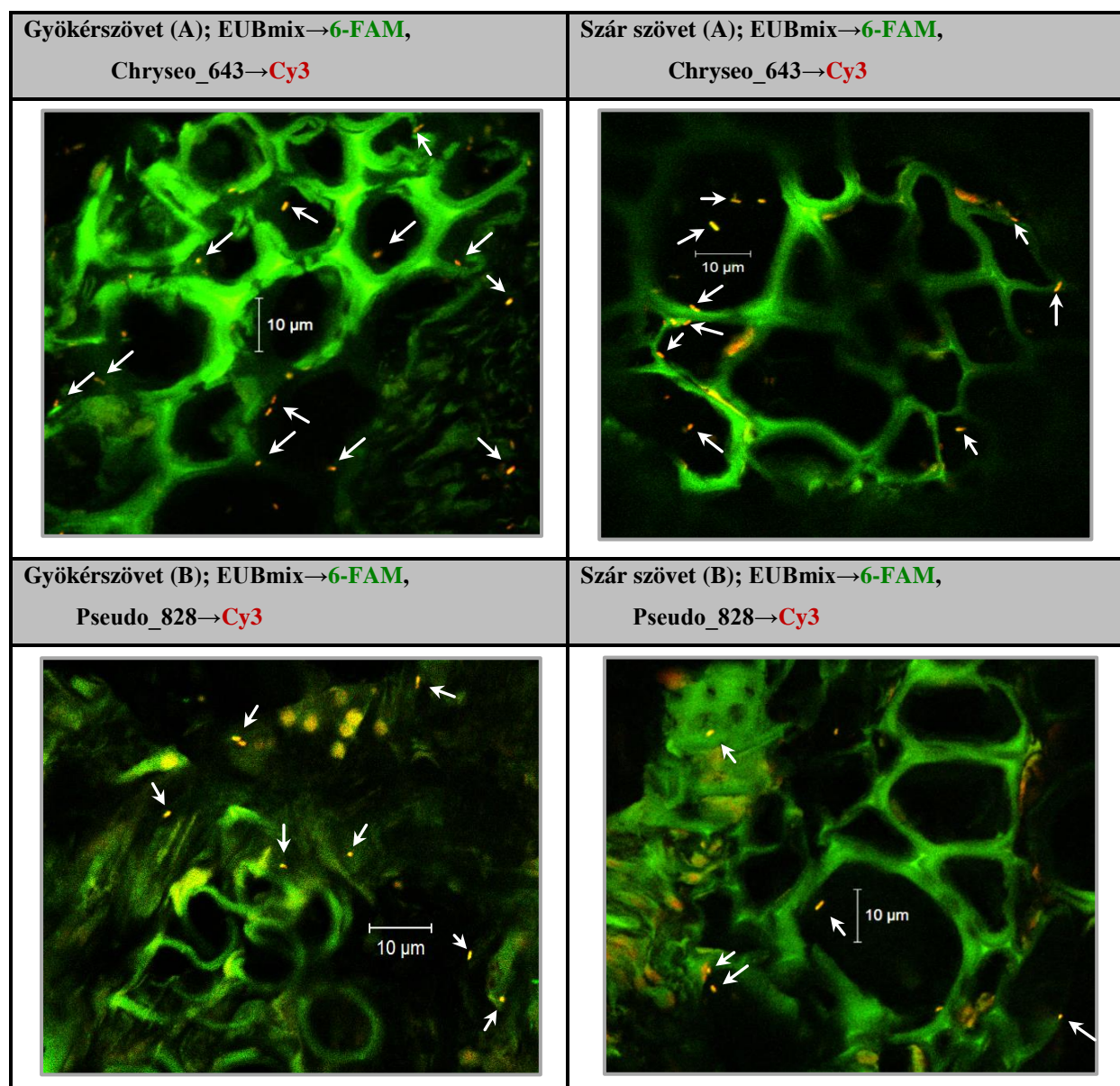
A mérések szórásából arra lehet következtetni, hogy a módszernek van egy kisebb mértékű bizonytalansága. A nagyszámú neutrális hatású törzs miatt felállítottam egy stimulációs határértéket (min. 110%-os csírázás serkentés), és a továbbiakban csak az ennek megfelelő törzsekkel dolgoztam tovább, ami által sikerült minimalizálnom a további vizsgálatokra szánt törzsek számát. Ezen törzsek (10 darab) fele a *Pseudomonas*, a többi törzs a *Leclercia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Chryseobacterium* és a *Rhizobium* nemzetségek tagjai. A legnagyobb serkentést elősegítő *Pseudomonas* sp. SEPRK23 törzset sajnos faji szinten nem sikerült azonosítanom.

Összevetve a serkentő hatású 10 törzset a filogenetikai vizsgálatok alapján a FISH vizsgálatokhoz alkalmazandó próbák tervezésére alkalmasnak tűnő 8 törzssel, a baktériumok száma két törzsre csökkent. Ezek egyike a *P. sp.* HPBBIK3, amelyet faji szinten nem sikerült azonosítanom, azonban a szakirodalomban több *Pseudomonas* fajt is leírtak már endofitaként (Prieto és Mercado-Blanco, 2008; Andreote *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2012), ezért potenciális jelöltnek tekintetem. A másik, az FPBSKK1 jelölésű törzs *C. hispalense*-ként lett azonosítva, amely faj egyik törzsét leírták már növényi növekedést serkentő baktériumként (Montero-Calasanz *et al.*, 2013a), tehát az általam izolált törzs jó eséllyel lehet valódi endofita (életmódját tekintve pedig valószínűleg fakultatív endofita, mivel az NNSB-k többsége ilyen (Gaiero *et al.*, 2013)).

3.8. A potenciális endofita baktériumokkal fertőzött paprikamagokból nevelt palánták baktériumbiótájának vizsgálati eredményei

Sikerült hagyományos mikrobiológiai módszerekkel kitenyésztennem baktérium törzseket a belső növényi szövetekből, majd a telepmorfológiai csoportosítást követően specifikus PCR-rel és a 16S rRNS gén fragmentumok szekvencia egyezésével valószínűsítettem a beoltásra használt és a kitenyésztett törzsek azonosságát. További megerősítésként RAPD-PCR-es tipizálással is alátámasztottam ezen törzsek molekuláris ujjlenyomatainak egyezését.

A növényből izolált össz-DNS-t használva templátként specifikus PCR-rel és 16S rRNS génszekvencia fragmentumok egyezésével is alátámasztottam a törzsek azonosságát.



1. ábra. A *C. hispalense* FPBSKK1 (A) és *P. sp.* HPBBIK3 (B) törzsekkel beoltott növények különböző részeiből készült reprezentatív FISH-CLSM felvételek. Alkalmazott próbák

leírása: próba neve → jelölése

Az **1. ábra** a *C. hispalense* FPBSKK1 és a *P. sp.* HPBBIK3 törzssel beoltott növény gyökér és szármetszetéről készült felvételeket szemlélteti, amelyeken nyilakkal jelöltem több baktérium sejtet is. A sejtek sárga színben láthatóak, mert az általános próbák fluoroforjai (6-FAM) által emittált jel zöld, míg a specifikus próba fluoroforja (Cy3) által emittált jel narancsos-vörös színű, és a két szín együtt sárga, narancssárgás színt adott. A felvételek alapján egyértelműen elmondható, hogy mind a gyökér, mind a szár szöveteiben szép számban voltak jelen a *C. hispalense* FPBSKK1 törzs sejtjei, ami bizonyítja, hogy a mag fertőzésére használt *C. hispalense* FPBSKK1 törzs sejtjei bejutottak a magba, ott elszaporodtak (kolonizálódtak) és onnan a paprika más szerveibe vándoroltak, más szóval internalizálódtak. Hasonló megfigyelések tehetők a *P. sp.* HPBBIK3 törzssel beoltott növényekből készült metszetek esetében is, azzal a különbséggel, hogy az itt detektált sejtek sokkal kisebb számban voltak kimutathatók.

A FISH technikával, illetve az újonnan tervezett próbák és a konfokális szkennelő lézermikroszkópia használatával vizuálisan is igazolni tudtam a két potenciális endofita növényben való jelenlétét (lásd **1. ábrán**), így ezek valódi endofitáknak tekinthetők.

Összegezve az eredményeket elmondható, hogy a beoltáshoz használt mindkét potenciális endofita törzset (*C. hispalense* FPBSKK1 és *P. sp.* HPBBIK3) sikerült kimutatnom az alkalmazott módszerek felhasználásával.

3.9. A patogén és a patogént modellező baktériumokkal fertőzött paprikamagokból nevelt palánták baktériumbiótájának vizsgálati eredményei

A növényi szövetek szelektív táptalajokon történő inkubációját követően sem a Chromocult®, sem az ALOA táptalajon nem volt tapasztalható a beoltáshoz használt törzsek telepformológijával megegyező kolóniák növekedése.

A növényekből izolált DNS PCR-es vizsgálata során a 27f/ Lis659R (*L. innocua* 1010 és *L. monocytogenes* CCM 4699 kimutatására alkalmas) és a 27f/ Ec/Sh473R (*E. coli* ATCC 8739 kimutatására alkalmas) primerpárokkal egyik minta esetében sem kaptam PCR terméket.

A FISH-CLSM technika alkalmazásával egyik mintánál sem tudtam detektálni a célsejteket, csupán három esetben (az *E. coli*-val fertőzött növény gyökér és szárszövetből, valamint a steril kontroll növény gyökérszövetéből) sikerült egy-két nem-célsejtet kimutatnom.

Összegezve az eredményeket, sem a patogén (*L. monocytogenes* CCM 4699), sem az opportunista patogén (*E. coli* ATCC 8739), sem a patogént modellező baktériumokat (*L. innocua* 1010) nem sikerült kimutatnom egyik módszer alkalmazásával sem, ami arra utal, hogy az étkezési paprika magján keresztül nem internalizálódnak a vizsgált baktériumok a növényben.

3.10. A két endofita törzs patogén és patogént modellező baktériumokra gyakorolt hatása

A palántanevelési kísérletekben a paprikamagok beoltásához használt két endofita törzs (*C. hispalense* FPBSKK1 és *P. sp.* HPBBIK3) hatását külön-külön megvizsgáltam patogén (*L. monocytogenes* CCM 4699), opportunistá patogén (*E. coli* ATCC 8739) és patogént modellező (*L. innocua* 1010) törzsekkel szemben is. Mivel a baktériumok többsége szekunder metabolitok termelése révén gátolja más mikrobák szaporodását, ezért a vizsgálat során a két tesztelt endofita törzset késői exponenciális, illetve korai stacioner szaporodási szakaszában használtam fel.

Összegezve a két endofita törzs patogén, opportunistá patogén és patogént modellező baktériumokra gyakorolt hatását, a kontakt inhibíciós és a lyukdiffúziós vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a vizsgált endofita törzsek a tesztelt körülmények között nem gyakoroltak gátló hatást a modell baktériumokra, és a serkentő hatás sem volt számottevő.

3.11. Új tudományos eredmények

1. Elsőként izoláltam talajkultúrás és hidroponikus körülmények között nevelt kétféle étkezési paprika fajtából (Hó és Kárpia) feltételezhetően endofita baktérium törzseket tenyésztéssel módszerrel.
2. Nemzetközileg elfogadott mag csírázási teszt adaptálásával és továbbfejlesztésével új vizsgálati módszert dolgoztam ki és alkalmaztam az endofitaként izolált baktériumok vizsgálatára abból a célból, hogy a mag csírázására negatív hatást mutatókat kiszűrjem.
3. A paprikamag csírázási eredmények és a filogenetikai vizsgálatok alapján kiválasztott két feltételezhetően endofita törzs (*Chryseobacterium hispalense* FPBSKK1 és *Pseudomonas sp.* HPBBIK3) esetében mesterséges paprikamag fertőzéssel vizsgáltam bejutásukat a növénybe. Specifikus oligonukleotid próbák tervezésével a FISH-CLSM technika segítségével kimutattam kolonizációjukat a növények különböző szerveiben, amit a fertőzött növényekből izolált baktériumok és a növényi genomális DNS molekuláris vizsgálataival is megerősítettem.
4. Paprika mag mesterséges fertőzésével vizsgáltam patogén és ezeket modellező baktériumok (*L. monocytogenes*, *E. coli* és *L. innocua*) növénybe való bejutását és kolonizációját. Tenyésztéssel és új primerpárokkal megvalósított specifikus PCR, valamint a FISH-CLSM technika segítségével nem sikerült ezek egyikét sem kimutatnom a növényből, ami arra utal, hogy az étkezési paprika magján keresztül nem internalizálódnak a vizsgált baktériumok a növényben.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Mivel gyakran fordulnak elő nyers növényi élelmiszerek okozta enterális megbetegedések, de még inkább azért, mert több esetben izoláltak már humánpatogénekkal szemben antagonist hatású endofita baktériumokat, célszerű minél többet megtudni a paprika növény belső szöveteikben élő baktériumokról.

Az általam kiválasztott két különböző termesztési körülmény között nevelt két paprikafajtából is sikerült nagy számban feltehetően endofita baktériumot izolálnom, és az izolált baktériumok fenotípusos csoportosításával, valamint genotipizálásával jelentősen le lehet csökkenteni a munkához feltétlen szükséges törzsek számát (170-ről 100 darab törzsre). A RAPD-PCR-es tipizálással a fenotípusos csoportokból kiválasztott reprezentatív izolátumok tovább voltak csoportosíthatók, ami jelzi, hogy a fenotípusos jellemzés nem kellő hatékonyságú, ezért a genotipizálással való együttes alkalmazás javasolható.

A 100 darab törzsből 53%-ot sikerült faj szinten is azonosítani, ami sejtetheti a potenciálisan új fajok izolálásának tényét. A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó izolátumok esetében ez az arány 30% volt annak ellenére, hogy az *rpoB* gén részleges szekvenálására is sor került. Tehát, további gének (univerzális és specifikus) szekvenálása is szükséges a pontos azonosításhoz, valamint ezen túlmenően egy olyan adatbázis is, amelyben megtalálhatók az összes elfogadott, identifikált faj típustörzsére vonatkozó génszekvencia információk.

A 100 törzs 64 KTE-be való sorolhatósága a nagyfokú diverzitást támasztja alá, a filogenetikai törzsfa szerkesztés pedig egy olyan eszköz, amely kiválóan rámutat azon törzsekre, amelyekre jó eséllyel lehet specifikus oligonukleotid próbákat tervezni a későbbi FISH-sel való detektáláshoz.

Az izolátumok többsége a gyökerekből származott, mivel a rizoszférában és a gyökereket körülvevő talajrétegben nagy számban található baktériumok. A föld feletti zöld szervekből és a termésekből is sikerült számos baktériumot izolálni; utóbbi helyről egy *Enterobacter cancerogenus* és egy *Pantoea brenneri* opportunistá patogénként leírt törzset is. Ezen törzsek jelenléte felhívja a figyelmet arra, hogy immungyenge egyének esetében a termés elfogyasztása akár megbetegedést is okozhat. Természetesen sok, a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* és *Microbacterium* nemzetségbe tartozó potenciálisan mutualista törzset is sikerült izolálnom. A termesztési körülmények tekintetében elmondható, hogy összességében több törzs származott a hidroponikus növényekből, mint a talajkultúrákából. Ezzel ellentétben, a termések esetében ez az arány fordított volt, ami arra utal, hogy a termésektől eltekintve, a hidroponikus termesztés

össességében jobban hozzájárul az endofita mikrobióta biodiverzitásának növeléséhez, mint a talajkultúrás. Továbbá a termesztési fajtákat vizsgálva lényegében több törzs származott a Kárpiából, mint a Hó fajtából, ami arra enged következtetni, hogy az endofiták biodiverzitása sok más tényezőtől kívül nemcsak a növények termesztési körülményeitől, hanem a termesztett fajtától és a kettő kombinációjától is függhet.

A paprikamag csírázására gyakorolt hatásuk alapján a vizsgált törzsek 64,1%-a semleges volt a magok csírázása szempontjából, 15,6%-uk viszont serkentette azt, ezért ezek feltételezett endofitaként vehetők számba. A baktériumok paprikamag csírázásra gyakorolt hatásának vizsgálata azért lehet hasznos, mert alkalmazásával fény deríthető a felületi fertőtlenítést túlélő, nem endofita törzsekre, valamint esetleges továbbfejlesztésével a növényi növekedést direkt módon serkentő endofiták is kimutathatók lehetnek.

A különböző baktérium törzsekkel fertőzött magokból nevelt palánták vizsgálata során a patogént modellező és patogén törzsek esetében egyik módszerrel, egyik mintából sem sikerült kimutatni jelenlétüket, amiből arra lehet következtetni, hogy nem jutottak be a növényi endoszféraiba, vagy ha be is jutottak, nem éltek túl a palántanevelési időszakot. A jövőben érdemes lenne azt is megvizsgálni, hogy milyen hatása van az endofitákkal kevert tenyészetekben (azonos és különböző arányokban keverve) való fertőzésnek az eddig vizsgált humánpatogén és humánpatogént modellező törzsek növényi endoszféraiba való bejutására, valamint túlélésére. Ez annak megvizsgálása szempontjából lenne fontos, hogy milyen módon hatnak a bizonyítottan endofita törzsek a patogének internalizációjára.

A két bizonyítottan endofita törzs *in vitro* kísérletekben sem kontakt módon, sem extracelluláris metabolitjai (sejtmentes fermentleve) révén nem fejtett ki sem serkentő, sem gátló hatást a két patogént modellező és a patogén törzsekre. Ez természetesen nem jelenti azt, hogy a 64 reprezentatív potenciális endofita törzs közül egyik sem rendelkezik patogén baktériumokkal szembeni antagonista hatással, ezért érdemes lenne a jövőben más törzseket is tovább vizsgálni valódi endofita voltuk igazolására és a humánpatogénekkel való kölcsönhatása szempontjából.

5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Folyóiratcikkek

IF-es folyóiratcikkek

Füstös Z., Belák, Á., Ferdeş M., Maráz, A. (2010) Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria and examination of their tolerance against stress factors. *Studia Univeritatis Babeş-Bolyai Chemia.*, Spec. Issue. 54: 31-43 (IF/2010: 0,231)

Belák, Á., Héher B., **Füstös, Z.**, Maráz, A. (2014) Endophytic bacteria from *Capsicum annuum* var. *grossum* cultivars and their inhibitory effects on *Listeria monocytogenes*. *Acta Alimentaria*, Vol. 43 (Suppl.), pp. 9-20. (IF/2014: 0,274)

Füstös, Z., Belák, Á., Kovács, M., Maráz, A. (2016) Culturable bacterial endophytic community of *Capsicum annuum* L. var. *grossum*: biodiversity and distribution in the plant (kézirat közlésre előkészítve)

Füstös, Z., Belák, Á., Maráz, A. (2016) Internalisation of endophytic and human pathogenic bacteria in *Capsicum annuum* L. var. *grossum*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hung.* (kézirat közlésre előkészítve)

Konferencia kiadványok

Magyar nyelvű (összefoglaló)

Füstös, Z., Belák, Á., Kovács, M., Maráz, A. (2012): *Isolation, characterization and molecular identification of endophytic bacteria from different Capsicum annuum cultivars*. A Magyar Mikrobiológia Társaság 2012. évi Nagygyűlése. 2012. október 24-26., Keszthely, Magyarország. Absztraktfüzet 13. oldal.

Füstös, Z., Belák, Á., Kovács, M., Héher, B., Maráz, A. (2013): *Különböző Capsicum annuum var. grossum paprikafajták endofita baktériumainak izolálása, jellemzése és molekuláris biológiai vizsgálata*. Hungalimentaria 2013. „Kockázatbecslés, önellenőrzés, élelmiszerbiztonság” tudományos konferencia. 2013. április 16-17., Budapest, Magyarország. Program 39. oldal.

Füstös, Z., Belák, Á., Kovács, M., Maráz, A. (2013): *Capsicum annuum var. grossum paprikafajtákból izolált endofita baktériumok azonosítása és jellemzése*. A Pannon Növény-Biotechnológiai Egyesület konferenciája Ph.D. hallgatók számára, „Jövönk”. 2013. május 15., Keszthely, Magyarország. Program és összefoglalók 29. oldal.

Belák, Á., **Füstös, Z.**, Kovács, M., Maráz, A. (2014): *Endophytic bacteria of Capsicum annuum var. grossum: phenotypic and genotypic diversity of whole plant isolates*. FIBOK 2014: Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája. 2014. március 7., Szeged, Magyarország. ISBN: 9633151678

Füstös, Z., Belák, Á., Kovács, M., Maráz, A. (2014): *Bacterial endophytes of sweet pepper: distribution in the plant and selection for in situ investigations*. A Magyar Mikrobiológia Társaság 2014. évi Nagygyűlése és EU FP7 PROMISE Regional Meeting. 2014. október 15-17., Keszthely, Magyarország. Absztraktfüzet 18. oldal.

Maráz, A. **Füstös, Z.**, Belák, Á. (2015): *Endofita baktériumok és enterális patogén baktériumok kolonizációja növényi szövetekben*. Hungalimentaria 2015. „Mindannyian fogyasztók vagyunk” tudományos konferencia. 2015. április 22-23., Budapest, Magyarország.

Nemzetközi konferencia (összefoglaló)

Füstös, Z., Belák, Á., Kovács, M., Maráz, A. (2013): *Biodiversity of endophytic bacteria isolated from different Capsicum annuum var. grossum cultivars and their effect on seed germination*. 4th Central European Forum for Microbiology. 2013. október 16-18., Keszthely, Magyarország.

Füstös, Z., Belák, Á., Kovács, M., Maráz, A. (2013): *Potential endophytic bacteria of Capsicum annuum var. grossum*. Microbial Diversity 2013: Microbial Interactions in Complex Ecosystems. 2013. október 23-25., Torino, Olaszország. Proceedings 367. oldal.

Belák, Á., Héher, B., **Füstös, Z.**, Kovács, M., Maráz, A. (2013): *Food safety significance of potential endophytic bacteria isolated from Capsicum annuum var. grossum*. Microbial Diversity 2013: Microbial Interactions in Complex Ecosystems. 2013. október 23-25., Torino, Olaszország. Proceedings 364. oldal.

Füstös, Z., Belák, Á., Kovács, M., Maráz, A. (2013): *Isolation of bacterial endophytes and assessment of their biodiversity in different Capsicum annuum var. grossum cultivars*. Élelmiszertudományi Konferencia 2013: Kutatással a Darányi Program sikeréért. 2013. november 7-8., Budapest, Magyarország.

Belák, Á., Héher, B., **Füstös, Z.**, Kovács, M., Maráz, A. (2013): *Inhibition of Listeria monocytogenes by potential endophytic bacteria isolated from Capsicum annuum var. grossum cultivars*. Élelmiszertudományi Konferencia 2013: Kutatással a Darányi Program sikeréért. 2013. november 7-8., Budapest, Magyarország.

Belák, Á., **Füstös, Z.**, Maráz, A. (2015): *Inhibition of E. coli O157 and Listeria Species by Antagonistic Bacteria Isolated from Food Raw Materials*. IAFP European Symposium on Food Safety. 2015. április 20-22., Cardiff, Wales, Egyesült Királyság. Poszter szekció 1-12.

Maráz, A., **Füstös, Z.**, Belák, Á. Kovács, M. (2015): *Colonization and adaptation of endophytic and entropathogenic bacteria in plants*. Food Science Conference: Integration of science in food chain. 2015. november 18-19. Budapest, Magyarország.