Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Egzotikus állatokból izolált tejsavbaktériumok azonosítása és jellemzése biotechnológiai hasznosíthatóság szempontjából

Kosztik Judit

Doktori (PhD) értekezés

Budapest

2021

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Simonné Dr. Sarkadi Lívia**

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

TARTALOM

1. BEVEZETÉS 1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 3
2.1 Tejsavbaktériumok 3
2.1.1 A tejsavbaktériumok általános jellemzése 3
2.1.2 A tejsavbaktériumok rendszertana (a legújabb, 2020-as szabályozást is megemlítve) 3
2.1.3 Tejsavbaktérium nemzetségek 5
2.1.3.1 *Aerococcus* nemzetség 5
2.1.3.2. *Carnobacterium* nemzetség 5
2.1.3.3. *Enterococcus* nemzetség 6
2.1.3.4. *Lactobacillus* nemzetség 6
2.1.3.5. *Lactococcus* nemzetség 7
2.1.3.6. *Leuconostoc* nemzetség 8
2.1.3.7. *Oenococcus* nemzetség 8
2.1.3.8. *Pediococcus* nemzetség 8
2.1.3.9. *Sporolactobacillus* nemzetség 9
2.1.3.10. *Streptococcus* nemzetség 9
2.1.3.11. *Tetragenococcus* nemzetség 9
2.1.3.12. *Vagococcus* nemzetség 10
2.1.3.13. *Weissella* nemzetség 10
2.1.4 Tejsavbaktériumok hatása a magasabb rendű élőlényekre 10
2.1.4.1 Kompetitív kizárás 11
2.1.4.2 Gátlóanyagok termelése 11
2.1.4.3 A gazdaszervezet immunrendszerének stimulálása 12
2.1.4.4 Tápanyag emészthetőségének javítása 13
2.2 Mikotoxinok 13
2.2.1 Aflatoxin B1 13
2.2.2 Szterigmatocisztin 15
2.3 Mikotoxin mentesítés 15
2.3.1 Penészgomba növekedés gátlás 16
2.3.2 Detoxifikálás 17
2.3.2.1. Fizikai módszerek 17
2.3.2.2. Szervetlen/szerves adszorbensek 18
2.3.2.3. Mikrobiális adszorbensek 19
2.3.3 Toxinbontás 20
3. CÉLKITŰZÉSEK 21
4. ANYAG ÉS MÓDSZER 22

4.1 Tejsavbaktériumok izolálása ... 22
4.2 Tejsavbaktérium izolátumok azonosítása molekuláris biológiai módszerekkel ... 23
4.2.1. DNS kivonás ... 23
4.2.2 Repetitív PCR (Polimeráz Láncreakció) ... 24
4.2.3 16S rDNS PCR ... 26
4.2.4. Szekvenálás ... 28
4.3 *Aspergillus flavus* szaporodásának gátlása tejsavbaktériumokkal ... 28
4.4 Mikotoxinkötési vizsgálatok ... 29
4.4.1 A bakteriális sejtszám hatása a tejsavbaktérium toxin megkötésére ... 30
4.4.2 Inkubációs idő hatása a toxin megkötésre ... 31
4.4.3 Toxin hatása a csíraszámra ... 31
4.4.4 Tejsavbaktérium törzsek toxin megkötése MRS táplevesben ... 31
4.5 Aflatoxin B1 és szterigmatocisztin mennyiségi meghatározása HPLC technikával ... 31
4.5.1 Mintaelőkészítés ... 31
4.5.2 HPLC mérés ... 32
5. EREDMÉNYEK ... 33
5.1 Egzotikus állatok székletmintáiból MRS táptalajon izolált mikrobák összetétele ... 33
5.1.1. Aldabrai óriásteknős (*Geochelone gigantea*) ... 36
5.1.2. Bengáli botsáska (*Medauroidea extradentata*) ... 37
5.1.3. Csupasz turkáló (*Heterocephalus glaber*) ... 38
5.1.4. Emu (*Dromaius novaehollandiae*) ... 39
5.1.5. Gorilla (*Gorilla gorilla*) ... 40
5.1.6. Gyűrűsfarkú maki (*Lemur catta*) ... 41
5.1.7. Indiai sül (*Hystrix indica*) ... 42
5.1.8. Koala (*Phascolarctos cinereus*) ... 43
5.1.9. Mhorr-gazella (*Gazella dama mhorr*) ... 44
5.1.10. Sisakos kazuár (*Casuarius casuarius*) ... 45
5.1.11. Szélesszájú orrszarvú (*Ceratotherium simum*) ... 46
5.1.12. Nyugati szürke óriáskenguru (*Macropus fuliginosus*) ... 47
5.1.13. Tarvarjú (*Geronticus eremita*) ... 48
5.1.14. Vombat (*Vombatus ursinus tasmaniensis*) ... 49
5.1.15. Vörös macskamedve (*Ailurus fulgens*) ... 50
5.2 *Aspergillus flavus* szaporodásának gátlása tejsavbaktériumokkal ... 51
5.3 Mikotoxin kötési vizsgálatok ... 55
5.3.1 A csíraszám hatása a toxin megkötésre ... 55
5.3.2 Az inkubációs idő hatása a toxin megkötésre tejsavbaktériumok esetében ... 56
5.3.3 Toxinok hatása a tejsavbaktérium törzsek sejtszámára ... 57

5.3.4 A *Lactobacillus* nemzetség AFB1 kötési kapacitása 57
5.3.5 A *Lactobacillus* nemzetség szterigmatocisztin kötési kapacitása 61
5.3.6 *Enterococcus* törzsek AFB1 kötő kapacitása 64
5.3.7 *Pediococcus* törzsek AFB1 kötési kapacitása 65
5.3.8 *Pediococcus* törzsek szterigmatocisztin kötési kapacitása 66
5.3.9 *Lactococcus* és *Weissella* nemzetség törzseinek AFB1 kötő kapacitása 66
5.3.10 Tejsavbaktérium törzsek AFB1 kötő kapacitása nemzetségek függvényében 67
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK 69
7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK 70
8. ÖSSZEFOGLALÁS 73
9. SUMMARY 75
Irodalomjegyzék 77
Köszönetnyilvánítás 90

Rövidítésjegyzék

AAI: átlagos aminosav azonosság

cAAI: core-gén átlagos aminosav azonosság

AFB1: aflatoxin B1

ANI: átlagos nukleinsav azonosság

APC: antigén prezentáló sejt

AT: Aldabrai teknős

BCCM: Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms

dNTP: dezoxiribonukleotid trifoszfát

DMSO: dimetil-szulfoxid

G+C tartalom: guanin+citozin tartalom a genomban

GO: Gorilla

GRAS: generally recognized as safe (általában véve biztonságos)

HPLC: High-performance liquid chromatography (Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia)

HSCAS: hidratált nátrium-kálcium-aluminium-szilikát

IARC: International Agency for Research on Cancer (Nemzetközi Rákkutató Ügynökség)

IFN: interferon

Ig: immunoglobulin

KO: Koala

KP: Kis panda (Vörös macskamedve)

MA: Gyűrűsfarkú maki

MG: Mhorr-gazella

MIC: minimális gátló koncentráció

MMN: montmorillonit nanokompozit

MRS: Lactobacillus Tápleves DeMan, Rogosa és Sharpe nyomán

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NK sejt: natural killer (természetes ölő) sejt

OR: Szélesszájú orrszarvú

PBS: phosphate buffered saline (foszfáttal pufferelt sóoldat)

RBCA: bengál rózsa- kloramfenikol agar

rDNS: riboszómális dezoxiribonukleinsav

rRNS: riboszómális ribonukleinsav

rep-PCR: repetitív polimeráz láncreakció

rpm: revolutions per minute (percenkénti fordulatszám)

SK: Sisakos kazuár

ST: szterigmatocisztin

TBE puffer: Tris-Borát-EDTA puffer

TS: Indiai sül

TSA: tripton szója agar

TV: Tarvarjú

VO: Vombat

Zt: *Aspergillus flavus* törzsek jelölése

1. BEVEZETÉS

A tejsavbaktériumok közé tartozó mikrobák a szénhidrátok fermentálása során tejsavat termelnek. Ez sok baktérium fajról elmondható, amelyek nem feltétlenül állnak egymással rokonságban az örökítőanyaguk alapján. 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. Az állattenyésztés tekintetében is nagyon hasznos baktériumok, mivel a takarmány tartósítása, vagyis a silózás folyamata során ezek a baktériumok az általuk termelt tejsav révén visszaszorítják az aerob és a coli-aerogenes (*Escherichia* és az *Aerobacter* csoport mikróbái) csoport baktériumait, amelyek ecetsav termelésük révén a silózás első szakaszában rontják a szilázs minőségét. A szilázs minőségének javítása mellett a takarmányhoz adva a mikrobák képesek megtelepedni az azt elfogyasztó állat béltraktusában és ezzel kompetitív kizárás révén gátolják a káros mikrobák elszaporodását.

A tejsavbaktériumok állattenyésztésben betöltött szerepe mellett emberi célra történő felhasználásuk is ismert. A probiotikus, azaz a gazdaszervezet számára előnyös tulajdonságokkal rendelkező törzseket különböző formában táplálék-kiegészítőként forgalmazzák. Folyadék szuszpenzió mellett kapszula és tabletta formájában is kaphatóak. Forgalomban vannak már olyan készítmények is, amelyek nemcsak magát a probiotikus törzseket tartalmazzák, hanem mellette úgynevezett prebiotikum is megtalálható. A prebiotikum általában olyan oligoszacharid, amelyet a probiotikus törzsek képesek hasznosítani az anyagcseréjük során, míg a káros mikroorganizmusok, illetve az emberi szervezet nem. Így a prebiotikum energiaforrásként segíti a bélben a probiotikus törzsek szaporodását. Az ilyen készítményeket szinbiotikumoknak nevezzük.

Jó 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. Jelenleg több mint 300 mikotoxint ismerünk, ezekből 30 rendelkezik egészségkárosító hatással (Alassane-Kpembi *et al*. 2016). Főként vese- és májkárosodást okozhatnak, de citotoxicitásuk és rákkeltő hatásuk is ismert, valamint a hormonrendszer rendellenes működését is kiválthatják. 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 anyagcsere termékeik 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, ilyenkor a mikotoxin megjelenhet a takarmányban, termékben. Mikotoxin-bontó mikroorganizmusok ugyan léteznek, de takarmányban, élelmiszerben 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 munkám során célom volt egy tejsavbaktériumokból álló törzsgyűjtemény létrehozása, amelyhez főként növényevő egzotikus állatkerti állatok bélcsatornájából izoláltam baktériumokat. Azért esett ezekre az állatokra a választás, mert feltételezhetően ezek kerülnek növényi táplálékaikon keresztül kapcsolatba mikotoxinokkal, így olyan tejsavbaktérium törzseket tudok izolálni, amelyek képesek lehetnek fellépni a penészgombák növekedésével szemben, illetve, ha a közegben már jelen van a mikotoxin, akkor azt minél nagyobb mértékben a felületükön megkötni képesek.

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. Egy ilyen mikrobaforrás feltárása az alapkutatási jelentőségen túl gyakorlati felhasználási lehetőséggel is bírhat.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

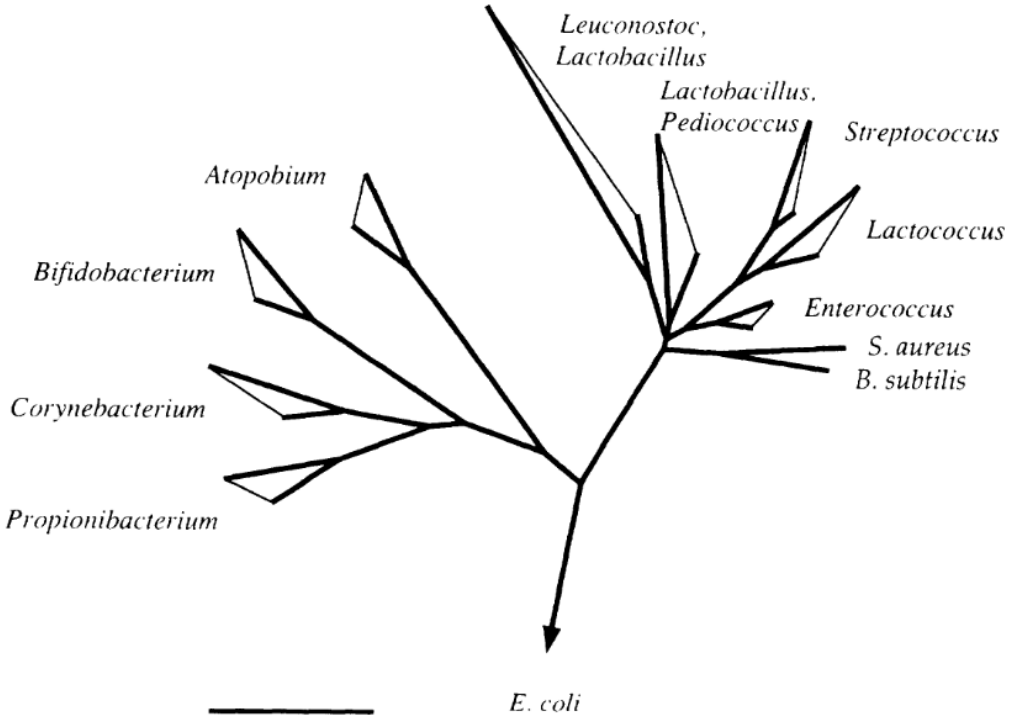
2.1 Tejsavbaktériumok

2.1.1 A tejsavbaktériumok általános jellemzése

A tejsavbaktériumok közé Gram-pozitív, nem spórázó, oxidáz és általában kataláz negatív (habár ritka esetben pseudo-kataláz termelő fajok is megtalálható köztük), pálcika vagy kokkusz alakú mikróbák tartoznak. Kemoorganotrófok és komplex összetételű médiumot igényelnek. Nevüket a szénhidrát fermentációjuk végén keletkező tejsavról kapták. Az ide tartozó mikróbáknak ugyanis nem a genetikai rokonságuk, hanem ezen közös tulajdonságuk okán hoztak létre egy nem rendszertani kategóriát. A fermentációt tekintve aerob és anaerob módon is képesek erjeszteni. Az oxigén jelenlétében is életképesek úgynevezett aerotoleráns baktériumok. A szénhidrát lebontás két úton is végbe mehet. A homofermentatív út során kizárólag tejsav keletkezik a piruvátból, míg a heterofermentatív úton a tejsav mellett nagyobb mennyiségben szén-dioxid és etanol is keletkezik, valamint ecetsav, formiát és szukcinát is. GRAS (Generally Recognised As Safe) besorolásuk révén az élelmiszeriparban is általános a használatuk. Fontos szerepük van, mivel az általuk előállított tejsav lecsökkenti a termék pH-ját, amit sok kórokozó nem képes elviselni, így tartósításra kiválóan alkalmasak ezek a mikróbák. Különböző tejtermékek előállításánál alkalmazzák őket, például kefir, joghurt, sajtok, de zöldségek és húskészítmények fermentációjánál és használják őket. Emellett a természetes módon megtalálhatók növények felületén, szennyvizekben, illetve emberek és állatok esetében is az emésztőrendszer, a légzőrendszer és a genitáliák területein is (Hammes *et al.* 1991).

2.1.2 A tejsavbaktériumok rendszertana (a legújabb, 2020-as szabályozást is megemlítve)

A Gram-pozitív baktériumok filogenetikai rokonságának feltérképezéséhez a 16S, illetve a 23S rRNS szekvenciákat használták fel. Ez alapján két nagy elágazás különböztethető meg, az egyik esetben a DNS G+C arány 50 mol% alatti, ez az úgynevezett *Clostridium* ág. A másik ág pedig az actinomycetes ág, ahol a DNS G+C tartalma 50 mol% feletti (Wood és Holzapfel 1995). A legjelentősebb tejsavbaktérium nemzetségek Pl.: *Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus* mind a *Clostridium* ághoz tartoznak (1. ábra).



1.ábra Gram-pozitív baktériumok filogenetikai törzsfája (Wood és Holzapfel 1995)

2020 márciusában a *Lactobacillus* nemzetségbe 261 faj tartozott. Egy ekkora fajszám egyetlen nemzetségen belül a fenotípus, az ökológia és a genotípus szempontjából is nagy fokú diverzitást jelentett. Ezért Zheng *et al*. (2020) vállalkoztak arra, hogy a nemzetséget átláthatóbbá teszik, és a jelenleg rendelkezésre álló legújabb molekuláris technikák (pl. core-genom filogenetika, átlagos aminosav azonosság (AAI), core-gén átlagos aminosav azonosság (cAAI), átlagos nukleinsav azonosság (ANI)) alkalmazásával vizsgálják a baktériumok teljes genomját, valamint a fiziológiai, illetve ökológiai sajátságait is figyelembe véve létrehoznak új nemzetségeket. Így a *Lactobacillaceae* családon belül a már korábban is létező *Lactobacillus, Paralactobacillus* és *Pediococcus* nemzetségek megmaradtak, de mellettük létrejött 23 új nemzetség is, melyek elnevezései: *Holzapfelia, Amylolactobacillus, Bombilactobacillus, Companilactobacillus, Lapidilactobacillus, Agrilactobacillus, Schleiferilactobacillus, Loigolactobacilus, Lacticaseibacillus, Latilactobacillus, Dellaglioa, Liquorilactobacillus, Ligilactobacillus, Lactiplantibacillus, Furfurilactobacillus, Paucilactobacillus, Limosilactobacillus, Fructilactobacillus, Acetilactobacillus, Apilactobacillus, Levilactobacillus, Secundilactobacillus* és *Lentilactobacillus*.

Az új nemzetségek kialakításánál a következő szempontok domináltak fontossági sorrendben:

1, az új nemzetségnek monofiletikusnak kell lennie;

2, a nemzetségen belüli AAI és cAAI értéknek magasabbnak kell lennie, mint a nemzetségen kívül;

3, nemzetségen belüli fajoknak ökológiai és fiziológiai tulajdonságaikban meg kell egyezniük, ami alapján elkülöníthetőek más nemzetségektől is;

4, az új nemzetség nagyrészt összhangban kell, hogy legyen a korábbi filogenetikai csoportosítással, illetve a rendszerezés a relatív evolúciós távolságon kell, hogy alapuljon.

A teljes genom vizsgálatoknak hála például az is kiderült, hogy az addig önálló fajként ismert *Pediococcus lolli* az átlagos aminosav azonossági érték alapján egy *P. acidilactici* törzs. Emelett a korábban leírt *L. leiichmannii* és *L. lactis* fajok sem önállóak, hanem a *L. delbrueckii* faj alfajai (Zheng *et al.* 2020).

Doktori kutatásaimat 2016-ban kezdtem meg, így a tejsavbaktérium törzsgyűjtemény törzseinek azonosításának idején még az eredeti osztályozás volt érvényben. Ezért a disszertációmban még az eredeti nevezéktannal szerepelnek a baktériumok.

2.1.3 Tejsavbaktérium nemzetségek

2.1.3.1 *Aerococcus* nemzetség

Az *Aerococcus* nemzetséghez tartozó baktériumok aerob vagy fakultatív anaerob Gram-pozitív kokkuszok, amelyek nem képeznek láncokat. Véres agaron képezi a legnagyobb méretű telepeket, melyek áttetszőek és zöld zóna veszi körül őket. Nutrient táplevesben minimálisan növekszik, de 0,5% glükóz hozzáadásával ez jelentősen növelhető, 9,6-os pH-n is képesek növekedni (Williams *et al.* 1953). Szaporodási optimumuk 22 °C és 37 °C között van, 45 °C-on már nem szaporodnak. Gyakran fordulnak elő oxigénnek kitett poros területeken, ruhaneműk felszínén. Ha az emberi szervezetben meg is található, az valószínűleg a bőr felszínén vagy a felsőlégutakban lehetséges. Táplálkozással, emésztőrendszerrel kapcsolatos szerepe nem ismert.

2.1.3.2. *Carnobacterium* nemzetség

Hideg és mérsékelt éghajlaton széleskörűen előforduló fajok tartoznak a *Carnobacterium* nemzetséghez. Gyakoriak az élelmiszerekben, főleg halakban, húsokban és egyes tejtermékekben is megtalálhatók. Néhány törzs esetében bakteriocin termelés is előfordul (Stoffels *et al.* 1992, Schöbitz *et al.* 2006). Tirozinból tiramint állíthatnak elő az élelmiszerekben, amely a tiramin-intoleráns egyéneknél vérnyomás ingadozást, fejfájást, szédülést, hányingert idézhet elő. Mindazonáltal, a *Carnobacterium* fajok nem humán patogének (Leisner *et al.* 2007). Néhány *C.*

maltaromaticum törzs esetében leírták, hogy patogének lehetnek néhány halfaj esetében, mint például az Ausztráliai lazac (Humphrey 1987).

2.1.3.3. *Enterococcus* nemzetség

Sokáig az *Enterococcus* nemzetséghez tartozó fajokat a *Streptococcus*-ok közé sorolták, mivel gömb alakú sejtjeik hosszabb rövidebb láncokat alkotnak. 1984-ben hozták létre a kemotaxonómiai és filogenetikai vizsgálatokra alapozva az *Enterococcus* nemzetséget, ahová akkor 17 fajt soroltak be. Tág hőmérséklet-tűréssel rendelkeznek, 10 °C és 45 °C között szaporodnak, bár hőmérsékleti optimumuk 37 °C körül van. Anyagcseréjük homofermentatív. Kataláz negatívak, ugyanakkor egyes törzsek képesek pszeudokataláz (nem tartalmaz vasat) előállítására (Byappanahalli *et al*. 2012). Mivel állati és emberi ürülékben is megtalálhatók, ezért fekáliás indikátor baktériumként használják, jelenléte vízben fekáliával történő szennyezettségre utal. Motilításuk fajonként változik, míg például az *E. gallinarium* és az *E. casseliflavus* fajok törzsei képesek a mozgásra, addig az *E. asini* faj törzsei nem. Egyes *E. faecium* és az *E. faecalis* törzseket probiotikumként alkalmazzák hasmenés kezelésére, illetve az immunrendszer stimulálására (Franz *et al*. 2011).

2.1.3.4. *Lactobacillus* nemzetség

A *Lactobacillus* nemzetséghez tartozó baktériumok fakultatív anaerobok, kicsiny, vékony pálcikák, amelyek mozgásképtelenek és láncokba rendeződnek. A normál mikrobióta részét képezik, megtalálhatóak a szájüregben, a béltraktusban és a hüvelyben is. Az általuk termelt tejsav csökkenti a pH-t, így a káros mikrobák nem képesek megtelepedni a környezetükben. Az ide tartozó baktérium fajok vagy obligát homofermentatívok, vagy fakultatív heterofermentatívok, esetleg obligát heterofermentatívok a szénhidrát lebontását tekintve. Számos *Lactobacillus* faj törzsei mutatnak rezisztenciát a vankomicin antibiotikumra, valamint egy génmutációnak köszönhetően több törzs érzékenysége is alacsony az eritromicinre (Flórez *et al.* 2007). Ezzel szemben a penicillinre és a β-laktamázra érzékenyek, ahogy a fehérjeszintézist gátló antibiotikumokra, mint például a makrolidre, kloramfenikolra és a tetraciklinre is (Gueimonde *et al*. 2013). A GRAS besorolású mikrobák közül a legtöbb a *Lactobacillus* vagy a *Bifidobacterium* nemzetséghez tartozik. Ezek a mikrobák biztonságosan használhatóak élelmiszerek előállításához, például tejsavas erjesztéshez számos *Lactobacillus* faj törzseit felhasználják. A kefir előállításánál használt törzsek a leggyakrabban a következő *Lactobacillus* fajokhoz tartoznak: *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. plantarum* és *L. kefiranofaciens* (Prado *et al*. 2015). Joghurt készítésénél az egyik általánosan felhasznált

baktérium törzs a *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajhoz tartozik (Tavakoli *et al.* 2019). Egyes törzsek bakteriocineket termelnek, amelyekkel gátolni tudják a bélben lévő káros Gram-negatív mikrobák szaporodását. A *L. acidophilus* GP1B által termelt acidocin 1B például destabilizálja a kórokozók sejtfalát, amely a sejt líziséhez vezet (Han *et al.* 2007). *L. salivarius* SMXD51 törzs sejtmentes felülúszójából Messaoudi *et al*. (2012) olyan bakteriocint mutattak ki, amely gátolja a *Campylobacter jejuni* szaporodását. A szájüregből izolált *L. paracasei* SD1 törzs által termelt paracasin SD1 bakteriocint termel, amely gátolja a *Candida albicans* élesztő törzsek növekedését (Wannun *et al*. 2014). Egy *L. acidophilus* törzs esetében kimutatták, hogy fekális baktériumok által termelt β-glukuronidáz, a nitroreduktáz és az azoreduktáz enzim aktvitását is képesek csökkenteni, amelyek a prokarcinogéneket proximális karcinogénekké képesek alakítani. Kísérletek alapján az élő sejtekből álló *L. acidophilus* szuszpenzióval beoltott tej fogyasztásának hatására a káros enzimek aktivitása a negyedére-felére csökkent. A kezelést követően a hatás csak 4 hétig maradt meg, majd az enzim aktivitás visszatért az eredeti szintre (Goldin és Gorbach 1984).

2.1.3.5. *Lactococcus* nemzetség

A *Lactococcus* nemzetség tagjai kokkoid, Gram-pozitív, mezofil baktériumok. A sejtek párokat vagy hosszabb rövidebb láncokat alkotnak. Jellemzőjük, hogy a citokrómok hiányoznak a légzési láncukból. A DNS G+C tartalma 34-43% közé tehető. Főleg növényi mintákból izolálták eddig, a talaj, illetve széklet mintákban ritkán fordul elő. A friss tejből ellenben gyakran kimutatják, amiből arra lehet következtetni, hogy vagy a fejés során az állat testéről, vagy a takarmánnyal kerül a tejbe. Különböző bakteriocineket termelhetnek, amelyekkel képesek elpusztítani más mikroorganizmusokat, főleg baktériumokat, vagy gátolni azok szaporodását. Ilyen bakteriocin például a nizin, amelyet számos *Lc. lactis* subsp. *lactis* törzs képes termelni. Az élelmiszeriparban régóta használják ezt a fehérjét adalékanyagként, mivel a kórokozók membránjának elektrokémiai potenciáljának csökkentésével képes gátolni különböző *Clostridium* és *Bacillus* fajok szaporodását tejtermékekben, konzerv zöldségekben és feldolgozott húskészítmények esetében is. A lactococcin a *Lactococcus* nemzetség törzsei által termelt specifikus bakteriocin, amely csak *Lactococcus* törzsekre hat. Átjárhatóvá teszi a sejtfalat, ezáltal pusztítja el a fogékony sejteket. Az élelmiszeriparban a laktokokkuszokat különféle sajtok (colby, cheddar) előállításánál alkalmazzák (Broadbent *et al*. 2003). A kimcsiből izolált *Lc. lactis* KC24 törzs probiotikus tulajdonságokkal bír (Lee *et al*. 2015).

2.1.3.6. *Leuconostoc* nemzetség

A *Leuconostok* nemzetséghez tartozó fajok növények felületén, fermentált élelmiszerekben, tejtermékekben és szilázsban is megtalálhatóak. A sejtek morfológiája függ a közeg összetételétől. Glükóz tartalmú táplevesben hosszúkásak és pálcikaszerűek, míg a főképp laktózt tartalmazó tápközegben, pl. tejben, inkább kokkoid alakúak. A sejtek állhatnak egyedül, párban, de akár közepes méretű láncokat is alkothatnak. Valódi tokot nem választanak ki a sejtek, de a *L. mesenteroides* faj egyes törzsei extracellulárisan dextránt választanak ki, ami egy elektrondenz burkot képez a sejtek körül. Minden ide tartozó faj heterofermentatív anyagcserével rendelkezik. Egyes fajok, pl. a *L. citreum* és a *L. amelibiosum* törzsei, nem képesek fermentálni a laktózt. A *Leuconostoc* nemzetséghez tartozó törzsek rezisztensek a vankomicin antibiotikumra. A betegséget kiváltó törzsek az 1 éves kor alattiakra és az 50 év felettiekre a legveszélyesebb (de Quirós *et al.* 1991).

2.1.3.7. *Oenococcus* nemzetség

Az *Oenococcus* nemzetséghez tartozó legfontosabb faj az *Oenococcus eoni*. A faj törzseit starter kultúraként a borászatban használják, mivel képes az almasavat tejsavvá és szén-dioxiddá alakítani, ez az úgynevezett malolaktikus fermentáció. Jól alkalmazkodott az erősen savas környezethez, az alacsony tápanyag mennyiséghez és a magas etanol koncentrációhoz (Bartowsky 2014). Ez a baktérium ráadásul édes borok esetében is jól használható, mivel a borban lévő cukrok helyett az almasavat preferálja a fermentációhoz, így a bor édes íze megmarad. Az *O. eoni* IOEB 9115 törzs gyulladásgátló potenciállal bír, és csökkentette a vastagbél sérülését egér modell állatokban (Foligné *et al*. 2010).

2.1.3.8. *Pediococcus* nemzetség

A *Pediococcus* nemzetségbe tartozó baktériumok az egyetlenek a tejsavbaktériumok között, amelyek sejtjei tetrád alakban osztódnak. A glükózból gáz képződés nélkül képeznek tejsavat. A DNS G+C tartalma 34-44% között van. Fajai a takarmányok és a szilázs mikrobiótájának meghatározó tagjai (Cai *et al*. 1999). Az élelmiszeriparban fermentált zöldségek és húskészítmények előállításánál alkalmazzák. Száraz kolbász előállításánál például a *P. acidilactici,* illetve a *P. pentosaceus* fajok pediocin előállítására képes törzseivel a *Listeria monocytogenes* kórokozó elszaporodása gátolható. Mivel a pediocint kódoló gén általában plazmidon található, Buyong *et al*. (1998) kísérleteikben egy ilyen gént kódoló plazmidot ültettek *Lc. lactis* törzsbe, amelynek következtében a Cheddar sajt készítésénél a kontrollhoz képest sokkal

kevesebb *L. monocytogenes* volt kimutatható a módosított genommal rendelkező *Lc. lactis*sal kezelt sajtokból.

2.1.3.9. *Sporolactobacillus* nemzetség

Ez a nemzetség különleges a tejsavbaktériumok között, mivel tagjai képesek spórát képezni, amire más tejsavbaktériumok nem képesek. Először zöld malátából, búzakorpából, illetve talajból izoláltak a nemzetséghez tartozó törzseket. Előbb úgy vélték, hogy a *Microbacterium* nemzetséghez tartoznak a nitrát redukció és a hidrogén-peroxid bontás miatt, azonban az, hogy termofilek és hőtűrő spórát képeznek, nem jellemző a *Microbacterium* nemzetségre. 1963-ban Kitahara *et al*. izolált hasonló karakterisztikával rendelkező törzset csirketápból, amely a *Bacillus* és a *Lactobacillus* nemzetségre is emlékeztető tulajdonságokkal bírt. Gram-pozitív, mikroaerofil, mezofil pálcák, amelyek petrich ostorokkal mozognak és mind emellett D(–) tejsavat termelnek homofermentatív úton. Nem termelnek katalázt és nem redukálják a nitrátokat (Kitahara *et al*. 1963). A *S. inulinus* BCRC 14647 törzs vegatatív sejtjei mellett a sejtmentes felülúszója és képes volt jelentős mértékben gátolni a *Salmonella enteritidis* adhézióját Caco-2 sejtvonalon végzett kísérletek során. A nemzetségre jellemző spóraképző képesség a törzs túlélési esélyeit javította savas közegben (Huang *et al*. 2007).

2.1.3.10. *Streptococcus* nemzetség

Gram-pozitív, gömbölyű vagy ovális sejtek jellemzők a *Streptococcus* nemzetségre, amelyek párba vagy láncokba rendeződnek. Fakultatív anaerob, nem spóraképző, kataláz negatív, homofermentatív fajok tartoznak ide. A sztreptokokkuszok általánosságban megtalálhatók a bélmikroorganizmusaink között vagy az alsó nemi traktusban, egészséges felnőttekben általában ártalmatlan, újszülötteknél azonban súlyos betegséget okozhat. A *S. pyogenes* faj egyes törzsei erytrogén toxint termelnek, amely a skarlát kialakulásáért felelős. A toxin roncsolja a hajszálerek endothél sejtjeit, ami a bőrön és a nyálkahártyán kiütéseket okoz. Vannak élelmiszeripari jelentőségű fajaik is, például a *S. lactis*-t és a *S. cremoris*-t kereskedelmi forgalomba kerülő starterekben vaj, tenyésztett író és bizonyos sajtok előállítására használják, míg joghurt készítésnél a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* fajt alkalmazzák.

2.1.3.11. *Tetragenococcus* nemzetség

A *Tetragenococcus* nemzetség 1990-ben jött létre, amikor is az addig *Pediococcus* nemzetségbe tartozó *P. halophilus* fajt átsorolták egy új nemzetségbe *T. halophilus* néven. Ennek a fajnak a törzseit olyan élelmiszerekből izolálták, mint a sós szardella (Villar *et al.* 1985), vagy a fermentált

mustár (Chen *et al*. 2006). A többi tejsavbaktériumtól eltérően jellemző rá a magas só tolerancia és a magas pH tolerancia is. Jelenleg mindösszesen 5 faj alkotja a nemzetséget: *T. halophilus, T. koreensis, T. muriaticus, T. osmosphilus, T. solitarius* (Justé *et al.* 2014). Magas sótartalmú élelmiszerekben ezek a baktériumok a fő tejsavat termelő mikrobák, felhasználják őket mizo és szójaszósz készítéséhez is (An *et al*. 2010, Kuda *et al*. 2012).

2.1.3.12. *Vagococcus* nemzetség

A *Vagococcus* nemzetséget mozgásra képes kokkuszok alkotják, amelyek láncba rendeződnek. Filogenetikailag ugyan jól elkülönülő nemzetséget alkot a tejsavbaktériumok belül, ugyanakkor fenotípusosan nehezen elkülöníthető nem csak a többi nemzetség törzseitől, de számos *Enterococcus* nemzetségbe tartozó törzstől is. Izolálták már fermentált tejből, talajból, fertőzött élelmiszerből és például sertések emésztőrendszeréből is. Több faját is beteg állatokból, főleg halakból és vízi emlősökből izolálták. Ez arra utal, hogy ezekre a fajokra érdemes lehetséges patogénként tekinteni. Emberekben eddig mindösszesen kétszer mutatták ki, egyszer bőrfertőzésből, egyszer pedig vérből (Altintas *et al*. 2020).

2.1.3.13. *Weissella* nemzetség

A *Weissella* nemzetségbe tartozó törzsek kokkusz vagy pálcika alakot is felvehetnek, obligát heterofermentatívok, így CO_2 mellett D(-) tejsavat vagy D(-) tejsav és L(+) tejsav keverékét és ecetsavat is termelnek. Előfordulásuk széleskörű, kimutatták már bőrfelszínről, állatok tejéből és székletéből, nyálból, emberi székletből, növényekből és fermentált élelmiszerekből is. Probiotikus potenciállal is rendelkezhetnek, főleg a *W. cibaria* fajhoz tartozó törzsek, amelyeket fogászati fertőzések visszaszorítására alkalmazhatnak. *W. cibaria* és *W. confusa* törzsekről ismert, hogy emészthetetlen oligoszacharidokat és extracelluláris poliszacharidokat, főként dextránt, állítanak elő (Tingirikari *et al*. 2014). Ezek prebiotikumként való felhasználásával több kutatás is foglalkozik (Amaretti 2020). Más *W. cibaria és W. confusa*, illetve *W. viridescens* törzsek viszont opportunista kórokozóként ismertek (Fusco *et al*. 2015). Embereknél ritkán okoznak megbetegedést, habár az emésztő rendszer nyálkahártyájának sérülése, illetve pl. a kemoterápia is hajlamosíthat a fertőzésre (Kamboj *et al*. 2015). Egy *W. ceti* törzsről kapta a nevét az úgynevezett „weissellózis" nevű betegség is, amely a szivárványos pisztráng fertőzéséért felelős.

2.1.4 Tejsavbaktériumok hatása a magasabb rendű élőlényekre

A tejsavbaktériumok a gazdaszervezetbe kerülve számos jótékony hatással rendelkeznek. Jelenlétükkel eleve csökkentik a patogén mikrorganizmuk számára rendelkezésre álló tápanyagok

mennyiségét, gátló vegyületeket termelhetnek, valamint a bélfalon megtapadva csökkenthetik a káros mikrobák megtapadási lehetőségét. A bél lumenéhez kapcsolódva segítik a gazdaszervezet számára a tápanyagok felvételét és emellett stimulálják az immunrendszerét is. Sok tejsavbaktérium képes a felszínén megkötni káros anyagokat, pl. mikotoxinokat, amelyek így a bélrendszerből nem képesek felszívódni.

2.1.4.1 Kompetitív kizárás

Kompetitív kizárásra bármilyen nem patogén mikroba képes egy élettérben azáltal, hogy versenyre kel az energiaforrásért a kórokozókkal. Egyes probiotikus tejsavbaktérium törzsek a bélfalon megtapadva biofilmet képeznek, amely megakadályozza a patogén mikrobák bélfalon való megtapadását. A bélsárral ezek a megtapadásra képtelen patogének kiürülnek a szervezetből. Filho *et al*. (2015) például 4 tejsavbaktérium törzs felhasználásával készített probiotikus készítménnyel kezeltek broiler csirkéket *Salmonella enteritidis* fertőzés megelőzésére. Brashears *et al*. (2003) szarvasmarhából izolált tejsavbaktériumok *E. coli* O_{157}:H_7 kompetitív gátló képességét vizsgálták. A legjobban gátló törzs a bendőben a *L. crispatus* M35 törzs volt.

2.1.4.2 Gátlóanyagok termelése

A tejsavbaktériumok különböző gátlóanyagokat termelhetnek a patogén mikrobák ellen. Ezek lehetnek bakteriocinek (pl.: nizin, pediocin), szerves savak (pl.: tejsav, ecetsav), de hidrogén peroxid, etanol, diacetil és szén-dioxid is. A bakteriocinek antimikrobiális peptidek, amelyeket Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok is termelhetnek. A klasszikus antibiotikumokkal szemben sokkal célpont-specifikusabbak ezek a fehérjék, így nem pusztítják el az élettérben lévő összes mikrobát. A szerves savak képesek lecsökkenteni az élettérben a pH-t, gátolják az érzékeny mikrobák osztódását és fehérje szintézisét, valamint károsítják a sejtfalat és a citoplazmamembránt is. A tejsav már 0,5%-os koncentrációban a citoplazmamembránt képes megbontani *Salmonella*, *E. coli* és *Listeria* törzsek esetében, ami a citoplazmában lévő fehérjék szivárgásához és ezzel a sejtek pusztulásához vezet (Wang *et al*. 2015). Egyes tejsavbaktérium törzsek hidrogén-peroxidot termelnek (Mitchell *et al*. 2015), ami veszélyes a kataláz enzimmel nem rendelkező mikrobákra. A H_2O_2 ugyanis szabadgyököket képez, amelyek felhalmozódása gátolja a sejtek anyagcseréjét és ezáltal sejthalálhoz is vezethet. A kataláz enzim azonban képes a H_2O_2 vízzé és oxigénné alakítani, így megelőzve a sejtpusztulást. A heterofermentatív törzsek szén-dioxid termelés révén képesek gátolni az aerob baktériumtörzsek növekedését.

2.1.4.3 A gazdaszervezet immunrendszerének stimulálása

A gerincesek immunrendszerét a veleszületett és az adaptív immunrendszer alkotja. Ezek összehangolt működése biztosítja a szervezet védelmét és megfelelő működését. A tejsavbaktériumok mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer hatékony stimulációjára képesek.

Veleszületett immunrendszer az elsődleges immunológiai védelmi vonala a szervezetnek, a bejutó kórokozó ennek a rendszernek az elemeivel kerül először kapcsolatba. A dendritikus sejtek és a NK (natural killer) sejtek a legfontosabb elemei. Az immunrendszer sejtjei a kórokozó hatására citokineket (IFN α,β) kezdenek termelni, amik közvetlenül elpusztítják a kórokozót, vagy felveszik a kórokozót és egy speciális molekuláját a felszínére kitéve un. antigén prezentáló sejtté (APC) alakulnak, ami az adaptív immunrendszer számára „prezentálja" a kórokozó egy darabját, vagyis az antigént. Ez a bemutatás szükséges az adaptív immunrendszer aktiválódásához. Az emésztőrendszerben a bél epithél sejtjei fizikai és kémiai védelmi vonalat képeznek a kórokozók ellen. A tejsavbaktériumok ezekkel a sejtekkel kerülnek interakcióba és stimulálják azok védelmi funkcióit. Például serkentik az antimikrobiális peptidek, a defenzinek termelődését, valamint a szintén antimikrobiális hatású mukóza termelését is. Megelőzik az epithél sejtek apoptózisát és citoprotektív molekulák termelődését indukálják. A *L. plantarum* LTC-113 törzs például képes oly módon felülszabályozni a sejteket összekapcsoló struktúrákat, hogy azok megakadályozzák a *Salmonella* kolonizációját (Wang *et al*. 2018).

Az NK sejtek interleukinok, főként interferonok (IFN-γ) termelésére képesek, működésüket Liu *et al*. (2015) eredményei szerint sertések esetében a *L. brevis* képes volt indukálni.

Az IFN-γ aktiválja a makrofágokat, amelyek feladata a kórokozók eliminálása a szervezetből.

Az adaptív immunrendszer T és B sejtjei antigén specifikus immunválasszal reagálnak a kórokozókra. A B sejtek plazmasejtekké alakulnak, amelyek különböző immunglobulinokat (Ig) termelnek, amelyek antigén specifikusak. Rocha *et al*. (2012) kimutatták, hogy 10^{10} tke/ml baktériumszámú, *Lactobacillus* nemzetséghez tartozó törzsek növelték az IgA és IgG szintet, ami csirkék esetében a mukóza immunitását fokozta. Han *et al.* (2018) hasonló eredményekre jutottak, szintén csirkék esetében, amikor is *L. plantarum* és *Clostridium butyricum* baktérium törzsekkel végeztek etetési kísérleteket. Naqid *et al.* (2015) által végzett sertésetetési kísérletek is azt mutatták, hogy a *L. plantarum* B2984 törzs növelte az IgA és IgM termelést *Salmonella* fertőzés esetén.

2.1.4.4 Tápanyag emészthetőségének javítása

A tejsavbaktériumok fermentáló képességüknek köszönhetően, képesek bontani a makrotápanyagokat. Ezzel elősegítik a gazdaszervezet számára a tápanyagok felvételét, mivel javítják azok emészthetőségét (Liao és Nyachoti 2017). Termelhetnek amilázokat, lipázokat, kitinázokat és proteázokat is. A hasznos enzimek mellett zsírsavakat és vitaminokat, pl. B_2 és B_{12} vitamint is előállíthatnak a gazdaszervezet számára (Capozzi *et al.* 2012).

2.2 Mikotoxinok

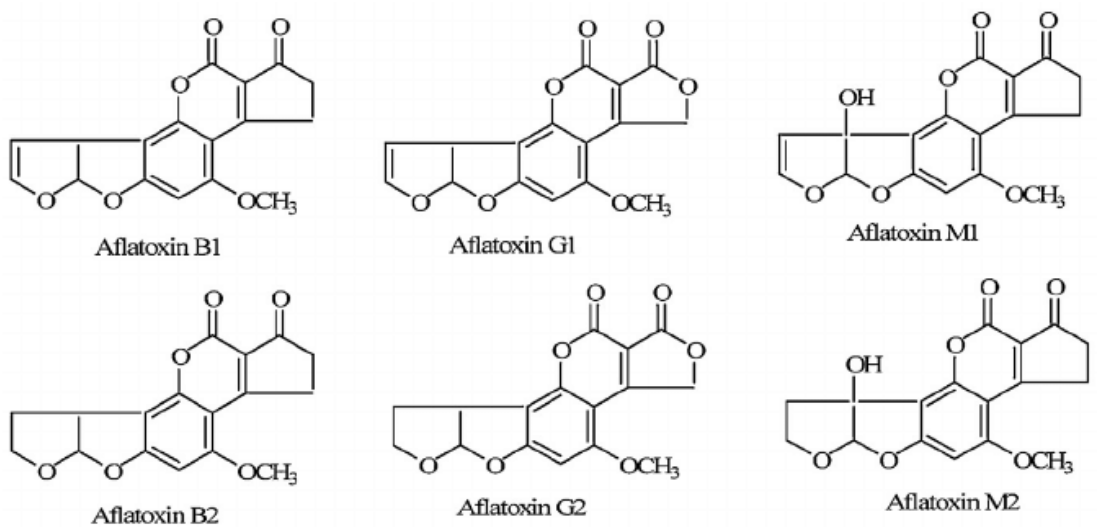
A mikotoxinok a penészgombák által termelt kis molekulatömegű másodlagos anyagcsere termékek, melyek a növény növekedése során a szántóföldön vagy a betakarítás után, a raktározás folyamán keletkeznek. Jelenleg több mint 300 mikotoxint ismerünk, melyek közül 30-nak van jelentős egészségkárosító hatása (Alassane-Kpembi *et al*. 2016). A legjelentősebbek közülük az aflatoxinok, a fumonizinek, az ochratoxin A, a trichotecének és a zearalenon. Ezeket a vegyületeket főként az *Aspergillus*, a *Fusarium* és a *Penicillium* nemzetség tagjai termelik. Az általuk okozott megbetegedéseket összefoglaló néven mikotoxikózisnak nevezzük. A tüneteket nagyban befolyásolja, hogy melyik mikotoxinnal érintkezett a beteg, hogy milyen sokáig volt kitéve neki, hogy milyen az általános egészségi állapota, de az is, hogy milyen életkorú vagy épp milyen nemű az illető. Ronthatja az állapotát, ha más toxinnal is érintkezett, mivel azok szinergista kölcsönhatásba kerülhetnek egymással. A legtöbb esetben a mikotoxin toxinnal szennyezett étellel kerül a szervezetbe, de a bőrrel való érintkezése, illetve a penészspórák belélegzése is okozhat megbetegedést. Jellemzően vese- és máj károsítóak, de okozhatnak daganatos megbetegedéseket, felboríthatják a hormonrendszer normál működést, és emellett sejt- és idegmérgeket is találunk közöttük. A mikotoxinok kutatása az 1962-es londoni pulykavész után kapott nagy hangsúlyt, amikor is Angliában 100.000 szárnyas pusztult el aflatoxinnal szennyezett földimogyoró liszttől, amivel az állatokat etették (Blout 1961). A toxint termelő *Aspergillus flavus* penészgombát egyébként már az 1800-as években felfedezték, de akkor még toxintermelő képességéről nem tudtak.

A mikotoxinok egészség károsító hatásuk mellett komoly gazdasági károkat is okoznak. A határérték feletti mennyiségben mikotoxint tartalmazó élelmiszereket, illetve takarmányokat ugyanis meg kell semmisíteni, ami komoly anyagi kárt okoz a gazdálkodóknak és a gyártóknak is.

2.2.1 Aflatoxin B1

Az aflatoxin B1 (AFB1) az egyik legveszélyesebb mikotoxin. Karcinogén, genotoxikus és főképp a máj károsodásátt okozhatja. Ennek oka, hogy a toxin metabolizmusa itt kezdődik el.

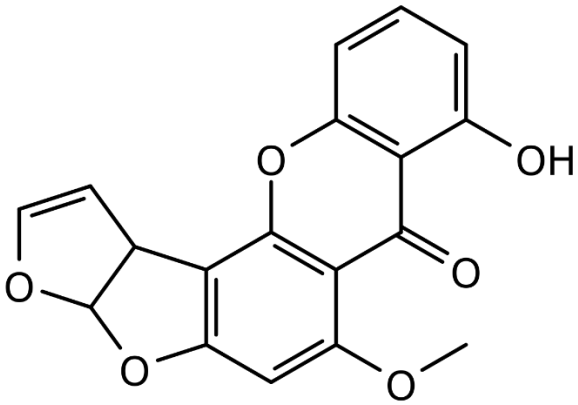
Innen szabadulnak fel reaktív köztes anyagcsere termékek, amelyek a vérárammal eljuthatnak a különböző létfontosságú szervekhez, pl. a veséhez, tüdőhöz, hasnyálmirigyhez és a központi idegrendszerhez is. Az AFB1 mikotoxinnal kapcsolatban a legtöbbet vizsgált vegyület az AFB1-exo 8,9-epoxid. Ez a vegyület genotoxikus és ez keletkezik először az AFB1 metabolizmusa során. Egy citokróm enzim, a CYP 450 hozza létre (Guengerich *et al*. 1998). Az AFB1 által okozott oxidatív stressz is nagy szerepet játszik a vegyület genotoxikus hatásában. Hőstabil vegyület, 250 °C fölött degradálódik, bár nedves környezetben már 160 °C-on is lebomlik (Raters és Matissek 2008). Az *Aspergillus flavus* mellett leggyakrabban az *A. parasiticus* penészgomba egyes törzsei képesek aflatoxin termelésére. A négy legfontosabb *A. flavus* által termelt aflatoxin az AFB1, AFB2, AFG1 és az AFG2 (2. ábra). Az elnevezés az UV fény alatt kibocsátott fluoreszcencia (kék vagy zöld), illetve a vékonyréteg kromatográfia során mutatott mobilitáson alapul. Jelenleg sok ország szigorúan szabályozza a megengedett AFB1 határértéket az élelmiszerekben, illetve a takarmányokban. Az emberi fogyasztásra szánt élelmiszerekben általában a megengedett határérték 0-40 ppb, míg a takarmányokban ez az érték jóval magasabb, 300 ppb (Mazumder és Sasmal 2001). Az International Agency for Research on Cancer (IARC) az AFB1-et az 1. csoportba (karcinogén az emberi szervezetre nézve) sorolja. Az 574/2011 számú EU szabályozás alapján a takarmányokban engedélyezett AFB1 szint 0,02 mg/kg (Commision Regulation EU 2011). Az AFB1 hidroxiláció révén AFM1 -é átlakulhat. Az elnevezése a tejre utal, mivel abból mutatták ki. Az Európai Unió 1881/2006/EK rendelete alapján a nyerstej, a tejalapú élelmiszerek előállításánál használt tej és a hőkezelt tej AFM1 tartalma nem haladhatja meg a 0,05 µg/kg-ot.



2. ábra Különböző aflatoxin vegyületek szerkezeti képletei (Zhang *et al*. 2014)

2.2.2 Szterigmatocisztin

A szterigmatocisztin (ST) az aflatoxin B1 prekurzor vegyülete (3. ábra). Szerkezetileg hasonlít az aflatoxin B1-re és mindkettő a poliketidek közé tartozik (Hopwood és Sherman 1990), bár a ST kevésbé károsítja a szervezetet (Purchase és Van der Watt 1973). Az *A. flavus, A. parasiticus, A. versicolor* és az *A. nidulans* penészgomba fajok egyes törzsei termelik. Az *A. flavus* és az *A. parasiticus* fajok legtöbb törzse képes a szterigmatocisztint aflatoxin B1-é konvertálni, mivel rendelkezik az ehhez szükséges génekkel (Amaike és Keller 2011) míg a másik két faj törzsei nem. Ezért az *A. versicolor* és *A. nidulans* fertőzött élelmiszerekben és takarmányokban nagyobb mennyiségben fordulhat elő szterigmatocisztin (Sweeney és Dobson 1999, Cole és Cox 1981).



3. ábra A szterigmatocisztin szerkezeti képlete (Fujii 1999)

A ST is mutagén és tumor indukáló, ugyanakkor kevésbé erőteljesen, mint az AFB1 (Berry 1988). *In vitro* és *in vivo* tesztek során enyhébb toxikus, mutagén, citotoxikus és karcinogén hatásáról számoltak be, ezért az International Agency for Research on Cancer szervezet a karcinogének 2B csoportjába sorolta (Veršilovskis és De Saeger 2010). Japán kutatók összefüggést találtak a betakarítást követő raktározás során *A. versicolor* fertőzés és a takarmány ST mennyisége között (Sugimoto *et al*. 1976). Tipikusan a rizs és a zab a szterigmatocisztinnel leginkább fertőzött növény (Mol 2015). Pörköléssel csökkenthető a ST szennyezettség (Bokhari és Aly 2009). Habár nehéz megbecsülni, de a mikotoxin szennyezettség (beleértve a szterigmatocisztint is) évente körülbelül 0,4-1,6 milliárd dollár kárt okoz az Amerikai Egyesült Államok agráriumának (Brodhagen és Keller 2006).

2.3 Mikotoxin mentesítés

A mikotoxinok penészgombák által termelt erősen toxikus másodlagos anyagcseretermékek. A takarmánnyal az állati szervezetbe jutva és a bélcsatornából felszívódva a vérben és a szövetekben részben akkumulálódva egészségkárosító hatásúak, de a mikotoxinokkal szennyezett állati terméket fogyasztó ember számára is veszélyforrások lehetnek. Az állattenyésztés során gyakran

jelentős gazdasági károkat okoznak, mivel a takarmánynövények jelentős hányadát szennyezik az egész világon. A mikotoxin mentesítésnek három mikrobiológiai útja lehetséges: lebontás, megkötés, illetve a toxin bioszintézisének gátlása baktériumokkal.

2.3.1 Penészgomba növekedés gátlás

A tejsavbaktériumok nem csak antimikrobiális anyagokat termelhetnek, hanem számos faj törzsei antifungális anyagokat is előállítanak (Gerbaldo *et al*. 2012). Az olyan penészgombák, mint például az *A. flavus* egészség károsító hatással bírnak. Mivel ez a gomba nem csak a takarmányokat, de közvetlenül az élelmiszereket, például különböző olajos magvakat, aszaltgyümölcsöket, és a kávét is képes megfertőzni. Ezzel a komoly egészség károsító hatás mellett jelentős gazdasági károkat is okoz. Ezért az élelmiszeripar régóta próbál védekezni a káros penészgombák ellen. Erre fizikai (hőhatás, magas nyomás, besugárzás, szonikálás) és kémiai ágensek is rendelkezésre állnak. Előbbiekkel az a probléma, hogy vagy nagyon költségesek, mint például a besugárzás, vagy pedig csökkentik az élelmiszer élvezeti értéket és a tápanyagtartalmát (hőkezelés). A szintetikus kémiai anyagok pedig kerülendők, az esetleges egészségre gyakorolt mellékhatásuk, illetve környezeti hatásuk miatt (Wightwick *et al*. 2010). Ezekkel szemben a biológiai védekezés jó alternatíva lehet a káros penészgombák ellen. Például több tejsavbaktérium faj törzseiről is kimutatták, hogy képesek gátolni az *A. flavus* penészgomba növekedését. A gátlás sikerességét számtalan tényező befolyásolhatja. Fontos figyelembe venni a pH-t, az inkubációs idő hosszát és az inkubáció alatti hőmérsékletet, a tápközeg hatását a vizsgált mikroorganizmusok anyagcseréjére, a tápközeg összetevőinek hatását az antifungális komponensek termelésére is. Mindazonáltal ezek a tényezők mind faj specifikusak, így amelyik paraméter ideális az egyik faj esetében, az egyáltalán nem biztos, hogy egy másik esetében is az lesz.

Alapvetően kétféleképpen vizsgálható egy baktériumtörzs penészgomba gátlási képessége. Vizsgálható maga a baktérium törzs egy közegben a penészgombával, illetve tesztelhető a törzs felülúszója. Ez a folyadék tartalmazza a baktérium sejtek által termelt anyagokat, például tejsavat, ecetsavat, oxálsavat és propionsavat, különféle peptideket, de magukat a baktérium sejteket nem.

Élő sejtek penészgomba-gátló képességének vizsgálatára leggyakrabban a kettős agar réteg módszert szokták alkalmazni. Ilyenkor MRS (Lactobacillus Agar DeMan, Rogosa és Sharpe nyomán) agar felszínére vonalhúzással oltják a baktériumot (2 db 2 cm hosszú vonal), 48 órán keresztül inkubálják, majd felöntik lágy maláta agarral, ami 10^6 spóra/ml koncentrációjú szuszpenziót tartalmaz, szilárdulást követően 72 órán keresztül inkubálják, majd lemérik a kialakult gátlási zónát (Muhialdin *et al*. 2020).

A Taheur *et al*. (2019) vizsgálták az élő sejteket tartalmazó tejsavbaktérium szuszpenzió mellett a baktériumok sejtmentes felülúszójának gátló képességét is. Azt találták, hogy a sejtes szuszpenzió jobban gátolta a penészgombák növekedését, mint a felülúszó. A felülúszó pH 7-es értéken egyáltalán nem gátolta a penészgomba törzsek növekedését.

A penészgomba-gátlást nem csak a tejsavbaktériumok, illetve a penészgombák számára kifejlesztett tápközegekben lehet vizsgálni.

Az élelmiszereket modellező közegekben végzett tesztek sokkal biztosabb képet mutatnak arról, hogy a gátló törzsek ipari felhasználás során milyen hatásfokkal gátolhatják a penészgombákat. Salas *et al*. (2018) sajt, illetve joghurt modelleket állítottak elő és ezekben vizsgálták 32 tejsavbaktérium törzs antifungális hatását. Arra jutottak, hogy a legjobb gátlási képességekkel a *Lactobacillus* nemzetség törzsei rendelkeztek. A sajt modell bizonyult a gátlás szempontjából a jobb közegnek, abban ugyanis ugyanazok a törzsek jobban gátolták a penészgombák növekedését, mint a joghurt modellben.

Az utóbbi években a felülúszó gátlóképességének vizsgálata a baktériumok által termelt szervessavak (tejsav, ecetsav stb.) mellett már az általuk termelt peptidekre is kiterjedt. Mind Luz *et al*. (2017) mind Muhialdin *et al*. (2020) a felülúszóból izoláltak több peptidet is és ezeknek a hatását vizsgálták a penészgomba törzsekre. Mindkét kutatás arra jutott, hogy a peptidek gátolták a penészgomba növekedést. Muhialdin *et al*. (2020) scanning elektron mikroszkóppal megvizsgálták a peptidek hatását és a legjobb gátló képességet mutató peptidek keverékénél észlelték, hogy a keverék a micélium hifa csúcsait degradálja.

2.3.2 Detoxifikálás

A mikotoxinok, főleg az AFB1, komoly egészségkárosító hatással bírnak. Amennyiben a mikotoxin a terményben vagy az élelmiszerben megengedett határérték felett megjelenik, úgy azt valamilyen módon el kell távolítani, vagy ha ez nem lehetséges, akkor a szennyezett terményt vagy élelmiszert meg kell semmisíteni, ami jelentős gazdasági károkat okoz a gazdáknak, illetve az élelmiszergyártóknak.

2.3.2.1. Fizikai módszerek

Az élelmiszer és takarmány mikotoxin dekontaminálására különböző stratégiák léteznek fizikai, kémiai és biokémiai elvek alapján. A fizikai módszerek célja, hogy nagy mennyiségben távolítsák el a közegből a szennyezett részt (Bullerman és Bianchini 2007, Cheli *et al*. 2013, Kaushik 2015). Ilyen módszer a válogatás (Scudamore *et al*. 2007), őrlés (Castells *et al*. 2007; Khatibi *et al*. 2014), hántolás (Fandohan *et al*. 2006, Rios *et al*. 2009, Matumba *et al*. 2015), tisztítás (van der

Westhuizen *et al*. 2011), melegítés, besugárzás vagy ezek valamilyen kombinációja (Fandohan et al. 2005, Matumba *et al*. 2015).

2.3.2.2. Szervetlen/szerves adszorbensek

A mikotoxinok megkötésére úgynevezett adszorbeáló ágensnek, nagy molekulasúlyú komponensek képesek. Fontos, hogy a kötés az élőlény emésztő traktusában se bomoljon fel, így a toxin a salakanyaggal együtt tud távozni az emésztőrendszerből.

A megkötést leginkább befolyásoló tényező az adszorbens fizikai struktúrája, vagyis a teljes töltés, a töltéseloszlás, valamint a pórusok mérete és a kötési felszín nagysága. Emellett befolyással bírnak még az adszorbeálni kívánt ágens (jelen esetben a mikotoxinok) különböző jellemzői, például a mérete, polaritása, oldhatósága, alakja is. Az adszorbeáló ágens lehet szilika alapú szervetlenanyag, vagy szén alapú szerves polimer. Szervetlen toxinkötő anyagok jelenleg is kaphatók a kereskedelmi forgalomban és takarmány kiegészítőként használják őket Magyarországon is.

Az aktív szén is alkalmazható adszorbensként, ami a szerves vegyületek pirolízisekor létrejövő nagyon porózus, vízben oldhatatlan, tömegéhez képest nagy felülettel rendelkező anyag. *In vitro* tesztek során jelentős adszorpciós kapacitást írtak le aktív szén esetében 120 mg/g (Galvano *et al*. 1997), 124 mg/g (Galvano *et al*. 1998) értékekkel. Ezzel szemben az *in vivo* tesztekben nem, vagy csak minimálisan kötötte a toxint. Ez a nagymértékű eltérés azzal magyarázható, hogy az aktív szén nem specifikus a mikotoxinokra, így a takarmányban nagy mennyiségben jelenlévő egyéb vegyületeket is megköthette a toxin helyett (Huwig *et al*. 2001).

Az aluminoszilikátokat nem a kémiai összetételük, hanem szerkezetük alapján csoportosítják. A filoszilikátok és a tektoszilikátok adszorbens tulajdonságait szokták leginkább vizsgálni. A filoszilikátok közé tartoznak a bentonitek, a montmorillonitek, a smectinek, a kaolinek és az illitek, míg a tektoszilikátok közé a zeolitek. A bentonitok eredetileg vulkánikus hamu eróziójával keletkeztek. Réteges kristályos mikrostruktúrájuknak köszönhetően képesek megkötni a toxinokat. Tulajdonképpen nem tiszta agyag, ami montmorilloniteket tartalmaz nagy százalékban (Díaz és Smith 2005). A montmorillonitek rétegelt szilikátok, amelyek vagy a felszínükön, vagy a rétegek közötti térben képesek megkötni a toxinokat (Ramos és Hernández 1996). Egy továbbfejlesztett változata a módosított montmorillonit nanokompozit (MMN). Nanomodifikációs technikával növelték a felületét, porózusságát, és a kation cserélő aktivitását, ezzel megnövelve a toxinmegkötő hatékonyságát. Ezek közül a hidratált nátrium-kálcium-aluminium-szilikát (HSCAS) a legtöbbet vizsgált és a leghatékonyabb szervetlen toxinadszorbeáló ágens, a benne található fém ionok kelátot képeznek az aflatoxin β-dikarbonil részével.

Habár ezek a szervetlen anyagok képesek a toxinok kötésére, ehhez nagy mennyiséget kell belőlük a takarmányba juttatni. Mivel nem specifikusan csak a toxinokat kötik, ezért a táplálékban lévő hasznos tápanyagokat, vitaminokat és gyógyszereket is adszorbeálják, ami így felvehetetlenné válik a szervezet számára. Emellett ezek az anyagok gyakran tartalmaznak nehézfémeket (ólom, réz) is, amelyek toxikusak lehetnek az állat szervezetére (Elliott *et al*. 2020). Legtöbbször ezek az anyagok biológiailag nem lebomlóak, ezért a megkötött toxinnal szennyezetten a trágyában felhalmozódhatnak és a szántóföldre is kikerülhetnek.

Ezért nagy jelentőségű lenne olyan szerves toxinkötő ágensek felfedezése és hasznosítása, amelyek toxinspecifikusak és biológiailag lebonthatóak. Jó példák erre az olyan mikroorganizmusok, amelyek az adott körülmények között jól szaporodnak és sejtfelszínük alkalmas a toxin molekuláinak megkötésére.

2.3.2.3. Mikrobiális adszorbensek

A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba faj törzsei a sejtfelszínükön lévő peptidoglikán és poliszacharid (mannán és glükán) láncokkal képesek megkötni a mikotoxinokat. Ezeknek a struktúráknak a felszínén különböző adszorpciós centrumok találhatók, ahol különböző adszorpciós mechanizmusok, például hidrogén híd kötés, ionos vagy épp hidrofób kölcsönhatás, működhetnek. A sejtfal jelentőségének bizonyítására Kolossova *et al*. (2009) összehasonlította az élesztősejtek, illetve csak a sejtfal toxinkötő képességét, és arra jutott, hogy a sejtfal önmagában jobban kötötte a toxint, mint az élő sejt. Devegowda *et al*. (1996) a sejtfal glükomannán komponensét izolálták és ezzel értek el magas toxinkötési értékeket *in vitro*.

A szakirodalomban sok cikk foglalkozik a tejsavbaktériumok toxinkötő képességével. A tejsavbaktériumok GRAS besorolásúak, így alkalmazásuk a szennyezés-mentesítési folyamatokban nem jelent egészségügyi kockázatot. Bizonyos probiotikus baktériumtörzsek képesek mikotoxinok megkötésére és általuk lehetségessé válik a toxin eltávolítása folyékony közegből, sőt eukarióta szövettenyészeteken igazolták, hogy a probiotikum-mikotoxin komplex kevésbé kötődik a szövetekhez, mint a probiotikus baktérium magában, amely elősegítheti a mikotoxin kiürülését a baktériumhoz kötődve a székleten keresztül (Vinderola és Ritieni 2015). Szakirodalmi adatok alapján tejsavbaktériumokat sikeresen alkalmaztak *in vitro* aflatoxin B1 mentesítésére, a hatékonyság azonban erősen törzsfüggő. *Lactobacillus rhamnosus* több törzse is képes volt az aflatoxin szennyezettséget 80%-kal csökkenteni (El-Nezami *et al*. 1998). *Lactobacillus amylovorus* törzseire is található adat, mely szerint 57-60%-ban voltak képesek csökkenteni a mikotoxin-szennyezettséget (Peltonen *et al*. 2001). Egy másik cikkben további mikotoxinokkal kapcsolatban a következő eredményekről számoltak be: *Lactobacillus*

acidophilus 95% ochratoxin A, *Bifidobacterium animalis* 80% patulin, *L. rhamnosus* 50% zearalenon és α-zearalenol eltávolítására volt alkalmas. A fumonizin FB1 és FB2 fuzáriumtoxinok eltávolítására szintén található adat tejsavbaktériumok közreműködésével: *L. rhamnosus* törzseivel 61-94%-os, *L. plantarum* törzsekkel 72-97%, míg *Pediococcus pentosaceus* törzsekkel 79-92%-os mentesítést lehetett elérni (Niderkorn *et al*. 2006).

2.3.3 Toxinbontás

Ami a toxinok lebontását illeti, eddig csak néhány baktériumot ismerünk, amely képes enzimjei révén a mikotoxin molekulaszerkezetét olyan irányban megváltoztatni, hogy az veszítsen toxikusságából (Ji *et al*. 2016).

Először 1966-ban Ciegler *et al*. számoltak be aflatoxin B1 mikrobiológiai detoxifikációjáról az akkor még *Flavobacterium aurantiacum* (ma *Nocardia corynebacterioides)* néven ismert baktérium által. Habár nem maradt a detoxifikációra utaló anyagcsere termék, de a toxinos terményt fogyasztó kacsákon nem mutatkozott a toxin negatív hatása, amiből a detoxifikációra következtetettek.

Ezek a mikroorganizmusok többféleképpen tudják az AFB1-et degradálni. A difurán gyűrű módosításával az aflatoxin B1 AFB1-8,9-dihidrodiol vegyületté alakul. Ezt egy rothadás okozó gomba, a *Phanerochaete sordida* által termelt mangán-peroxidáz idézi elő. Az eredményeket Ames teszttel is igazolták (Wang *et al*. 2011). A *Pleurotus ostreatus* GHBBF10, mely szintén rothadást okozó gomba az AFB1 mennyiségének 91,76%-át átalakította dihidrohidroxiaflatoxin B1-é (AFB2a), amely a AFB1 hidrolitja lehet (Das *et al*. 2014). Ezzel a toxin mutagenitása is csökkent.

Az AFB1 ammóniával, illetve savakkal történő kezelése során észlelték, hogy a lakton gyűrű a vegyületben felbomlik, míg a difurán gyűrű ép marad. Az így létrejött vegyületet detoxifikált AFB1-nek (AFD1) nevezik. A *Pseudomonas putida* faj esetében észlelték, hogy képes AFD1 vegyületté alakítani az aflatoxin B1-et. Ames teszttel igazolták, hogy ennek a vegyületnek alacsonyabb a toxicitása és a mutagenitása is (Méndez-Albores *et al*. 2005). A R*hodococcus eryhtropolis* olyan extracelluláris enzimeket termel, amelyek átalakítják az AFB1-t és ezzel csökkentik annak mutagenitását (Alberts *et al.* 2006). SOS-kromoteszttel Cserháti *et al*. (2013) is igazolta a vegyület genotoxicitásának csökkenését. Teniola *et al*. (2005) is vizsgálta a *Rodococcus eryhtropolis,* illetve a *Nocardia corynebacterioides* fajos törzseinek AFB1 degradációs képességét. Eredményei szerint a felülúszó különböző hatásfokkal, de minden vizsgált törzs esetében csökkentette a közeg AFB1 szintjét. A legjobb mikotoxin redukciós képességgel a *R. eryhtropolis* egyik törzse rendelkezett.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Első lépésként egy nagy elemszámú tejsavbaktérium törzsgyűjtemény létrehozása volt a célom, minél költséghatékonyabb módszereket alkalmazva. Ehhez 15 egzotikus állat fécesz mintáját terveztem feldolgozni klasszikus mikrobiológiai módszereket alkalmazva az izolálás során, majd a tiszta tenyészetekből molekuláris mikrobiológiai módszerekkel DNS-t kivonni. A rep-PCR technika felhasználásával faj szinten szerettem volna csoportosítani a törzseket, így csökkentve az azonosításhoz szükséges 16S rDNS PCR termékek szekvenálására fordítandó költségeket.

Célul tűztem ki annak vizsgálatát is, hogy a kialakított tejsavbaktérium törzsgyűjtemény azonosított törzsei milyen potenciállal rendelkeznek mikotoxin mentesítési feladatok esetében. Mikrobiológiai mikotoxin mentesítés kivitelezhető a mikotoxin termeléséért felelős penészgomba szaporodásának gátlásával, illetve a már a termékben vagy magában az élő szervezetben jelenlévő toxin adszorpciójával. Ezért munkám során vizsgálni terveztem az általam izolált tejsavbaktériumok gátló hatását az *A. flavus* penészgomba toxintermelő törzseivel szemben. A szakirodalomban szó esik egyes tejsavbaktérium törzsek hatékony AFB1 kötő képességéről, de nincsenek szakirodalmi adatok a szterigmatocisztinnel kapcsolatban, ezért a tejsavbaktérium gyűjteményem törzseinek aflatoxin B1 és szterigmatocisztin adszorpciós képességeinek tesztelését, illetve összehasonlítását is szerettem volna megvalósítani.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Tejsavbaktériumok izolálása

Munkám során a Fővárosi Állat és Növénykert 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 sül (*Hystrix indica*), Koala (*Phascolarctos cinereus*), Mhorr-gazella (*Gazella dama mhorr*), Sisakos kazuár (*Casuarius casuarius*), Szélesszájú orrszarvú (*Ceratotherium simum*), Szürke óriáskenguru (*Macropus fuliginosus*), Tarvarjú (*Geronticus eremita*), Vombat (*Vombatus ursinus tasmaniensis*) és Vörös macskamedve (*Ailurus fulgens*). A kiválasztott állatok főként növényevőek, habár közülük egyesek rovarokat is fogyasztanak. A választásban a táplálkozás azért játszott szerepet, mert a növényi eredetű táplálékkal bevitt mikotoxinra esetleg kialakult egy azzal boldogulni képes mikroflóra.

A mintavétel steril Falcon csövekbe történt általában a reggeli kifutó takarítást megelőzően, így a minták nem egy konkrét egyedtől származtak (ahol mégis, ott jeleztem az eredmények fejezetben az egyed nevét). A mintákat még a mintavétel napján feldolgoztam. A mintákból 1-1 g-ot mértem be steril kémcsövekbe (kivéve a botsáska esetében, ott fél grammból indultam ki, mert kis mennyiségű minta állt rendelkezésre), steril peptonvízzel (1 g pepton és 9 g NaCl 1 l desztillált vízben feloldva) hígítási sort készítettem. A hígítási sorozat tagjaiból 0,1 ml mennyiségeket juttattam a MRS tápagar felületére (VWR Chemicals), steril szélesztőbottal szélesztettem, 37 °C-on 2 napig inkubáltam. Az MRS tápagar (1. táblázat) szelektív a tejsavbaktériumokra nézve, mivel a pH-ja 5,7-re van beállítva és 0,14% szorbinsavat is tartalmaz (Corry *et al*. 2003).

1. táblázat MRS tápleves összetétele (g/L)

Enzimatikusan bontott kazein	10,00
Hús kivonat	10,00
Élesztő kivonat	5,00
Glükóz	20,00
Dikálium-hidrogén-foszfát	2,00
Nátrium-acetát	5,00
Ammónium-citrát	2,00

Magnézium-szulfát	0,20
Mangán(II)-szulfát	0,05
Polioxietilén(20)-szorbitán-oleát (Tween 80)	1,08

Minden állat mintájából MRS agarról 100 telepet izoláltam, igyekezve a telepmorfológia figyelembevételével, sztereomikroszkóp alatt, minél több különböző telepből mintát venni. A mintavétel steril fogpiszkálóval, steril kesztyűvel történt, a fogpiszkálót 7 ml MRS táplevest tartalmazó kémcsőbe ejtettem. Az inkubálás 37 °C-on 2 napig történt.

A csövekből kaccsal szélesztettem MRS agar felületére a tisztaság ellenőrzésére és egy telepre történő szélesztés céljából. A lemezeket 37 °C-on 2 napig inkubáltam, a tisztaságot sztereomikroszkóp alatt ellenőriztem.

Amennyiben a tenyészet tisztának bizonyult, a szuszpenzióból 0,5 ml mennyiséget 0,5 ml steril glicerinnel keverve 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe mértem, -20 °C-on tároltam. Szintén 1,5 ml Eppendorf csövekbe 1 ml szuszpenziót mértem, centrifugáltam, a felülúszót eltávolítottam. Az így kapott biomasszát -20 °C-on tároltam (ebből történt a DNS kivonás a további vizsgálatokhoz).

4.2 Tejsavbaktérium izolátumok azonosítása molekuláris biológiai módszerekkel

4.2.1. DNS kivonás

A DNS kivonását az UltraClean Microbial DNA Isolation kit (MoBio Laboratories, Inc., USA) laboratóriumi protokoll előírásainak alapján végeztem el.

A fagyasztóból kivett 1,5 ml Eppendorf csövekben lévő biomasszát szobahőmérsékleten felolvasztottam. A mintákhoz 300 µl Micro Bead Solution-t adtam a minta szuszpendálása, stabilizálása céljából. A mintákat Micro Bead Tube-okba pipettáztam át. Hozzámértem 50 µl mennyiségű MD1 oldatot, melynek a sejtlízis lefolytatásában van szerepe. A Micro Bead Tube-okat tíz percig horizontálisan vortexeltem (rázattam), majd 30 másodpercig 10000 rpm fordulatszámon centrifugáltam. A felülúszót 2 ml-es Collection Tube-okba átmértem. A mintákhoz 100 µl MD2 oldatot adtam, melynek szerepe a fehérjék és az egyéb szennyezők vízoldhatatlanná tételében van. A mintákat 5 másodpercig vortexeltem, majd 5 percre 4 °C hűtőbe helyeztem. A hűtést követően 1 percig 10000 rpm fordulatszámon centrifugáltam. A felülúszót másik steril 2 ml-es Collection Tube-ba átpipettáztam. A csövekbe 900 µl MD3 oldatot mértem. Ez egy koncentrált sóoldat, mely lehetővé teszi a DNS kötődését a szilikagélen. A mintát 5 másodpercig vortexeltem. A mintákból 700 µl mennyiséget steril Spin Filterre pipettáztam, majd

fél percig centrifugáltam. Az átfolyót kiöntöttem, mivel a DNS a szilikamembránra már kikötődött. A minta többi részét is rámértem a filterre, majd centrifugáltam, és az átfolyót kiöntöttem. A Spin Filterekre 300 µl MD3 etanol alapú mosóoldatot mértem, centrifugáltam, majd az átfolyót kiöntöttem. Ezután a filtereket még egy percig centrifugáltam. A szűrőket új steril 2 ml-es Collection Tube-okba helyeztem. A filterek közepére 50 µl MD5 eluáló oldatot mértem, amely a szilika membránról leoldotta a DNS molekulákat, majd 30 másodpercig centrifugáltam, ezt követően eltávolítottam a szűrőket a tubusokból. A tisztított DNS minta a Collection Tube-ok alján kész a további feldolgozásra, illetve -20 °C-on tárolható.

A DNS izoláció sikerességét 1%-os agaróz gélen ellenőriztem. A gél készítéséhez 0,25 g agarózt és 25 ml egyszeres TBE puffert (10x-es TBE oldat összetétele: 108 g Tris, 55 g bórsav, 9,3 g Na_2EDTA, 1000 ml desztillált víz) használtam. A gélhez 1,25 µl ECOSafe Nucleic Acid Staining Solution-t (Pacific Image Electronics Co., Taiwan) adtam. A gélben fésű segítségével zsebeket alakítottam ki. Parafilmre a mintákkal megegyező számú 2 µl Loading Dye festéket pipettáztam, ezekkel elkevertem 5 µl-t a mintákból, majd ezt a keveréket juttattam a zsebekbe. A mintákkal párhuzamosan a GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) molekulamarker mixet futtattam 20 percig 90 V-on. A gélképet UV fény alatt ellenőriztem.

4.2.2 Repetitív PCR (Polimeráz Láncreakció)

Repetitív (rep) PCR során a gének között ismétlődő konzervatív régiókra tervezett GTG_5 (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') primerrel (Sigma-Aldrich, Nagy-Britannia)) a DNS egy rövid szakaszát sokszorozzuk meg. Ezt a primert Gevers *et al*. (2001) eredményei alapján választottam. Összehasonlították rep-PCR esetében általában alkalmazott különböző primerek [REP1R-I (5′-IIIICGICGICATCIGGC-3′), REP2-I (5′-IIICGNCGNCATCNGGC-3′), BOXA1R (5′-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3′) és GTG_5 (5′-GTGGTGGTGGTGGTG-3′)] hatékonyságát tejsavbaktérium törzsek fajszintű azonosításában. Az eredmények alapján az alkalmazott primerek közül a GTG_5 alkalmazásával átlagosan 16,5 csíkot detektáltak a gélelektroforézis során, míg a többi primer esetében a legjobb esetben is mindössze 10 csík volt látható a gélképen. A több csík nagyobb varibilitást eredményez, miáltal nagyobb eséllyel különböztethetőek meg az egyes törzsek faj szinten egymástól.

2. táblázat rep-PCR reakció mix összetétele

Összetevők	**(µl)**

Milli Q víz	27,5
dNTP	10
Dream Taq puffer	5
DMSO	3
Primer	1
Dream Taq polimeráz	0,5
Templát	*3*

A DNS kivonása során képződött mintát templátként használtam a repetitív PCR eljárás során. A reakcióhoz ultratiszta vizet használtam, amely mentes a baktériumoktól, pirogénektől, nukleázoktól, proteázoktól és illékony szerves vegyületektől is. A dNTP adenin, guanin, citozin és timin dezoxiribonukleotid-trifoszfát molekulák elegye, melyek építőkövekként szolgálnak a reakció során keletkező DNS szakaszokhoz. Ezen építőkövek összekapcsolását a Dream Taq polimeráz (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) végzi. Ehhez szükség van egy primerre, amely lánc indítóként funkcionál és a templát DNS megfelelő szakaszához kapcsolódik. A repetitív polimeráz láncreakcióhoz GTG_5 primert használtam. Emellett a polimeráz megfelelő működéséhez Dream Taq puffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) is került az elegybe, amelyben KCl, $(NH_4)_2SO_4$ és $MgCl_2$ is megtalálható. DMSO (dimetil-szulfoxid) pedig azért kerül a mixtúrába mivel segíti a DNS másodlagos szerkezetének felbomlását az által, hogy a DNS molekula kis és nagy árkába is hidrogén hidakkal képes bekötődni, amivel destabilizálja a kettős hélix szerkezetet. A DNS kivonása során képződött mintát templátként használtam a repetitív PCR eljárás során. Az összetevők pontos mennyiségét az 2. táblázat tartalmazza.

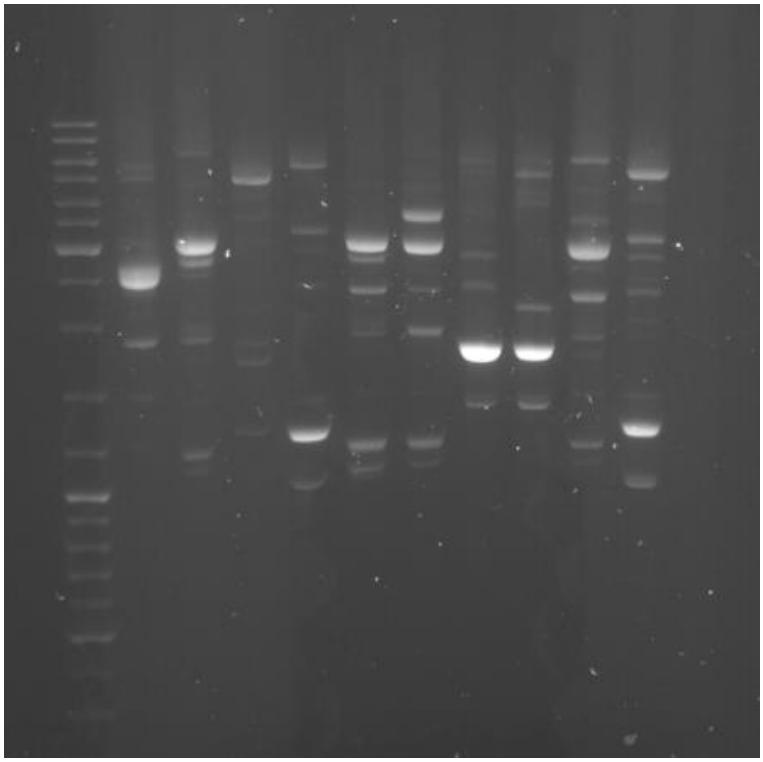
A reakciót az Eppendorf Mastercycler PCR készülékkel (Eppendorf, Hamburg, Germany) végeztem el. A készüléken beállított program egy 6 perces 95 °C-on történő denaturációval indul. A folytatásban harminc egyforma ciklus fut le, melyek mindegyike egy félperces 95 °C-on történő denaturációból, egy 40 °C-on végbemenő egyperces anellációból és egy nyolc perces 72 °C hőmérsékleten lefolyó lánchosszabbításból (polimerizáció áll). A ciklusok lefutása után egy 16 perces polimerizáció következik 72 °C hőmérsékleten.

Az amplikont horizontális gélelektroforézissel agaróz gélben futtattam. A vizsgálathoz 1,2%-os agaróz gélt használtam, amihez ECOSafe Nucleic Acid Staining Solution-t (Pacific Image Electronics Co., Taiwan) adtam.

A gélben fésű segítségével zsebeket képeztem. A PCR termékekből 5 µl-t összekevertem 2 µl futtató pufferrel (Loading dye) és a zsebekbe töltöttem őket. A szélső zsebekbe 5 µl

GeneRuler™ DNA Ladder Mix-et (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) tettem. Pufferként egyszeres TBE oldatot használtam. A mintákat állandó 80 V feszültségen, szobahőmérsékleten 90 percen keresztül futtattam. Az 1,2%-os gélben a nagyobb koncentráció miatt jobban szétválnak a mintában lévő fragmentek. Ezt segíti elő az alacsonyabb feszültségen és hosszabb idő alatt történő futtatás is.

A rep-PCR ujjlenyomat módszer eredményét UV fény segítségével vizsgáltam. A kapott gélképeket géldokumentációs rendszerrel értékeltem (Slite 200W RGB, Pacific Image Electronics Co., Taiwan). Faj szinten eltérő a megsokszorozott régiók hossza és mennyisége, ebből kifolyólag a gélelektroforézis során eltérő mintázatot kapunk a különböző fajok esetében, mind a csíkok helye, mind a vastagsága tekintetében (4. ábra).



4. ábra Rep-PCR termékek mintázata agaróz gélelektroforézist követően

A mintázat alapján a minták csoportosíthatóak és az egyes csoportokból így csak két három minta 16S rDNS-nek megszekvenálása szükséges. Ez a módszer költséghatékonyabb azonosítást tesz lehetővé.

4.2.3 16S rDNS PCR

A rep-PCR minták gélelektroforézise során kapott gélképeket összehasonlítottam és csoportokba rendeztem. Minden csoportból 1-3 mintát analizáltam tovább a 16S rDNS részlet alapján. A

minták azonosításához a 16S rRNS gént amplifikáltam PCR segítségével, a 27f (5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3) és a 1492r (5-TACGG YTACCTTGTTACGACTT-3) primerek (Sigma-Aldrich, Nagy-Britannia) felhasználásával, amelyeket szakirodalmi adatok alapján választottam (Lane *et al*. 1985). A 16S PCR reakció keverék tartalmazta még a négyféle dezoxiribonukleotid trifoszfátot egyenlő arányban (dNTP), DreamTaq DNS Polimerázt (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA USA), 1X DreamTaq puffert (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA), a genomi DNA templátot és ultratiszta vizet (Milli Q víz). A reakcióelegy összetételét a 3. táblázat mutatja.

A reakciót az Eppendorf Mastercycler PCR készülék (Eppendorf, Hamburg, Germany) előre beállított programja segítségével hajtottam végre. A program egy 5 perces 95 °C-on történő denaturációval indul. Ezt követően harminc egyforma ciklus fut le, amelyek egy félperces 94 °C-on történő denaturációból, egy 30 másodperces anellációból, mely 52°C-on zajlik le, és egy másfél perces 72 °C hőmérsékleten történő polimerizációból állnak. A ciklusok lefutása után a PCR folyamatát egy 10 perces polimerizáció zárja le 72 °C hőmérsékleten.

3. táblázat 16S rDNS PCR reakció mix összetétele

Összetevők	**µl**
Milli Q víz	31,7
dNTP	10
Dream Taq puffer	5
DMSO	3
27f primer	0,5
1492r primer	0,5
Dream Taq polimeráz	0,3
Templát	*2*

A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. Az elektroforézis menete hasonló a rep-PCR-nél ismertetetthez, csak itt 1%-os agaróz gélt alkalmaztam. A feszültséget állandó 90 V-ra állítottam, a minták futtatását szobahőmérsékleten végeztem 20 percig.

4.2.4. Szekvenálás

Az amplikon szekvenálását a Baseclear Inc. (Leiden, The Netherlands) végezte el. A szekvenálás során meghatározták a 16S rDNS szakasz bázissorrendjét. Az elektroferogramokat a MEGA6 programmal értékeltem ki. Az azonosításhoz a kapott gén szekvenciákat összehasonlítottam az EzBioCloud adatbankban található 16S rRNS gén szekvenciákkal.

A cég információi szerint a PCR terméket megtisztították a PCR reakció felesleges primer, dNTP, enzim, só maradékaitól. Ehhez a Viogene cég PCR Clean Up System kitjét használták. Az eljárás során szilikát oszlopon megkötötték a DNS-t, majd visszanyerték belőle a 100 -100000 bázispár hosszú részleteket. A tisztítás után a PCR terméket állandó 120V feszültségen 1 órán keresztül 1%-os agaróz gélen futatták. Ezután Nano Drop készülékkel meghatározták az amplikon tisztaságát és koncentrációját. A szekvenáláshoz a tisztított PCR terméket újabb polimeráz láncreakciónak vetették alá, melyben dNTP-ket is alkalmaztak. Ezek fluoreszcens festékkel megfestett dedoxi-ribonukleotidok. A reakcióhoz BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Mix kitet használtak. A PCR reakció utáni termék tisztásához a termékhez 96%-os etil-alkoholt, desztillált vizet és 3 M nátrium-acetátot adtak. Az elegyet 15 percig inkubálták, centrifugálták, majd leöntötték róla a felülúszót. A kapott pelletet centrifugálással megszárították. A pelletet a DNS denaturálásához nagytisztaságú deionizált formamidban feloldották, majd 96 °C-on 3 percig inkubálták. A szekvenálást kapilláris elektroforézis elvén működő készülék segítségével végezték el.

4.3 *Aspergillus flavus* szaporodásának gátlása tejsavbaktériumokkal

Számos szakirodalmi adat bizonyítja, hogy egyes tejsavbaktérium törzsek olyan kis molekula tömegű metabolitokat termelnek, amelyek képesek gátolni a penészgomba törzsek növekedését. Ennek vizsgálatára többféle módszert is kipróbáltam. 20 ml még folyékony állapotú MRS táptalajba kevertem 0,2 ml 10^8 sejt/ml koncentrációjú tejsavbaktérium szuszpenziót és szilárdulást követően erre csöppentettem a penészgomba törzs szuszpenziójából. Ez azonban nem volt eredményes, mivel a tejsavbaktérium gyorsabban szaporodik és nagyobb mennyiségben is volt jelen, így a penészgombának esélye sem volt kinőni, így valódi gátlás nem volt megfigyelhető. A szaporodási idő eltéréséből adódó különbségek ellensúlyozására a táptalajba kevertem a penészgomba szuszpenziót és ennek felszínére csöppentettem, illetve vonal oltással is felvittem a tejsavbaktérium szuszpenziót. Ebben az esetben azonban a tejsavbaktérium nem fejtett ki hatást a penészgombára. Mivel arra gondoltam, hogy az 5 µl mennyiségű cseppben nem volt elég baktérium sejt, ezért az agar közepébe lyukat aplikáltam, amely már elegendően mély volt 100 µl baktérium szuszpenziónak. 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. MRS táptalajt készítettem, amelyhez 100 ml-enként 1 ml-t adtam az egyes penészgomba törzsek szuszpenzióiból, miután 60 ºC alá csökkent a táptalaj hőmérséklete, de még folyékony állapotban volt.

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 beoltott táptalajjal. Szilárdulás után eltávolítottam a kupakot és a keletkezett mélyedésbe 100 µl-t pipettáztam a 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 ºC-os termosztátban 72 órán keresztül inkubáltam. Ezt követően lemértem a lyuk körüli gátlási zóna sugarát.

A legjobb gátlóképességű törzsek esetében megvizsgáltam a mikroba által esetlegesen termelt vegyületek (tejsav, etanol, ecetsav) hatását is. MRS tápagarba az *A. flavus* penészgombatörzs (Zt31, Zt41, Zt55, Zt80) 10^6 spóra/ml koncentrációjú szuszpenziójából 20 ml-hez 200 µl-t kevertem. Szilárdulás után 85%-os, illetve 42,5%-os tejsavból 5 µl-t pipettáztam a felszínére. Az etanol és az ecetsav esetében 48%-os, illetve 24%-os oldatból pipettáztam szintén 5 µl-t az agar felszínére. Mivel szakirodalmi adatokat nem találtam sem az egyes tejsavbaktérium fajok, sem általánosan a tejsavbaktériumok tejsav, illetve ecetsav termelését illetően, ezért a koncentrációk megválasztásánál a rendelkezésemre álló vegyületek kiindulási koncentrációját vettem figyelembe.

4.4 Mikotoxinkötési vizsgálatok

A tejsavbaktérium gyűjteményünk beazonosított mintáit, illetve a BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms) törzsgyűjteményből rendelt 25 db *Lactobacillus* faj típustörzsét (4. táblázat) aflatoxin B1 és szterigmatocisztin megkötő képességük szempontjából is vizsgáltam.

4. táblázat A belga BCCM törzsgyűjteményből megrendelt *Lactobacillus* törzsek

Lactobacillus farraginis BCCM 24140
L. acidipiscis BCCM 19820
L. fructivorans BCCM 09201

L. oryzae BCCM 28404
L. vaccinostercus BCCM 09215
L. siliginis BCCM 24111
L. parafarraginis BCCM 24141
L. amylolyticus BCCM 18795
L. namurensis BCCM 23583
L. aquaticus BCCM 26190
L. vespulae BCCM 30665
L. coryniformis BCCM 09196
L. sharpeae BCCM 09214
L. paralimentarius BCCM 19152
L. mali BCCM 06899
L. midensis BCCM 21932
L. dextrinicus BCCM 11485
L. ghanensis BCCM 24876
L. collinoides BCCM 09194
L. nenjiangensis BCCM 27192
L. perolens BCCM 18936
L. rhamnosus BCCM 06400
L. brantae BCCM 26001
L. insicii BCCM 30641
L. parabuchneri BCCM 11457

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

4.4.1 A bakteriális sejtszám hatása a tejsavbaktérium toxin megkötésére

Az előkísérletet 3 törzzsel (TV3, MA2, TS23) végeztem el. A -20 °C-on tárolt törzsekből 100 µl-rel 9 ml MRS táplevest oltottam be és 48 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam. A 10^8 tke/ml csíraszámú mintából tizedelő hígítási sort készítettem a 10^3 tke/ml hígítási fokig 5 párhuzamosban steril Falcon csövekben. A csíraszámot MRS agarra történő szélesztéssel is meghatároztam. Minden mintához egységesen 0,2 ppm toxint adtam, vortexeltem és ezt követően 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, majd 4.000 rpm-en centrifugáltam 40 percig.

4.4.2 Inkubációs idő hatása a toxin megkötésre

Öt tejsavbaktérium törzs (TV3, TV24, MA2, TS23, SK63) esetében vizsgáltam az eltérő időtartam hatását a toxin megkötésre. Az egyik esetben 15 ml MRS táplevesben 48 órán keresztül 37 °C-on 0,2 ppm AFB1 jelenlétében növesztettem fel a törzseket, míg a másik esetben a 2 napos felnövesztés toxin jelenléte nélkül történt. Utóbbi esetben a 15 ml-es mintákat vortexeltem majd 0,2 ppm toxint adtam hozzá és 10 percig inkubáltam. Az inkubációt követően az összes mintát 4.000 rpm-en centrifugáltam 40 percig.

4.4.3 Toxin hatása a csíraszámra

Három tejsavbaktérium törzset (TV3, MA2, TS23) használtam fel ehhez a kísérlethez. A törzseket 15-15 ml MRS táplevesben 48 óra alatt felnövesztettem. Az egyik mintába 0,2 ppm toxin került, míg a másikba nem tettem. Mindkét mintából MRS agar felszínére szélesztettem 100-100 µl-t a toxinos és a toxinmentes mintákból is, majd 48 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam a lemezeket. Ezt követően telepszámlálást végeztem.

4.4.4 Tejsavbaktérium törzsek toxin megkötése MRS táplevesben

A tejsavbaktérium törzseket -20 °C-on tároltam. A felélesztéshez ezekből a fagyasztva tárolt mintákból 100 µl-t 9 ml MRS tápleveshez adtam. 37 °C-on 48 órán át inkubáltam. Ezekből a mintákból 50 µl-t 15 ml MRS tápleveshez adtam. Ezek a minták is 37 °C-on 48 órán át inkubálva lettek. Minden törzs esetében 3 párhuzamos készült.

Az inkubációt követően 0,2 ppm AFB1 vagy ST toxint adtam a táplevesekhez. Negatív kontrollként MRS táplevest használtam, míg pozitív kontrollként 0,2 ppm toxint tartalmazó MRS táplevest. A csöveket vortexeltem, majd 10 percig szobahómérsékleten inkubáltam. Ezt követően 40 percen keresztül 4.000 rpm-en centrifugáltam őket a felülúszó és a biomassza szétválásához. A felülúszót steril Falcon csőbe átöntöttem és további vizsgálatokig -80 °C-on ultramélyhűtőben helyeztem el. A biomassza AFB1 vagy ST tartalmát HPLC (High-performance liquid chromatography) segítségével határozták meg.

4.5 Aflatoxin B1 és szterigmatocisztin mennyiségi meghatározása HPLC technikával

4.5.1 Mintaelőkészítés

Kontroll

A kontroll 15 ml MRS táplevesben 0,2 ppm AFB1 vagy ST volt. A toxin extrakcióhoz ebből 1 ml-t 2 ml térfogatú Eppendorf-csőbe átmértem, majd 1 ml diklórmetánt adtam hozzá. Ezt az elegyet 20 percig rázattam fekvő vortexben a legmagasabb fokozaton fénytől elzárva. A rázatás közben a

toxin átoldódik az MRS táplevesből a diklórmetán fázisba. A halogénezett szénhidrogén és a vizes fázis szétváltak, így a toxin a diklórmetán fázisból kinyerhető. Ehhez 0,5 ml-t átpipettáztam egy 2 ml-es Eppendorf-csőbe a diklórmetán fázisból. 50 °C-on bepároltam a mintákat a HPLC méréshez.

Biomassza

4.000 rpm fordulatszámon 40 percen keresztül centrifugáltam a mintákat, hogy a biomassza a 15 ml falcon csövek aljában gyűljön össze. A biomasszát 0,2 ml metanol és 1,8 ml diklórmetán elegyével 20 percig rázattam fekvő vortexben a legnagyobb fokozaton. Ezt követően 3.000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltam a mintákat. Majd egy új 2 ml térfogatú Eppendorf-csőbe átmértem 1 ml -t a metanol-diklórmetán fázisból majd 50 °C-on bepároltam a mintákat a HPLC méréshez.

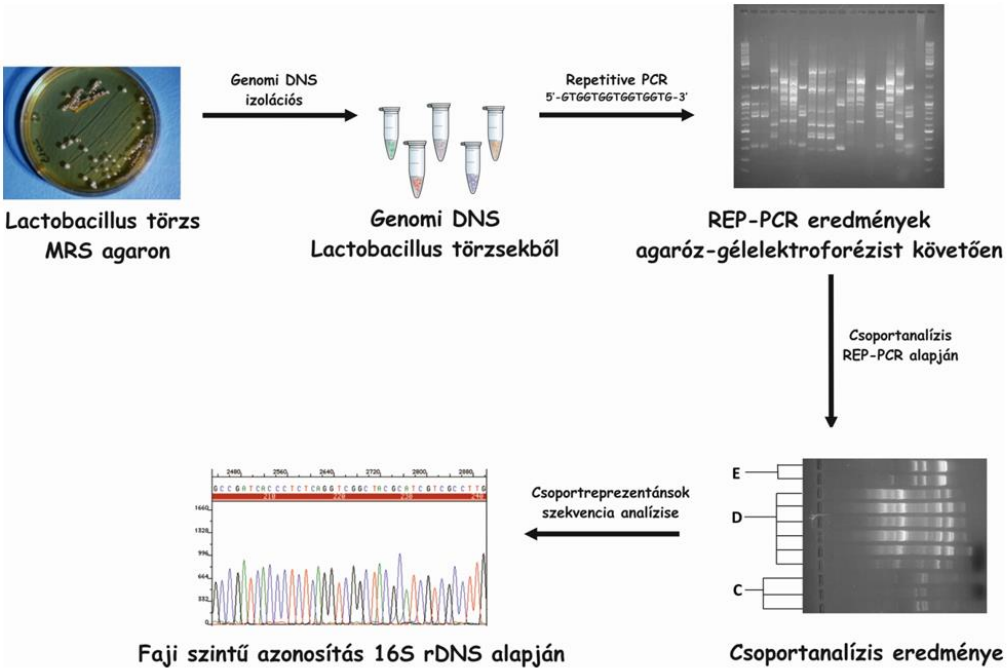
4.5.2 HPLC mérés

Az aflatoxin B1 és szterigmatocisztin mennyiségi meghatározása HPLC technikával történt. A bepárolt mintákat 1 ml eluens oldatban feloldották és 0,45 µm pórusméretű hidrofil politetrafluoretilén filteren átszűrték a HPLC mérést megelőzően. A HPLC vizsgálatokhoz YL9150 automata mintaadagolóval felszerelt YL9100 HPLC rendszert (YL Instruments, Korea) használtak. 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 µm, 15 cm x 0.46 cm) 30 °C-on történt. Az eluens áramlási sebessége 1.0 ml/perc volt és 30 µl minta lett beinjektálva. Az eluens összetételének aránya AFB1 esetében 60:20:20 = A:B:C volt, míg ST esetében 40:30:30 = A:B:C (A = 90% víz:10% MeOH, B = MeOH, C = acetonitril). A biomassza értékeit a pozitív kontroll (0,2 ppm AFB1, illetve ST tartalmú MRS tápleves) esetében kapott értékhez hasonlítottam.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Egzotikus állatok székletmintáiból MRS táptalajon izolált mikrobák összetétele

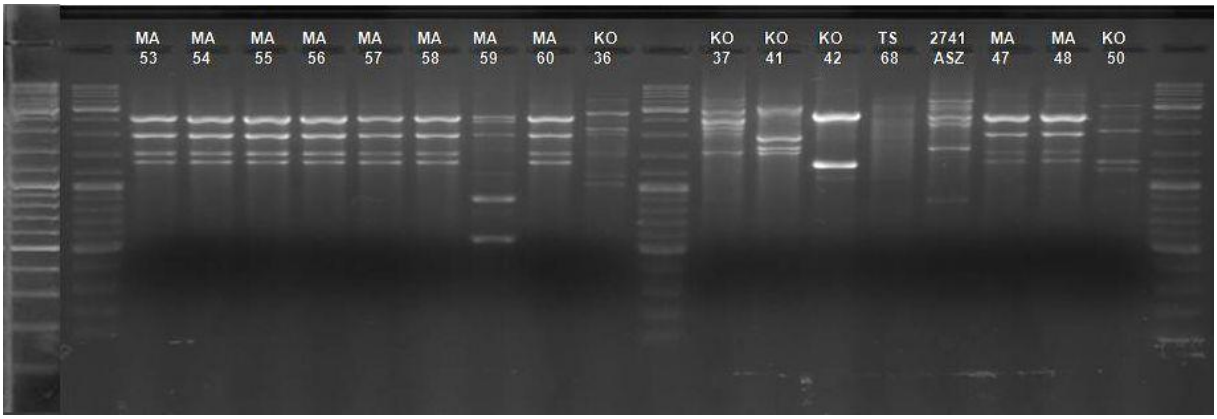
Állatkerti egzotikus növényevő állatok székletmintájából MRS tejsavbaktérium szelektív tápagaron tenyésztettem ki a domináns baktériumokat (8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36. ábra). Állatonként 8-100 izolátumot gyűjtöttem. Legkevesebb a botsáskából (8), a legtöbb pedig a gyűrűsfarkú makiból (89). Egy telepből kiindulva tisztító tenyésztést végeztem. A tejsavbaktérium izolátumok azonosítását molekuláris mikrobiológiai módszerekkel végeztem el. Az izolátum tiszta tenyészetéből genomi DNS-t vontam ki, repetitív PCR reakciót végeztem, a terméket agaróz-gélelektreoforézissel megfuttattam, a kapott mintázatok alapján csoportokat hoztam létre, majd a csoportokból néhány reprezentatív mintát kiválasztva azokat szekvenáltattam. A kapott szekvenciákat online adatbázis segítségével értékeltem (5. ábra).



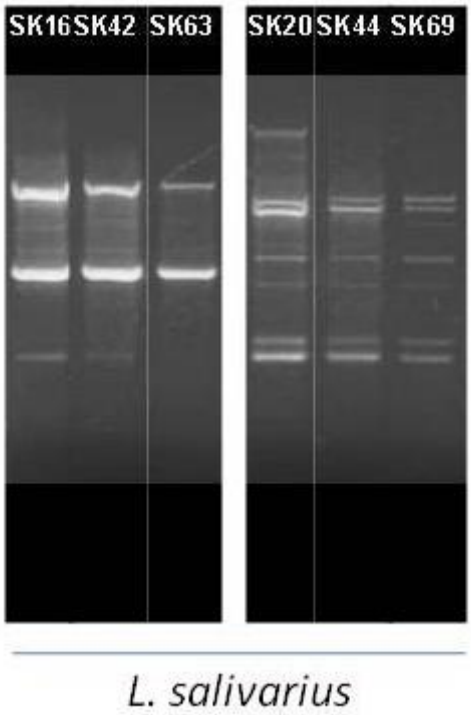
5. ábra A fécesz minták feldolgozása a szélesztéstől az izolált törzsek faj szintű identifikálásig

A DNS minták felhasználásával rep-PCR-t készítettem. A gélelektroforézis során kapott mintázatok jól csoportosíthatóak ahogy az a 6. ábrán is látható. Ezzel a módszerrel sikerrel

leszűkíthető a megszekvenálandó minták száma, ami jelentősen csökkenti az anyagi ráfordítást. Így egy azonos mintázattal rendelkező csoportból csak 2-3 törzs 16S rDNS szekvenciájának meghatározását kell finanszírozni.



6. ábra rep-PCR gélkép (MA: Gyűrűsfarkú maki; KO: Koala; TS: Indiai sül)



7. ábra Sisakos kazuár (SK) fécesz mintából izolált *L. salivarius* törzsek eltérő rep-PCR mintázata

A mintázatok vizsgálatánál szembetűnő felismerés, hogy egy állatfaj székletmintájából izolált törzsek, ha egy fajhoz tartoztak is, előfordult, hogy más mintázatot mutattak (7. ábra). Vagyis a mintázatok egy baktérium fajon belül törzsek szintjén 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 baktérium fajon belül, de összességében a legtöbb törzs mintázata egyforma képet mutat egy adatt 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 alkották a mikrobiomot. Ezzel szemben a vombat, a szélesszájú orrszarvú és az tarvarjú esetében is meglehetősen diverz mikrobiótát izoláltam. A koala esetében még ennél is diverzebb mikrobióta volt fellelhető. Sajnos azonban patogén fajhoz tartozó törzs is volt közöttük, pl.: *Shigella flexneri* vagy a fakultatív patogén *Escherichia coli*.

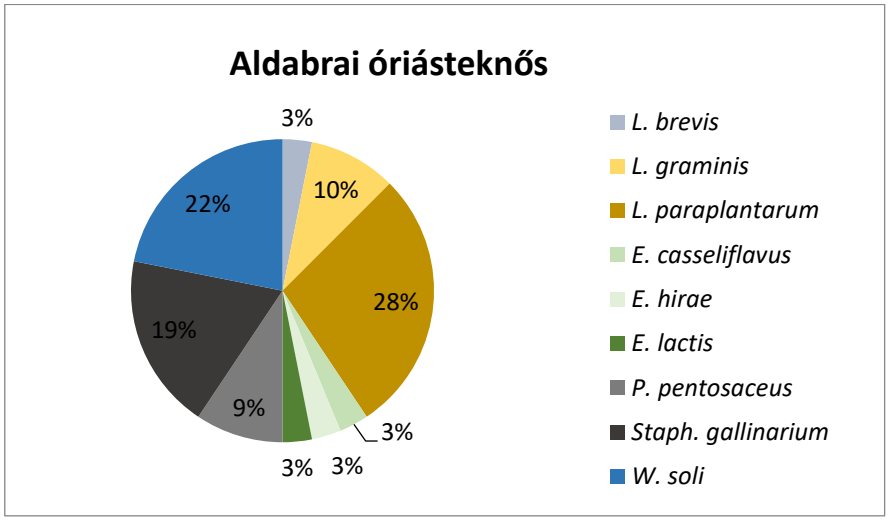
A grafikonokon jól látszik, hogy az MRS tápközegnek köszönhetően (amely szelektív a tejsavbaktériumokra nézve) főként a tejsavbaktérimokhoz tartozó nemzetségek fajainak törzseit sikerült izolálni, habár voltak kivételek. Átlagosan elmondható, hogy ugyan állatonként 100 telepet izoláltam (kivételt képez 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 felélesztheőek.

5.1.1. Aldabrai óriásteknős (Geochelone gigantea)

Nevét az élőhelyéről, a 70 szigetből álló Aldabra-atollról kapta. Rostos növényi táplálékot fogyasztanak és a 70%-os pára tartatom mellett a 28-30 ºC hőmérsékletet kedvelik.

8. ábra Aldabrai óriásteknős székletminta szélesztés (6,5 x 10^5 tke/g székletminta)

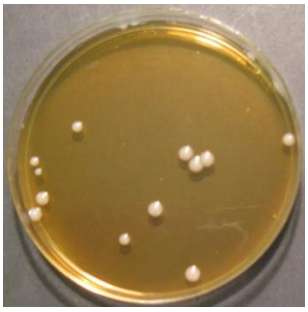
A 100 db fécesz mintából izolált telepből mindösszesen 32 db minta szaporodott fel MRS táplevesben. Az izolátumok 41%-a tartozott a *Lactobacillus* nemzetség 3 különböző fajához, amik között a *L. paraplantarum* dominált. A *Weisella* nemzetség egyetlen faja a *W. soli* képviseltette magát a minták között 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 (9. ábra). Sandri *et al*. (2020) összehasonlították a Seychelles-szigeteken vadon élő Aldabrai óriásteknősök székletmintáit, illetve olaszországi és seychelle-szigeteki állat- és növénykertekben kontrollált környezetben élő óriásteknősök mintáit. Metagenom analízis alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a vadon élő állatok székletmintái diverzebbek voltak, és szignifikáns eltérés mutatkozott a vadon élő, az olasz állat-és növénykertben, illetve a Seychelle-szigeteken lévő állat- és növénykertben élő állatok székletmintáinak mikroba összetételében is. Összességében a törzs szintű azonosítás során a *Bacteroidetes* és a *Firmicutes* törzsek domináltak a mintákban.



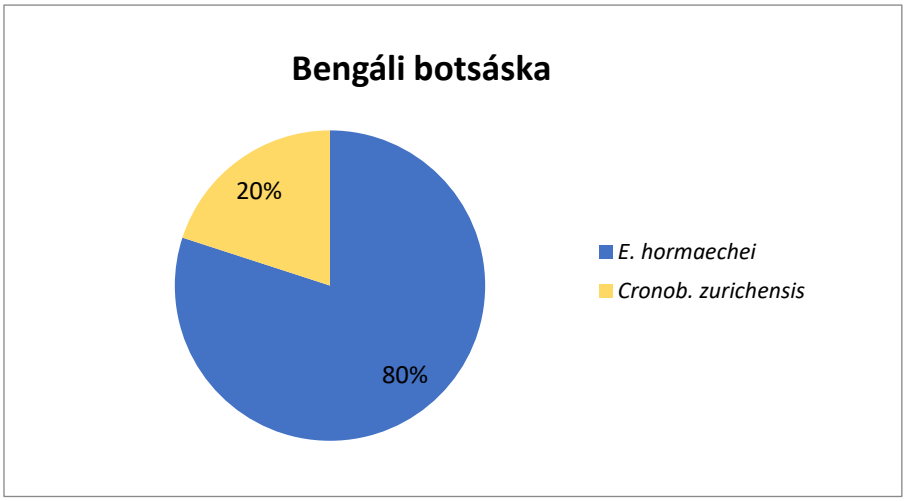
9. ábra Az Aldabrai óriás teknős mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.2. Bengáli botsáska (Medauroidea extradentata)

Nevével ellentétben Vietnám területén, bozótosokban él és levelekkel táplálkozik. Éjszakai életmódot folytat, csak ekkor kezd táplálkozni. Érdekességképpen vizsgáltam meg egy rovar székletmintáját is, hogy találok-e tejsavbaktériumot benne. 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 (11. ábra). Shelomi *et al*. 2015-ben vizsgálták több ízeltlábú között a Bengáli botsáska teljes bélrendszerének mikrobiotáját tenyésztéses módszerrel. Szobahőmérsékleten inkubált TSA (Tripton szója agar) lemezekről baktériumokat, míg RBCA (Bengál rózsa- kloramfenikol agar) lemezekről gombákat szerettek volna izolálni. A Bengáli botsáska esetében csak a bazidiumos gombák közé tartozó *Cryptococcus saitoi* fajhoz tartozó törzseket sikerült izolálniuk. Tejsavbaktériumok izolálásához egyébként ez a módszer nem lenne megfelelő, mivel sem a táptalaj sem az inkubációs hőmérséklet nem volt kedvező ezen baktériumok szaporodásához.



10. ábra Bengáli botsáska székletminta szélesztés (2,4 x 10^6 tke/g székletminta)

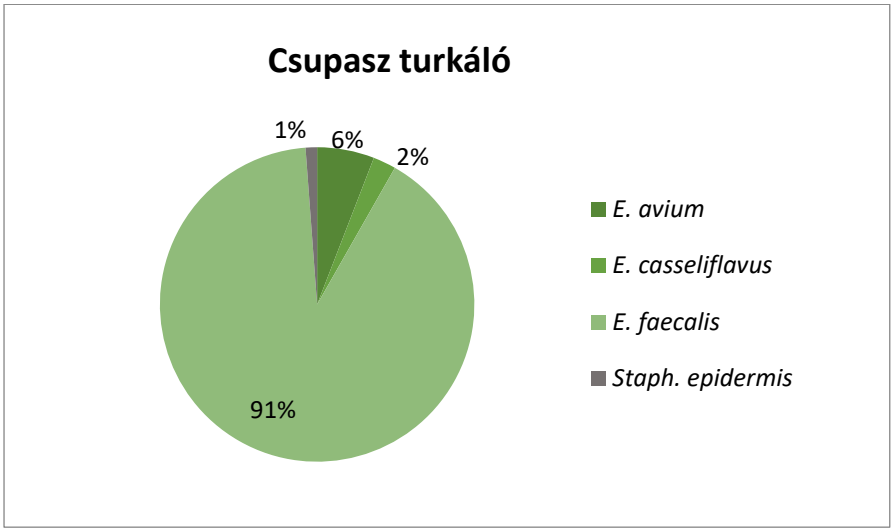


11. ábra A Bengáli botsáska mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.3. Csupasz turkáló (Heterocephalus glaber)

A csupasz turkáló Afrika keleti részén, Szomáliában, Délkelet-Etiópiában és Kenya keleti területein honos. A föld felszíne alatt él, gumókkal és gyökerekkel táplálkozik. 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 (13. ábra). Az irodalomban nem sok adat lelhető fel ezeknek az állatoknak a bélmikrobiotájáról. Debebe *et al*. (2016) véres agaron aerob és anaerob módon is tenyésztették a fécesz mintákban lévő baktériumokat. Faj szinten a domináns mikrobák a *Bacillus megaterium* (45.2 %), illetve a *Bacteroides thetaiotaomicron* (19.4 %) voltak.

12. ábra Csupasz turkáló székletminta szélesztés (6,8 x 10^6 tke/g székletminta)

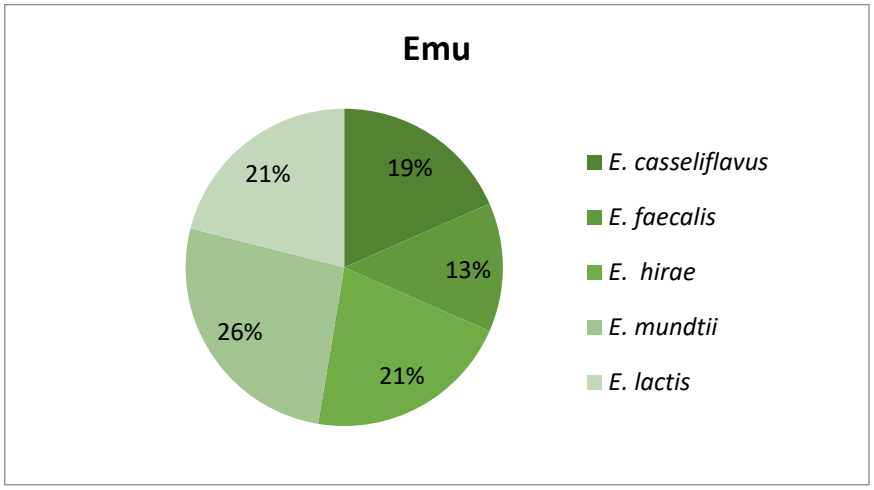


13. ábra Csupasz turkáló mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.4. Emu (Dromaius novaehollandiae)

Az emu Ausztráliában őshonos röpképtelen futómadár, főleg növényeket (füvet és gyümölcsöket) eszik. 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 (15. ábra). Az emu esetében nincs adat a széklet mikrobaösszetételére vonatkozóan. Az egyetlen cikk, amely bizonyos szempontból az emésztőrendszer mikrobiomjával foglalkozik az Bennett *et al*. 2013-as cikke. Ők árpa, lucerna és repce alapú étrend hatását vizsgálták a vakbél mikrobiotájára metagenom analízissel. Az eredmények azt mutatták, hogy a domináns törzsek a *Bacteroidetes,* a *Proteobacteria,* a *Fusobacteria* és a *Firmicutes* voltak.

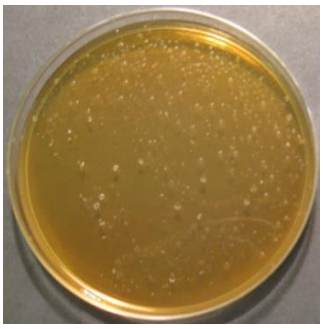
14. ábra Emu székletminta szélesztés (3,3 x 10^7 tke/g székletminta)



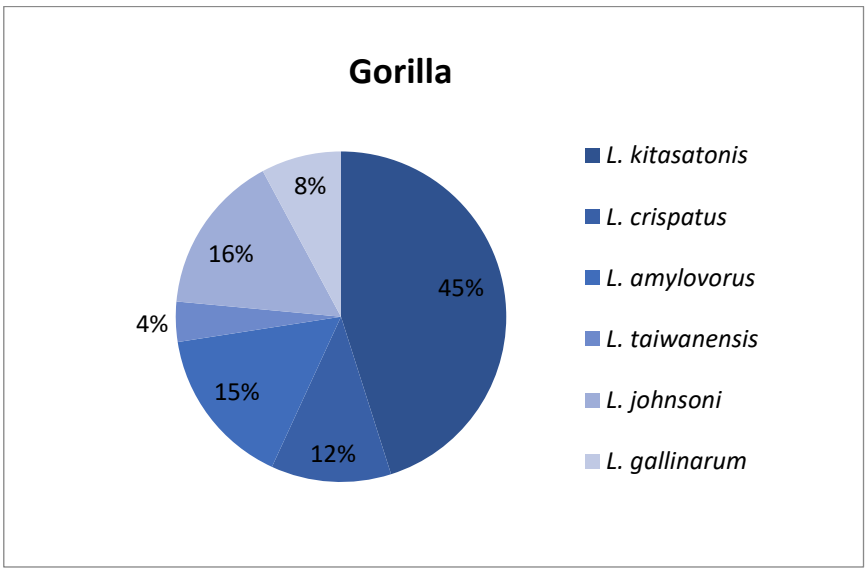
15. ábra Emu mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.5. Gorilla (Gorilla gorilla)

A gorilla Afrika nyugati síkvidéki területein él, főleg levelekkel, hajtásokkal és gyümölcsökkel táplálkozik. A 100 db izolált telep közül 51 db szaporodott fel MRS táplevesben. Ezek mindegyike a *Lactobacillus* nemzetséghez tartozott, további *Lactobacillus* törzsek izolálásához érdemes lehet egyéb főemlősök székletmintáinak vizsgálata a jövőben. A törzsek 6 különböző faj között oszlottak meg, dominánsnak a *L. kitasatonis* faj bizonyolt, amihez a minták 45%-a tartozott. A legkevesebb törzs (2 db) a *L. taiwanensis* fajhoz tartozott (17. ábra). Gomez *et al.* (2015) metagenom analízist végeztek gorillák székletmintáin. A *Firmicutes* törzs 44,8%-ban a *Bacteroidetes* törzs 20,1%-ban még a *Actinobacteria* 12,62%-ban volt jelen. Tsuchida *et al.* (2014) fogságban tartott és vadon élő gorillák székletmintájából egyaránt izoláltak olyan törzseket, amelyek a tudomány számára addig ismeretlenek voltak. Új fajként *Lactobacillus gorillae* néven írták le őket.



16. ábra Gorilla székletminta szélesztés (9,5 x 10^7 tke/g székletminta)

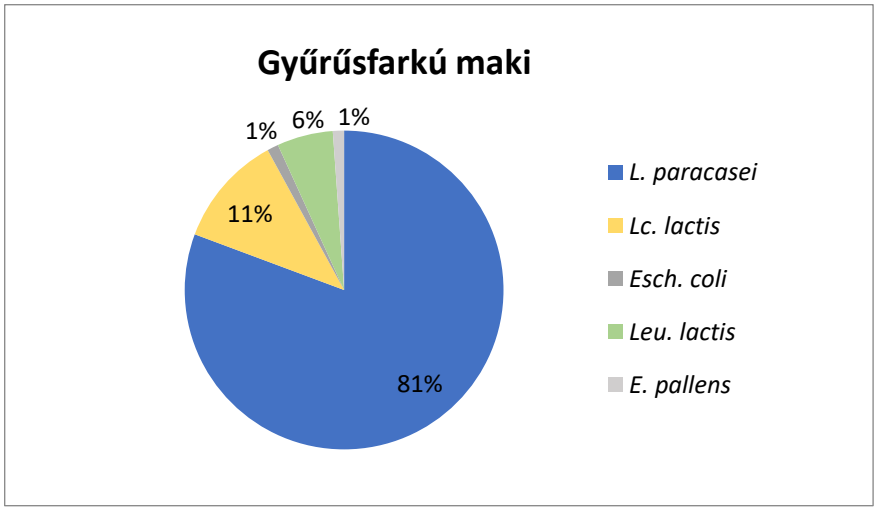


17. ábra Gorilla mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.6. Gyűrűsfarkú maki (Lemur catta)

A gyűrűsfarkú makik Madagaszkáron élnek, főleg levelekkel és gyümölcsökkel táplálkoznak, de olykor ízeltlábuakat is elfogyasztanak. 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 ia 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 (19. ábra). Fogel 2015-ben vadon élő és állatkertben tartott állatok székletmintáinak diverzitását vizsgálta. Metagenom analízis során törzs szinten jelentős eltérést talált a minták között. A vadon élő állat esetében szignifikánsan több *Firmicutes*, *Actinobacteria* és *Euryarchaeota* fordult elő, míg az állatkerti példány esetében a *Bacteroidetes* és a *Spirochaetes* törzsek voltak jellemzőek.

18. ábra Gyűrűsfarkú maki székletminta szélesztés (1,7 x 10^6 tke/g székletminta)

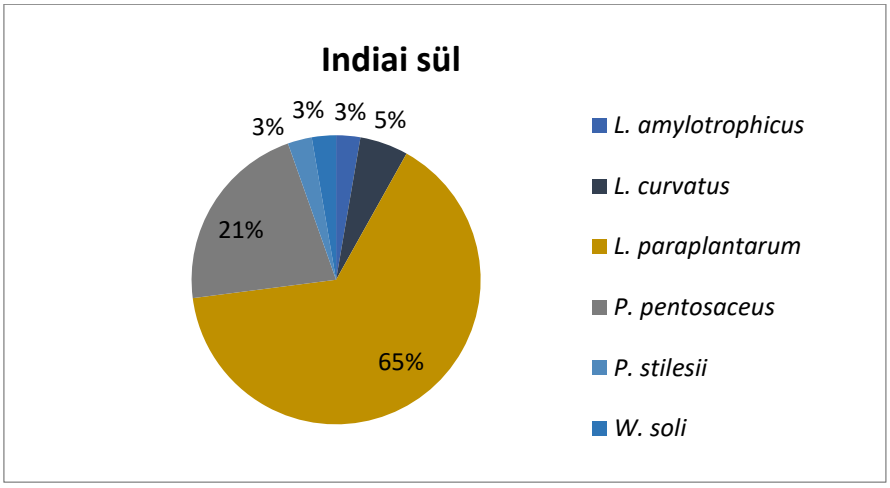


19. ábra Gyűrűsfarkú maki mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.7. Indiai sül (Hystrix indica)

Az indiai sül Ázsia távol-keleti részén és a Közel-Keleten élő állat, éjszakai életmódot folytat. Gumókat, gyökereket fogyaszt, de olykor rovarokkal is táplálkozik. 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*). A *Weisella* nemzetségből csak a *W. soli* fajhoz tartozó törzseket sikerült izolálni, ezek a minták 3%-át tették ki (21. ábra). A szakirodalomban nem lelhető fel adat az Indiai sül bélmikrobiotájával kapcsolatban.

20. ábra Indiai sül székletminta szélesztés (4,6 x 10^6 tke/g székletminta)

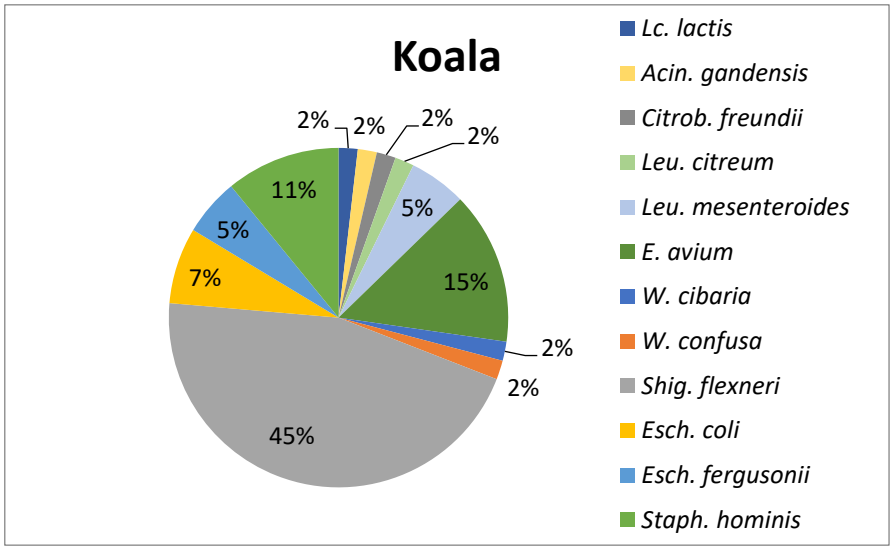


21. ábra Indiai sül mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.8. Koala (Phascolarctos cinereus)

A koala Ausztráliában él, tápláléka legnagyobb részt eukaliptusz levelekből áll. Az izolált telepekből 55 db szaporodott fel MRS táplevesben. A mikrobióta összetétele az egysíkúnak nevezhető táplálkozás ellenére rendkívül diverznek bizonyult. Sajnos a minták legnagyobb hányadát (45%) a *Shigella flexneri* fajhoz tartozó törzsek tették ki. Ez a mikroba kórokozó, a bél hámsejtjeibe behatol és ott gyulladást, illetve sejtpusztulást okoz, ami halállal is végződhet. A mintavétel óta sajnálatos módon az állatkert mindkét koalája bélgyulladásban elpusztult. Az *Enterococcus* nemzetség egyetlen fajjal, az *E. avium*-mal képviseltette magát a törzsek között. Meghatározó (11%) volt a *Staphilococcus hominis* fajhoz tartozó törzsek jelenléte is, ezek a mikrobák opportunista patogének, melyek a szelektív MRS táptalaj ellenére megjelentek a tápagar felszínén. 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 (23. ábra). A koalák táplálékául szolgáló eukaliptusz gazdag csersavban, ami erősen köti a fehérjéket, úgynevezett tannin-fehérje komplexet létrehozva, amely nehezen bontható. Osawa *et al.* (1995) koalák székletmintáit vizsgálták, amelyből sikerült olyan baktérium törzseket izolálniuk, amelyek tannázt termelnek, amely képes a csersav-fehérje komplexet lebontani. Ezek a törzsek egy fajhoz tartoztak, amely addig ismeretlen volt, így *Lonepinella koalarum* néven írták le a tudomány számára.

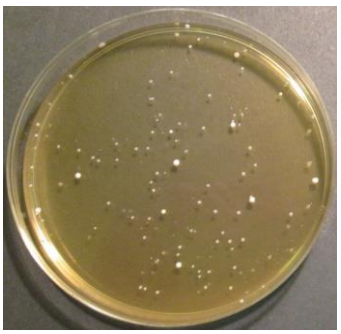
22. ábra Koala székletminta szélesztés (5,7 x 10^6 tke/g székletminta)



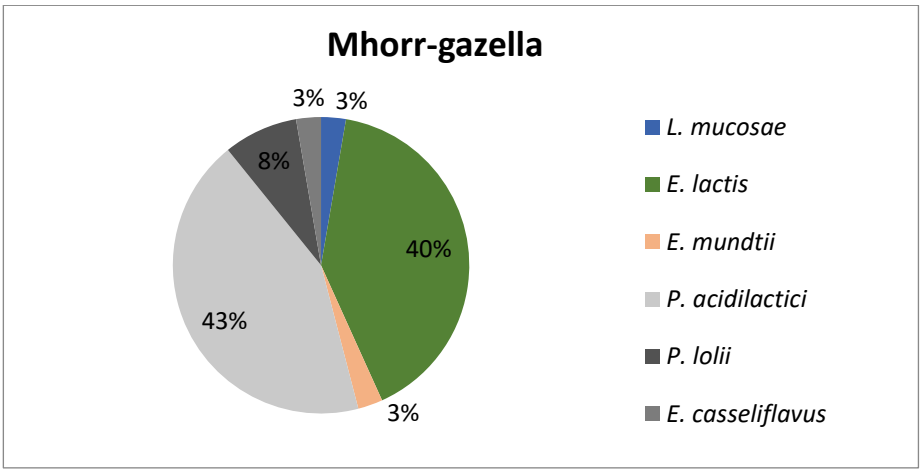
23. ábra Koala fécesz mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.9. Mhorr-gazella (Gazella dama mhorr)

Északnyugat-Afrikában honos állat a Mhorr gazella, sajnos azonban teljesen kipusztult a természetes élőhelyéről, így jelenleg csak állatkertekben fellelhető. Akácia és más cserjék, bokrok hajtásaival táplálkozik. Az izolált telepek közül 37 db szaporodott fel MRS táplevesben. Ezeknek a törzseknek az 51%-a tartozott a *Pediococcus* nemzetség két fajához. A *P. acidilactici* volt a dominánsabb faj, összességében a törzsek 43%-a tartozott ide. Ehhez képest a másik faj a *P. lolii* csak 8%-ban volt jelen az izolált törzsek között. Az *Enterococcus* nemzetséghez a törzsek 46%-a tartozott, a nemzetségen belül az *E. lactis* dominált, az összes törzs 40%-a ehhez a fajhoz tartozott. A *Lactabacillus* nemzetség *L. mucosae* fajához a törzseknek csak a 3%-a tartozott (25. ábra). A Mhorr-gazella bél mikrobiom összetételével kapcsolatban nem találtam adatokat.



24. ábra Mhorr gazella (nőstények) székletminta szélesztés (1,3 x 10^6 tke/g székletminta)

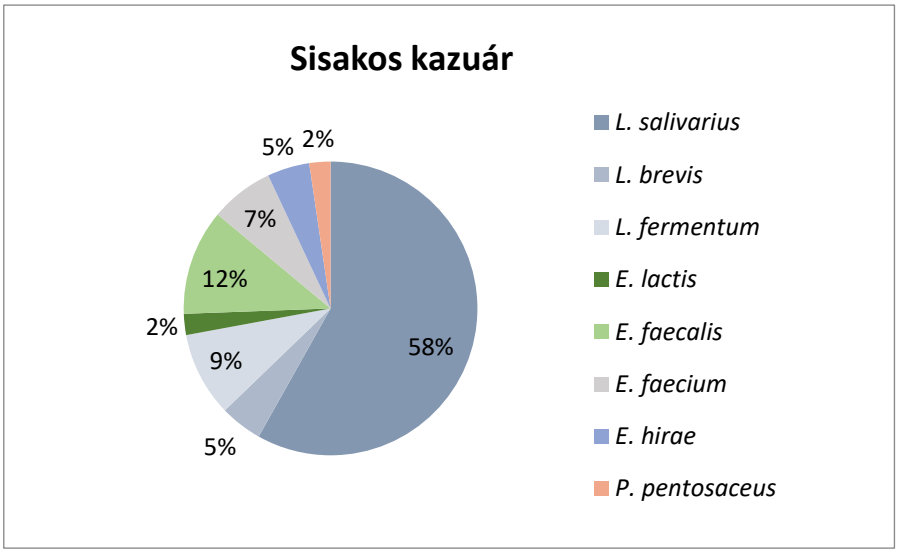


25. ábra Mhorr-gazella fécesz mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.10. Sisakos kazuár (Casuarius casuarius)

A sisakos kazuár Új-Guineán ás Ausztrália északkeleti területein honos. Gyümölcsöket, rovarokat és apróbb gerinces állatokat fogyaszt. 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 (27. ábra). Nem találtam adatot a szakirodalomban a bélmikrobiom összetételre vonatkozóan.

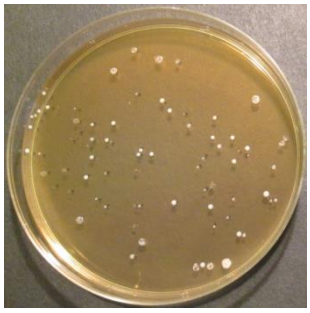
26. ábra Sisakos kazuár székletminta szélesztés (7,1 x 10^6 tke/g székletminta)



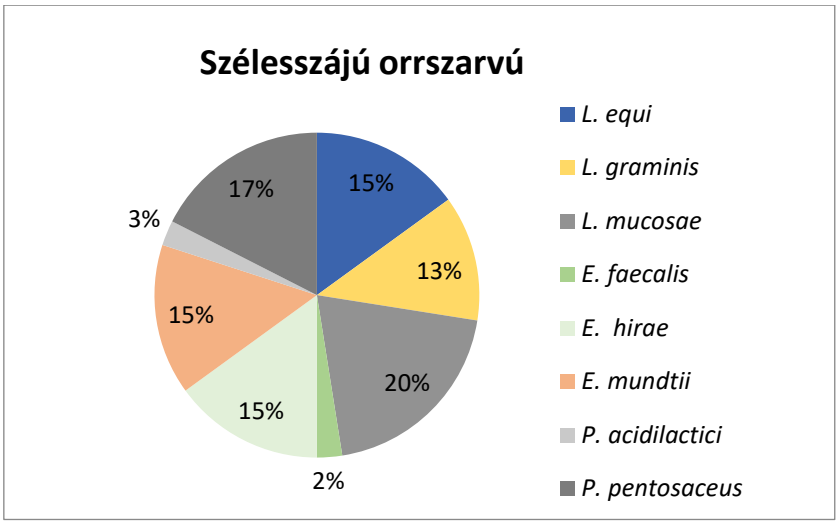
27. ábra Sisakos kazuár fécesz mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.11. Szélesszájú orrszarvú (Ceratotherium simum)

A szélesszájú orrszarvú Dél és Kelet-Afrikában honos állatfaj, növényevő, főként fűfélékkel táplálkozik. 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 a mikrobiomban (29. ábra). Bian *et al.* (2013) öt szélesszájú orrszarvú székletmintáját vizsgálták metagenom analízissel. Ezek közül egy állat esetében antibiotikumos kezés után vett mintával dolgoztak. A 4 egészséges állattól származó minta mindegyikében a *Firmicutes* és a *Bacteroidetes* törzsek domináltak, amelyek egyébként az egészséges ember és a legtöbb emlős bélflórában is a domináns törzsek. Család szinten a legtöbb szekvencia a *Ruminococcus* spp., *Butyrivibrio* spp. és a *Clostridium* spp.-hez tartozott. Az ide tartozó baktériumok ismertek rost-bontó képességükről, így fokozott jelenlétük növényevő (de nem kérődző) állatok bélrendszerében nem meglepő. Ezzel szemben az antibiotikummal kezelt állat esetében számottevő mennyiségben (4,62%) megjelent az *Aerococcus viridans* faj. Ez a baktérium a tejsavbaktériumok közé tartozik, de ismert tény, hogy betegségeket, pl. endokarditist, illetve húgyúti fertőzést is okozhat. Emellett rezisztens a cefotaxim antibiotikumra is, amivel a beteg állatot is kezelték korábban. Kisebb mennyiségben a *Lactobacillales* rendhez tartozó szekvenciákat is találtak, szemben az egészséges állatok mintáival. Ennek oka lehet, hogy a *Lactobacillus* nemzetség egyes törzsei esetében a már említett cefotaxim nagy MIC (minimális gátló koncentráció) értékkel rendelkezett, vagyis nagy mennyiségre van belőle szükség, hogy gátolja ezeknek a *Lactobacillus* törzseknek a növekedését (Anisimova és Yarullina 2019).



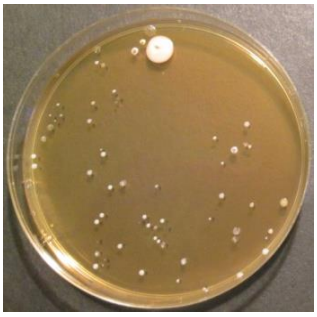
28. ábra Szélesszájú orrszarvú (Layla) székletminta szélesztés (2,3 x 10^6 tke/g székletminta)



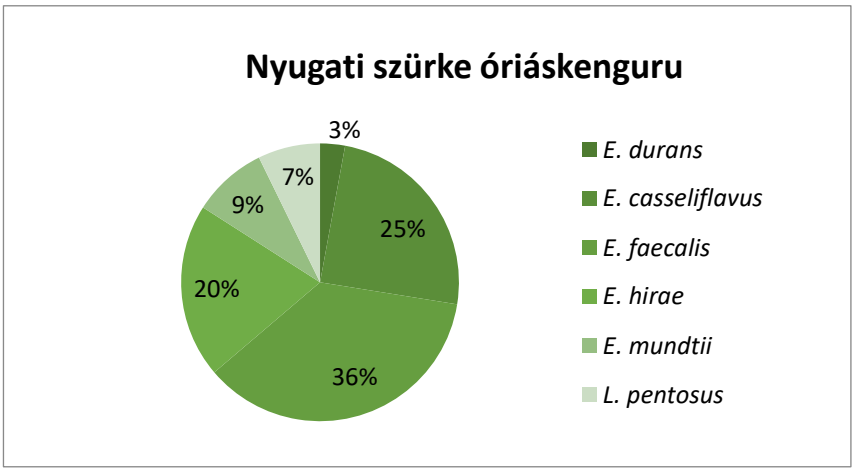
29. ábra Szélesszájú orrszarvú fécesz mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.12. Nyugati szürke óriáskenguru (Macropus fuliginosus)

A szürke óriáskenguru Dél és Délnyugat-Ausztráliában élő, fűfélékkel táplálkozó emlős állat. 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*) (31. ábra). Gulino *et al.* (2013) ugyan nem a Szürke óriáskenguru, hanem a Vörös, a Keleti szürke és a Hegyi óriáskenguru székletmintáit vizsgálták metagenom analízissel, de elmondhatjuk, hogy a kenguruk esetében is a *Bacteroides* és a *Firmicutes* törzsek, illetve a *Bacteroidia* (48,3%) és a *Clostridia* (46,2%) osztályok domináltak.



30. ábra Nyugati szürke óriáskenguru székletminta szélesztés (5,0 x 10^5 tke/g székletminta)

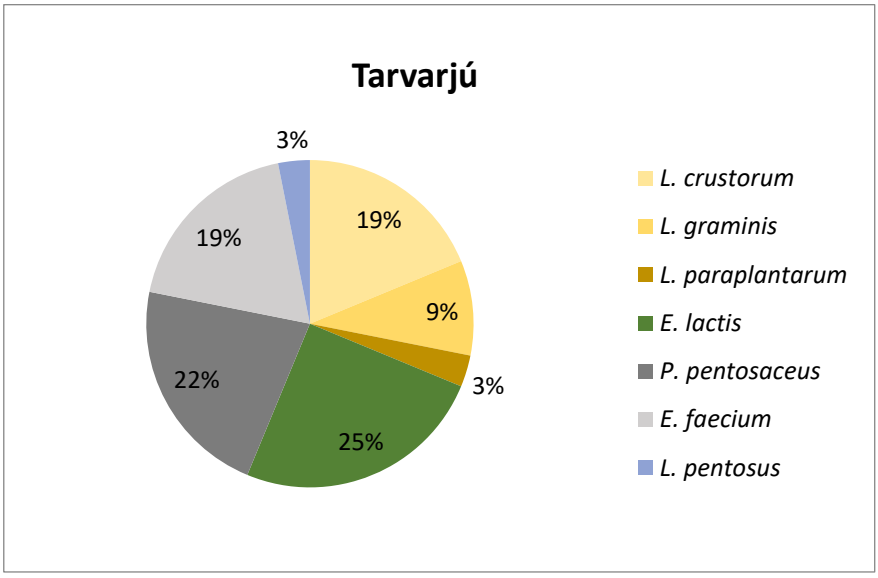


31. ábra Szürke óriáskenguru fécesz mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.13. Tarvarjú (Geronticus eremita)

Európában illetve Afrikában honos a tarvarjú, rovarokat, kétéltűeket, hüllőket és kisebb emlősöket is megeszik. Veszélyeztetett faj, Európában évszázadokkal ezelőtt kihalt, viszont dolgoznak a visszatelepítésén. Az MRS táplevesbe beoltott 100 telepből mindöszesen 32 db szaporodott fel. A törzsek 31%-a a *Lactobacillus* nemzetség fajaihoz 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 (33. ábra). Spergser *et al*. (2018) tenyésztéses módszerrel több kölönböző szelektív és nem szelektív táptalajon anaerob és aerob körülmények közt is vizsgálódtak, ily módon többek között tejsavbaktériumokat, az *Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Streptococcaceae* és *Lactobacillaceae* család törzseit is sikerült izolálniuk. Utóbbihoz 39 törzs tartozott, legtöbbjük a *L. salivarius* (18), illetve a *L. helveticus* (11) fajokhoz.

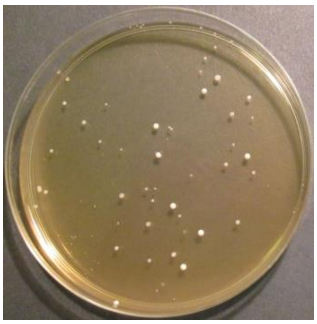
32. ábra Tarvarjú székletminta szélesztés (3,2 x 10^7 tke/g székletminta)



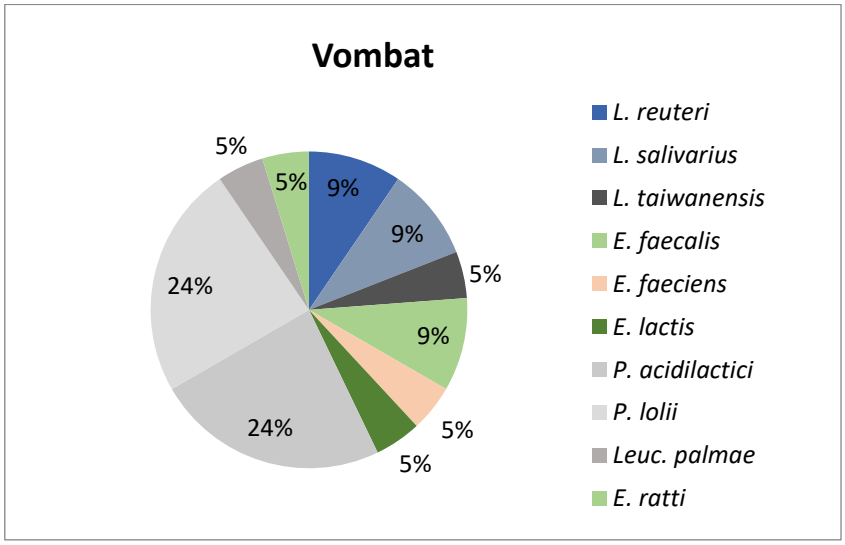
33. ábra Tarvarjú fécesz mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.14. Vombat (Vombatus ursinus tasmaniensis)

A vombat Délkelet-Ausztráliában honos állat, amely éjjel aktív. Gumókkal, gyökerekkel és fűfélékkel táplálkozik. 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% (35. ábra). Shiffman *et al*. (2017) egy koalától és egy vombattól származó székletminta mikrobiomösszetételét vizsgálták metagenom analízissel. Mindkét esetben a *Firmicutes* és a *Bacteroidetes* törzsek domináltak, de a koala esetében a *Firmicutes* 2:1 arányban érvényesült a *Bacteroidetes*-szel szemben, addig a vombatnál ez az arány 3,6:1 volt. A koalától még abban is eltért a vombat mikrobiomja, hogy a *Spirochaetes* és a *Tenericutes* törzsek jelentősebb mennyiségben fordultak elő.



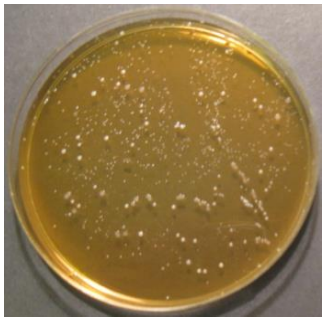
34. ábra Vombat székletminta szélesztés (1,6 x 10^6 tke/g székletminta)



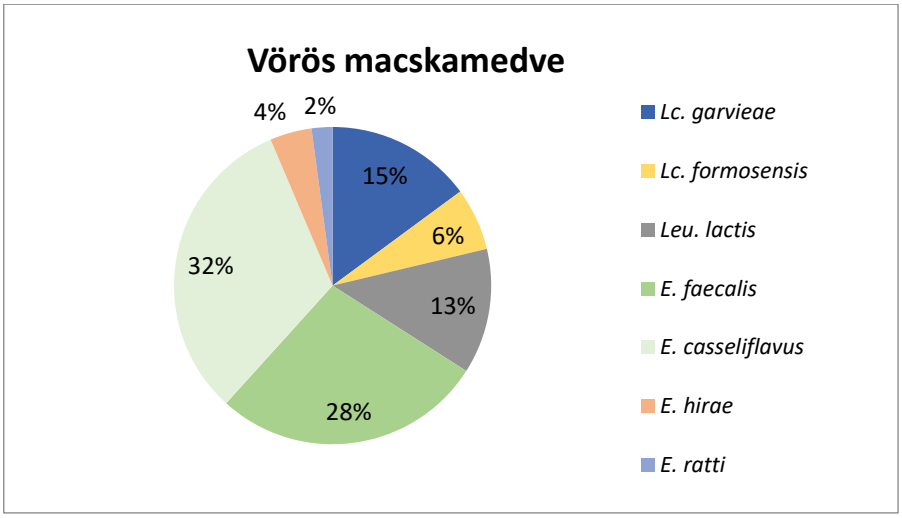
35. ábra Vombat fécesz mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

5.1.15. Vörös macskamedve (Ailurus fulgens)

A vörös macskamedve, vagy más néven kispanda, a Himalája vidékének magashegyi erdeiben él, 1800-4000 m tengerszintfeletti magasságban. Főként zsenge banbuszt, fűféléket és gyümölcsöket fogyaszt. 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 (37. ábra). Kong *et al.* (2014) vad és fogságban élő egyedek székletmintáit hasonlították össze metagenom analízissel. A fogságban élő egyedtől származó mintában elsődlegesen a *Firmicutes* törzs dominált, míg a vadon élő álattól származó mintában a *Firmicutes* törzs mellett a *Proteobacteria* és a *Bacteroidetes* törzs is jelentős mértékben jelen volt. Ebből arra következtettek, hogy a vadon élő állat mikrobiotája diverzebb.



36. ábra Vörös macskamedve székletminta szélesztés (1,6 x 10^8 tke/g székletminta)



37. ábra Vörös macskamedve fécesz mikrobiom összetétele (MRS táptalajon izolálva)

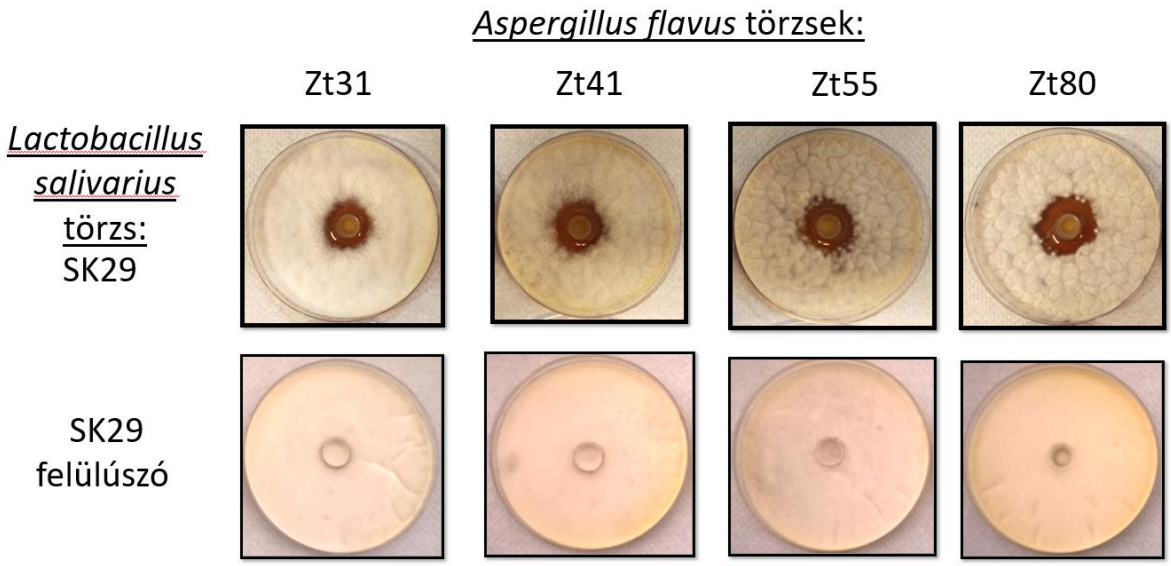
Új tudományos eredmény

Az indiai sül székletmintájából sikerült izolálni egy eddig ismeretlen baktérium törzset, amelyről kiderült, hogy nemcsak új faj, hanem új nemzetség is. A tudomány számára a törzset* Micrococcoides hystricis *néven írtuk le (Tóth 2017). Ez a mikroba nem tartozik a tejsavbaktériumok közé, mégis sikerült az MRS táptalajon kitenyészteni. Az MRS tápközegnél jelenleg nincs szelektívebb a tejsavbaktériumokra nézve, ennek ellenére néhány, a tejsavbaktériumokhoz hasonló tápigénnyel rendelkező mikroba képes lehet telepeket képezni egy szelektív táptalajon is. A Fővárosi Állat- és Növénykertben a sül kifutójánál a felfedezett új fajról ismertető tábla is olvasható.

5.2 *Aspergillus flavus* szaporodásának gátlása tejsavbaktériumokkal

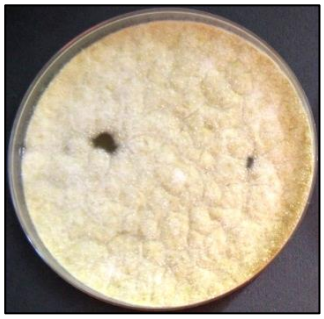
Szakirodalmi adatok alapján tudható, hogy számos *Lactobacillus* fajhoz tartozó törzs képes gátolni kis molekula tömegű metabolitok termelése révén penészgomba törzsek növekedését. Ezért 15 egzotikus állatból izolált tejsavbaktérium törzsgyűjteményünk egyes törzseinek *Aspergillus flavus* penészgomba aflatoxin termelő törzsekre gyakorolt esetleges gátló hatását vizsgáltam.

Több módszert is kipróbáltam, végül az MRS agarba kevert spóra szuszpenzió és a közepére aplikált lyukba pipettázott tejsavbaktérium szuszpenzió módszer vált be. Vizsgálatokat végeztem annak megállapítására is, hogy a tejsavbaktérium tenyészet milyen módon fejti ki gátló hatását a penészgombára. Mivel a szakirodalomban említik, hogy a felülúszó is képes volt egyes esetekben gátolni a penészgombák növekedését (Elsanhoty 2008), így előkísérlet gyanánt a jó gátlási képességekkel rendelkező *L. salivarius* faj tejsavbaktérium törzsének (SK29) felülúszójának gátló képességét teszteltem. A tejsavbaktérium tenyészetek sejtmentes felülúszójának nem volt gátló hatása az *Aspergillus flavus* törzsekre (38. ábra).



38. ábra Tejsavbaktérium tenyészet és annak sejtmentes felülúszójának hatása *Aspergillus flavus* növekedésére

Ez arra utalhat, hogy a gátló hatásért felelős kis molekulatömegű metabolitokat a tejsavbaktérium törzs csak a penészgomba jelenlétében termeli. A tesztek során egyik vizsgált penészgomba törzs esetében sem mutatott gátló hatást a felülúszó. A másik eshetőség, hogy a törzs homofermentatív anyagcseréje révén csak tejsavat állít elő, és ez a vegyület nincs gátló hatással a penészgombákra (39. ábra).



39. ábra 85%-os tejsav hatása a Zt31 törzsre

Ezzel egybevágnak Magnusson *et al*. (2003) eredményei, akik HPLC mérést végeztek az általuk vizsgált penészgomba törzseket gátolni képes tejsavbaktérium törzsek felülúszójával, illetve olyan törzsekével is, amelyek nem gátolták a növekedést jelentősen. Arra jutottak, hogy a

gátló törzsek felülúszójában ugyanannyi tejsav volt, mint az alig gátlóéban, vagy egyes esetekben még kevesebb is.

A heterofermentatív tejsavbaktériumok tejsav mellett például etanolt és ecetsavat is termelnek, ezért teszteltem ezeknek az anyagoknak is a penészgombák növekedésére gyakorolt gátló képességét, de sem a 48%-os sem a 24%-os oldat nem mutatott gátló hatást.

Ezekből az eredményekből arra következtettem, hogy nem a tejsavbaktériumok által termelt tejsav, ecetsav vagy az etanol okozzák a gátlást, hanem más vegyületek, esetleg a baktériumok által termelt bioaktív peptidek. Ezt erősítik meg a legújabb kutatások is a tejsavbaktériumok penészgomba gátlásával kapcsolatban (Luz *et al*. 2017, Muhialdin *et al*. 2020).

Munkám 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 vizsgált tejsavbaktérium törzsek felülúszója nem volt hatással a penészgomba törzsek növekedésére. Az eredmények alapján a Zt80 törzs a legellenállóbb a tejsavbaktérium törzsekkel szemben, míg a Zt31 a legkevésbé. A legnagyobb gátlási zóna 5 mm széles volt és a sisakos kazuárból izolált egyik *L. salivarius* törzs esetében mértem. (5-6. táblázat)

Összefoglalva az eredményeinket elmondhatjuk, 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.

Eredményeim alapján egy az osztályon folyó kutatási projekt során kukoricasiló beoltására a *Lactobacillus salivarius* faj SK6-os törzsét, a *Lactobacillus salivarius* faj TS62-es törzsét, illetve a *Pediococcus pentosaceus* faj TV46-os törzsét használtuk fel penészgombák szaporodásának visszaszorítására.

5-6. táblázat Tejsavbaktérium törzsek gátló hatása aflatoxin B1 termelő *Aspergillus flavus* törzsek (Zt31, Zt41, Zt55 és Zt80) növekedésére (a tejsavbaktérium körül kialakuló gátlási zóna sugara mm-ben)

		Zt31	Zt41	Zt55	Zt80
Lactobacillus salivarius	SK6	5	4	2	3
L. salivarius	SK45	2	2	2	2
Pediococcus pentosaceus	TV46	4	1	2	0,5
P. pentosaceus	TV49	3	2	2	0,5
P. pentosaceus	TV51	3	0,5	2	2
L. crustorum	TV19	2	1	2	2
L. salivarius	SK29	1	2	2	2
L. salivarius	SK41	2	2	1	2
L. paracasei	MA1	2	2	2	0,5
L. paracasei	MA2	2	2	2	0,5
L. salivarius	SK12	2	2	2	0,5
L. salivarius	SK47	2	1	1	1
P. lolii	MG44	3	0	2	0
L. plantarum	TS62	1	0,5	2	1
P. acidilactici	MG21	2	0	2	0,5
L. amylotrophicus	TS35r	2	0,5	1	0,5
L. pentosus	TV45	2	0,5	1	0,5
L. plantarum	AT51	2	1	2	1
L. plantarum	TS28	1	0	2	1
P. pentosaceus	TV70	2	0,5	1	0,5
L. salivarius	SK20	2	0,5	1	0
L. mucosae	OR17	1	1	1	0
L. pentosus	TV60	1	0	2	0
L. plantarum	TS23	1	0	1	1
L. plantarum	TV35	2	0,5	0,5	0
L. salivarius	SK46	1	0	2	0
P. lolii	MG77	2	0	1	0
P. pentosaceus	TV18	1	0,5	1	0,5
P. stilesii	TS1	2	0	1	0
L. curvatus	TS53	0,5	0	1	1
L. paracasei	MA65	2	0	0,5	0
L. pentosus	TV25	1	0,5	0,5	0,5
L. pentosus	TV27	1	0,5	1	0
P. lolii	MG7	1	0	1	0
P. pentosaceus	TV29	1	0	1	0
P. pentosaceus	TS63	0,5	0	1	0,5
L. paracasei	MA67	0,5	0	1	0
L. plantarum	TS39	0,5	0	1	0
L. salivarius	SK48	0,5	0	1	0
P. pentosaceus	TV41	1	0	0,5	0
L. paracasei	MA39	0	0	1	0

		Zt31	Zt41	Zt55	Zt80
L. paracasei	MA48	0	0	1	0
L. paracasei	MA68	0	0	1	0
L. paracasei	MA69	0	0	1	0
L. plantarum	TS47	0,5	0	0,5	0
L. plantarum	TS65	0,5	0	0,5	0
P. acidilactici	MG1	0,5	0	0,5	0
P. acidilactici	MG69	0,5	0	0,5	0
L. curvatus	TS4	0,5	0	0	0
L. kitasatonis	GO94	0,5	0	0	0
L. paracasei	MA49	0	0	0,5	0
L. plantarum	TS41	0,5	0	0	0
L. plantarum	TS43	0,5	0	0	0
P. acidilactici	MG30	0,5	0	0	0
P. pentosaceus	TS15	0	0	0,5	0
Enterococcus faecium	TV7	0	0	0	0
Ec. lactis	OR46	0	0	0	0
L. amylovorus	GO5	0	0	0	0
L. crustorum	TV17	0	0	0	0
L. equi	OR93	0	0	0	0
L. johnsoni	GO50	0	0	0	0
L. johnsoni	GO60	0	0	0	0
L. kitasatonis	GO21	0	0	0	0
L. kitasatonis	GO73	0	0	0	0
L. kitasatonis	GO96	0	0	0	0
L. kitasatonis	GO98	0	0	0	0
L. mucosae	OR2	0	0	0	0
L. mucosae	OR23	0	0	0	0
L. mucosae	OR63	0	0	0	0
L. mucosae	OR66	0	0	0	0
L. plantarum	AT6	0	0	0	0
L. plantarum	AT9	0	0	0	0
L. plantarum	TS44	0	0	0	0
L. plantarum	TS61	0	0	0	0
L. salivarius	VO20	0	0	0	0
Lactococcus lactis	MA40	0	0	0	0
Lc. lactis	MA63	0	0	0	0
Lc. lactis	MA64	0	0	0	0
P. pentosaceus	TV4	0	0	0	0
P. pentosaceus	TV11	0	0	0	0
P. pentosaceus	TV37	0	0	0	0
P. pentosaceus	TV40	0	0	0	0

Új tudományos eredmények

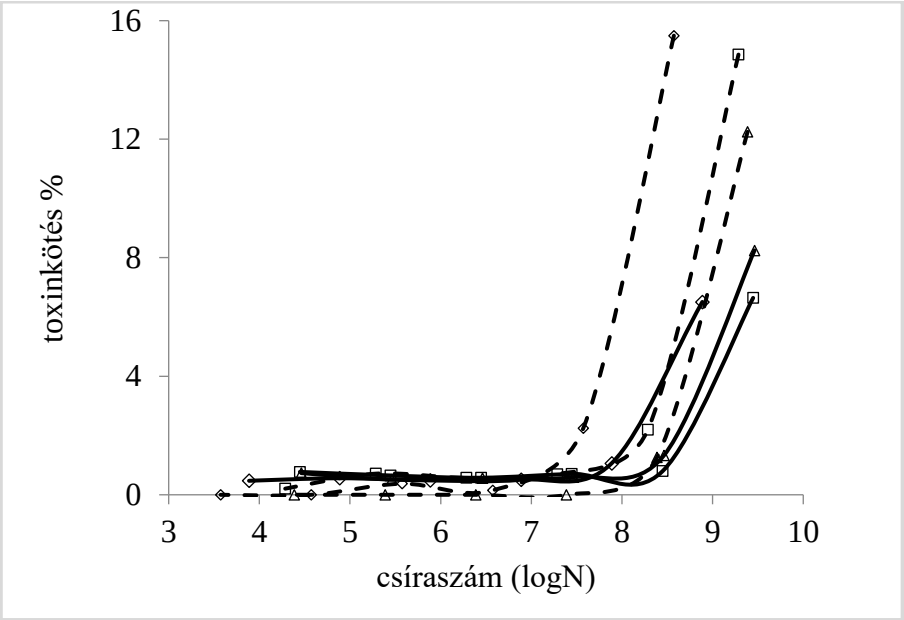
Tizenkilenc különböző tejsavbaktérium fajhoz tartozó 82 törzs vizsgálatával átfogó képet kaptam a tejsavbaktérium törzsek* Aspergillus flavus *AFB1 toxint termelő törzsekre gyakorolt gátlási képességéről. A* Lactobacillus salivarius, *a* L. crustorum, *a* L. paracasei, *a* L. plantarum *és a* Pediococcus pentosaceus *fajokhoz tartozó törzseknek volt a legjobb gátlási képességük. Az AFB1 termelő négy penészgomba törzs közül az Zt 31 volt a legérzékenyebb a tejsavbaktériumok által termelt gátló anyagokra, míg a Zt 80 bizonyult a legellenállóbbnak.

5.3 Mikotoxin kötési vizsgálatok

A nagyszámú tejsavbaktérium törzsem toxin megkötési képességének vizsgálatához szükséges volt elvégezni néhány megelőző kísérletet az optimális metódus megtalálásához. Ezért a sejt koncentráció, valamint a toxinnal való inkubációs idő hatását teszteltem a toxin megkötő kapacitásra nézve, illetve magának a toxinnak a vizsgált tejsavbaktérium törzs csíraszámára gyakorolt hatását vizsgáltam.

5.3.1 A csíraszám hatása a toxin megkötésre

Ahogy az a 40. ábra is mutatja a detektálható toxin megkötés csak a 10^7 sejt/ml sejt koncentrációtól volt kimutatható mind az aflatoxin B1, mind a szterigmatocisztin esetében.

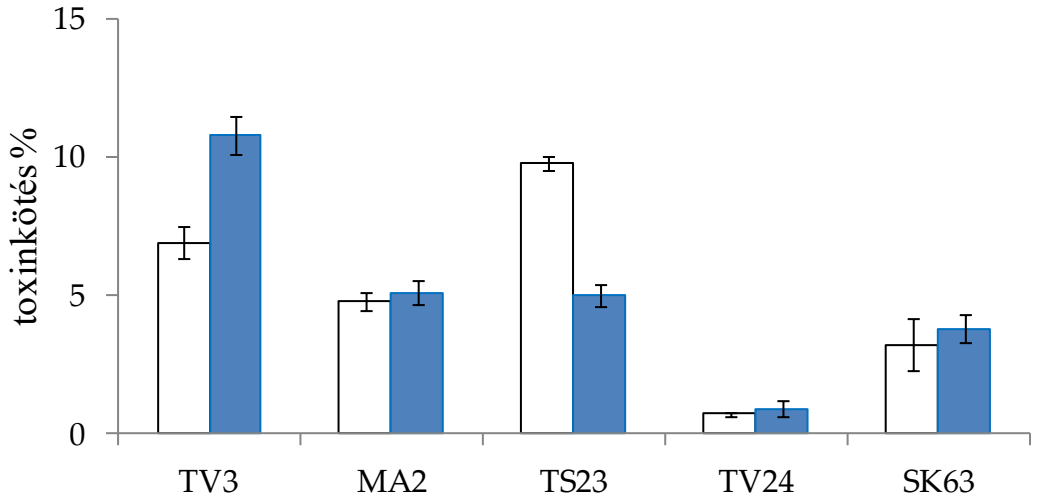


40. ábra A baktérium koncentráció hatása az aflatoxin B1 (folytonos vonal) és a szterigmatocisztin (szaggatott vonal) megkötésére *L. pentosus* TV3 (gyémánt), *L. paracasei* MA2 (négyszög) és *L. plantarum* TS23 (háromszög) esetében.

Ezek az eredmények megegyeznek Ma *et al*. (2017) által publikáltakkal, akik egyetlen törzset találtak, amely képes volt 10^6 sejt/ml koncentráció (4,27%) mellett a toxin megkötésre, még a többi törzs esetében a 10^9 sejt/ml koncentrációtól volt kimutatható a toxin kötés. Ennek megfelelően a mikotoxin kötési kísérletekben a tejsavbaktériumokat 10^8 sejt/ml koncentrációt használtuk.

5.3.2 Az inkubációs idő hatása a toxin megkötésre tejsavbaktériumok esetében

Az inkubációs idő hatása az aflatoxin B1 kötés kapacitására is vizsgálat alá került, 5 különböző *Lactobacillus* fajhoz tartozó törzs bevonásával. A törzseket AFB1 toxinnal 10 percig, illetve 48 óráig inkubáltam a korábban a 4.4.2 pontban leírtak szerint. Először az előző kísérletek során is használt 3 törzzsel (TV3, MA2, TS23) dolgoztam, de nem volt egyértelmű az eredmény, ezért bevontam a vizsgálatba a *L. graminis* TV24 és az *L. salivarius* SK63 törzseket is, hogy egyértelművé váljon melyik inkubációs idő a megfelelőbb (41. ábra).

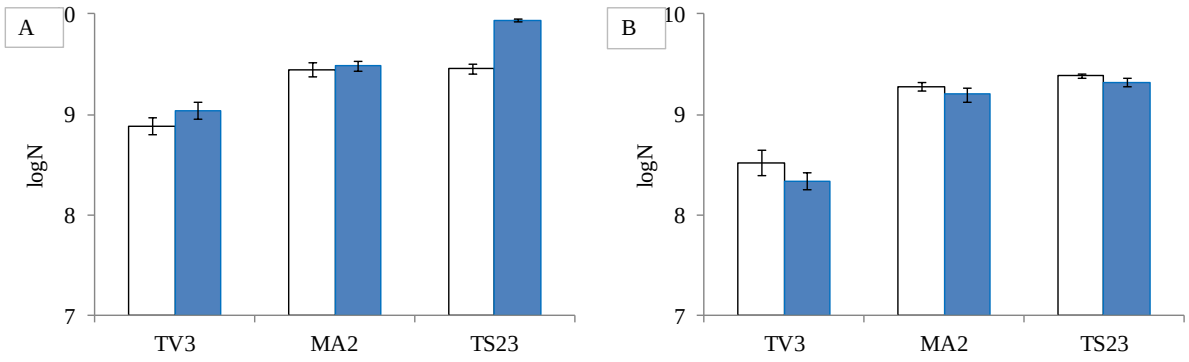


41. ábra Tíz perc (kék) és 48 óra (fehér) inkubációs idő hatása az AFB1 kötésre a *L. pentosus* TV3, *L. paracasei* MA2, *L. plantarum* TS23, *L. graminis* TV24 és *L. salivarius* SK 63 esetében

A TV3 törzs a rövidebb inkubációs idő mellett kötött több toxint, azonban a TS23 esetében a hosszabb inkubációs idő bizonyult hatásosabbnak. A másik 3 törzs (MA2, TV24, SK63) esetében az inkubációs idő hossza érdemben nem befolyásolta a toxin megkötés hatékonyságát. A szakirodalmi adatok is ellentmondásosak ebben a kérdésben. Bueno *et al*. (2007) nem találtak az inkubációs idő hossza és a toxin kötés hatékonysága között összefüggést, ahogy El-Nezami *et al*. (1997) és Peltonen *et al*. (2001) sem. Másrészről Kasmani *et al*. (2012) 0; 0,5; 4; 12; 24; és 72 órás inkubációs időt vizsgáltak, ahol a 0,5 óra inkubáció mellett volt a legkevesebb a megkötődés, míg a legmagasabb 12 óra inkubálás mellett volt, amikor is kétszer annyi toxint sikerült megkötnie a vizsgált törzsnek, mint 0,5 óra inkubáció mellett. Mivel a szakirodalmi adatok alapján inkább arra a következtetésre jutottam, hogy a rövidebb inkubációs idő megfelelőbb a toxin megkötés szempontból, és praktikussági szempontból is a rövidebb időtartam felelt meg inkább a méréseim elvégzéséhez, így ezt alkalmaztam a további mérések alkalmával.

5.3.3 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 baktérium csíraszámra kifejtett esetleges negatív hatását is vizsgáltam a toxinoknak. AFB1 és ST toxin jelenlétében három különböző fajhoz tartozó törzs (*L. pentosus* TV3, *L. paracasei* MA2, *L. plantarum* TS23) csíraszámát vizsgáltam a kontrollhoz képest. Megfigyelhető, hogy a vizsgált koncentrációban sem az AFB1 sem a ST nem okozott jelentős sejtszám csökkenést a kontrollhoz képest (42. ábra).

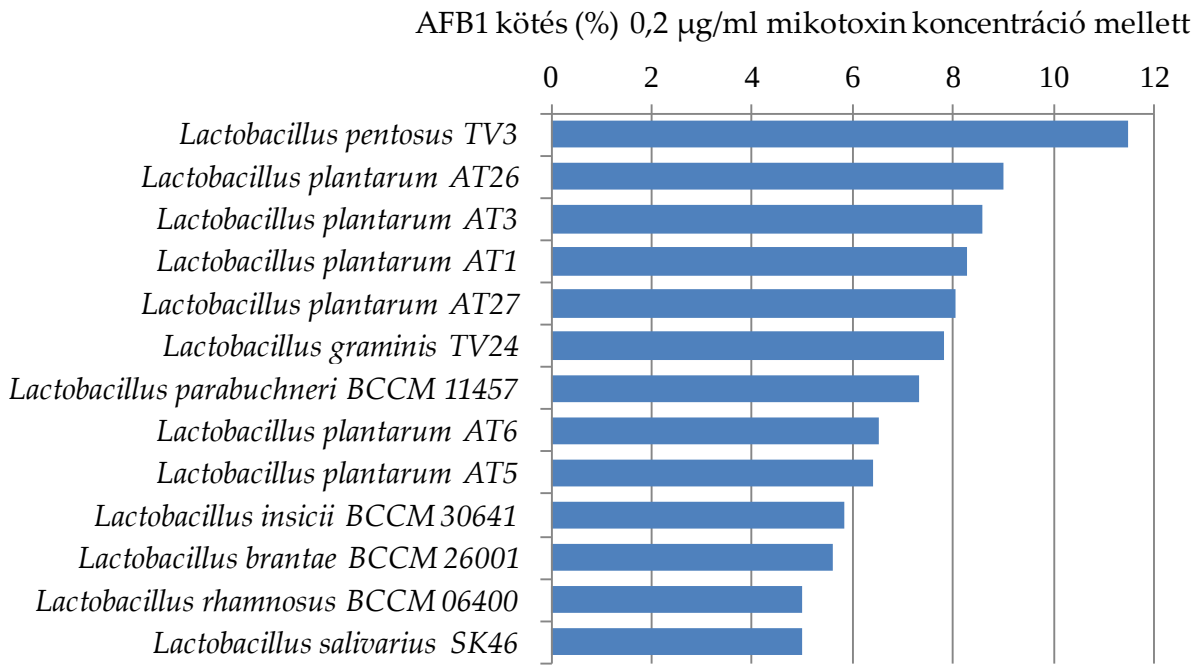


42. ábra 0,2 ppm koncentrációjú aflatoxin B1 (A) és szterigmatocisztin (B) hatása a sejtszámra *L. pentosus* TV3, *L. paracasei* MA2, *L. plantarum* TS23 (kontroll – fehér, toxin – kék) esetében

5.3.4 A Lactobacillus *nemzetség AFB1 kötési kapacitása*

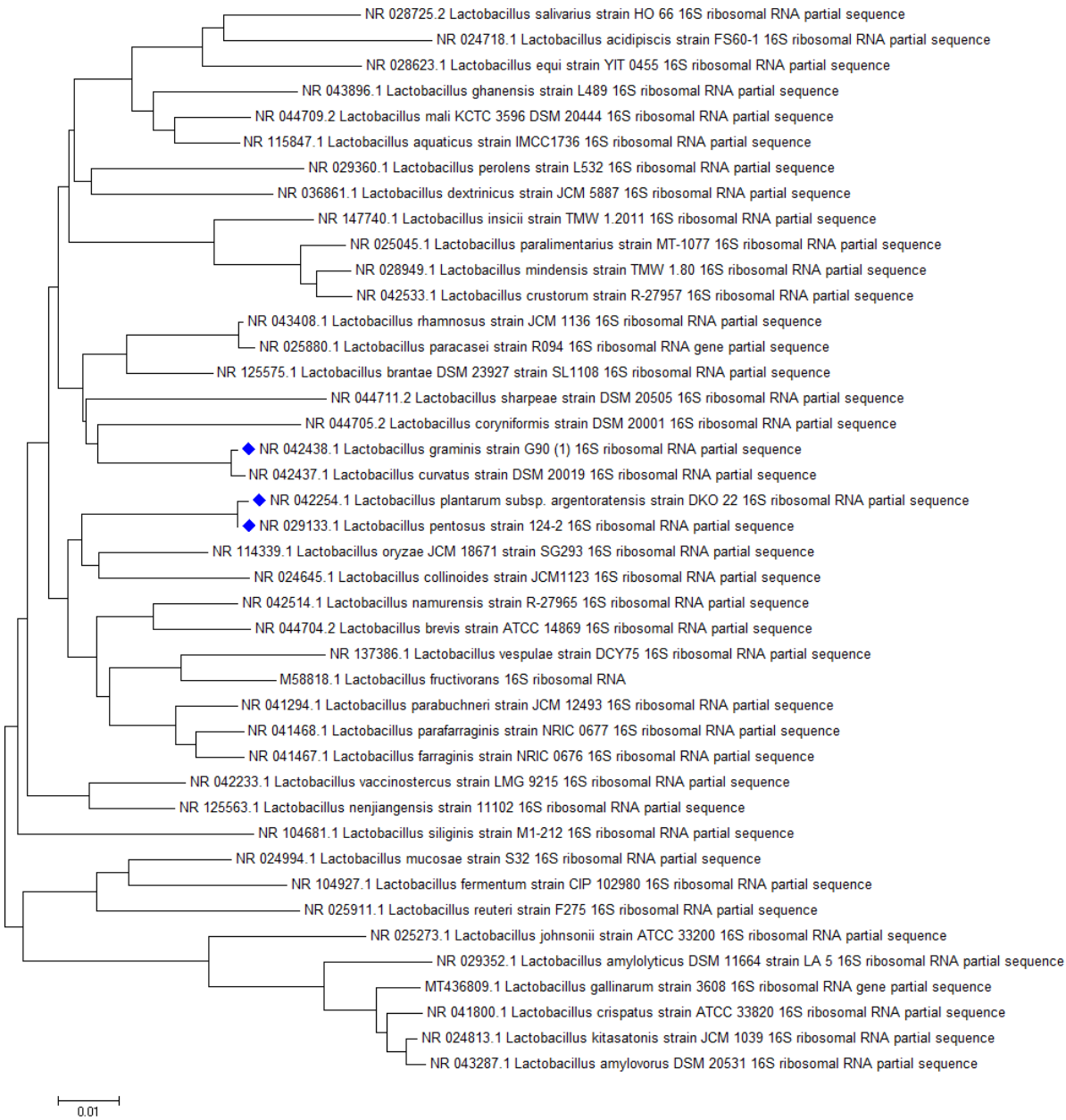
Aflatoxin B1 megkötés szempontjából 80 törzset teszteltem a saját törzsgyűjteményemből. Annak érdekében, hogy a *Lactobacillus* nemzetség fajainak AFB1 megkötő képességét minél átfogóbban tesztelhessem, törzsfát készítettem az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisban fellelhető 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 típustörzsét, amelyeket bevontam a toxin kötési vizsgálatokba. A saját törzsgyűjteményem 20 legjobb AFB1 kötési képességgel rendelkező törzsének ST kötési képességét is vizsgáltam, illetve a BCCM törzsgyűjteményből rendelt 25 törzs ST kötési képességét is teszteltem. A 4.4.4 pontban leírt módon teszteltem a kötési képességet. A vizsgált törzsek sejt koncentrációja a kötési vizsgálatoknál 10^8 sejt/ml volt a 4.4.1 pontban leírt előkísérlet eredményével összhangban, az inkubációs időt a toxinokkal pedig 10 percben határoztam meg a 4.4.2 előkísérlet eredménye alapján.

Ahogy a 43. ábrán látható, 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 rendelkeznek. Az összes vizsgált törzs közül 5% fölött csak 14 törzs volt képes a toxin kötésre.

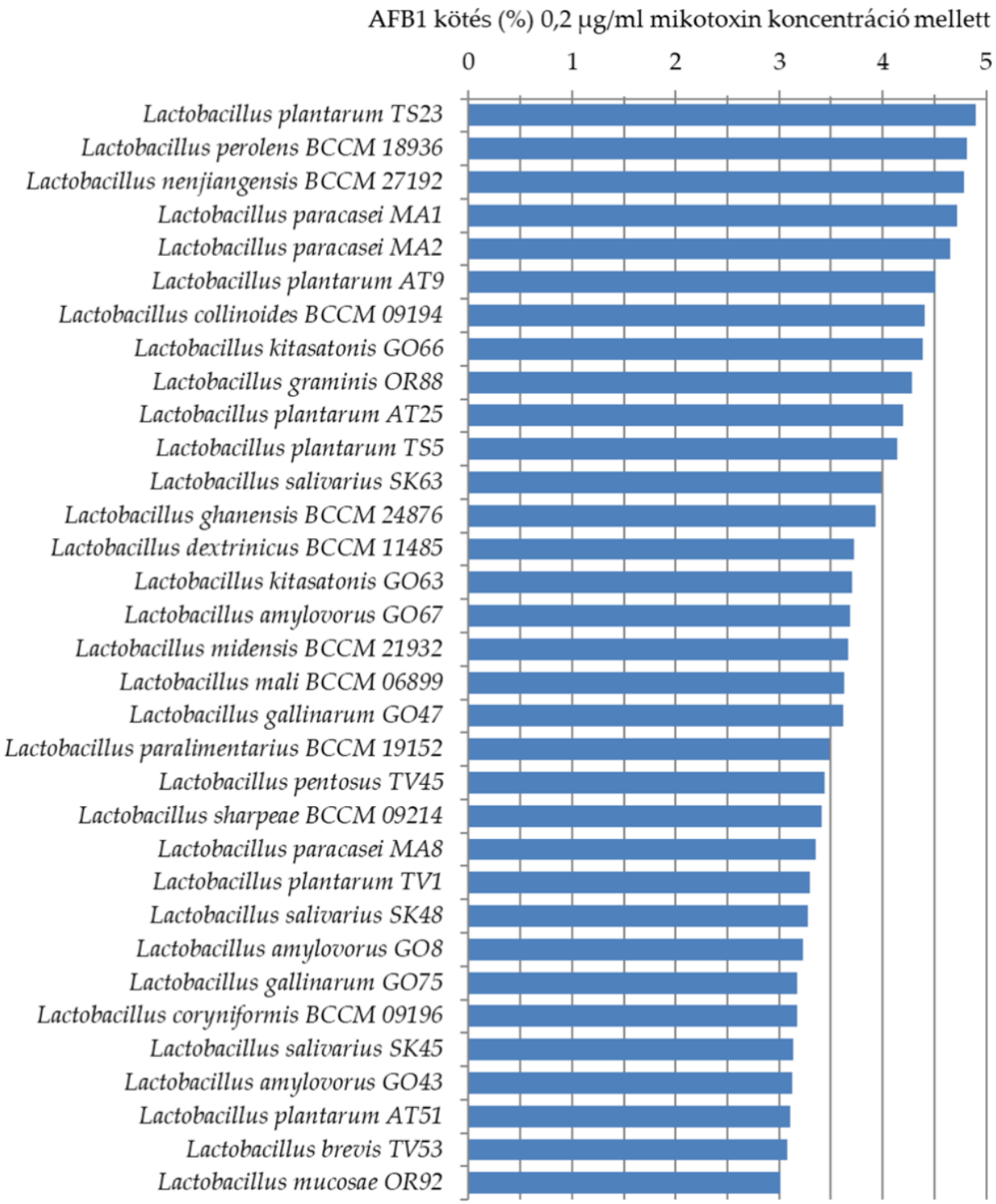


43. ábra 5% feletti toxinkötési kapacitással rendelkező *Lactobacillus* törzsek 0,2 ppm AFB1 koncentráció mellett MRS táplevesben

A vizsgált *Lactobacillus* fajok NCBI adatbázisban fellelhető típustörzseinek 16S rDNS szekvenciáján alapuló törzsfát készítettem, amelyen jól megfigyelhető (42.ábra), hogy a legjobb toxin kötő képességgel rendelkező *Lactobacillus* törzsek közeli rokonságban állnak. További 33 törzs esetében 3-5% közötti kötési kapacitást kaptam (45. ábra). A további vizsgált 58 törzs esetében kevesebb mint 3% volt a megkötés. Ezek az eredmények jelentősen alacsonyabbak, mint a szakirodalmi cikkekben felelhető 17 és 83% közötti értékek (Peltonen *et al.* 2001, Bueno *et al.* 2007, Wacoo *et al.* 2019).



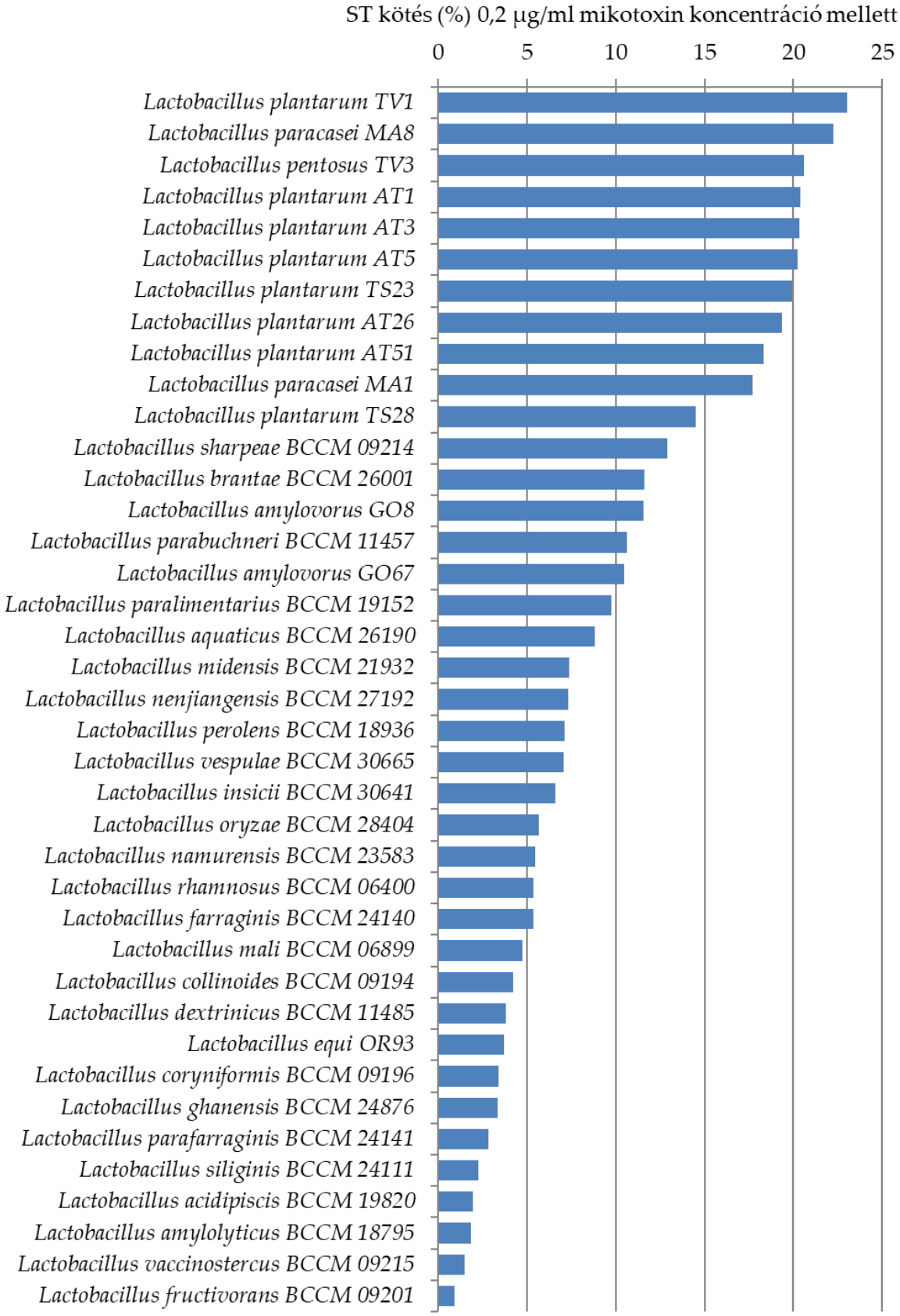
44. ábra A legjobb aflatoxin B1 kötő *Lactobacillus* fajok filogenetikai rokonsága



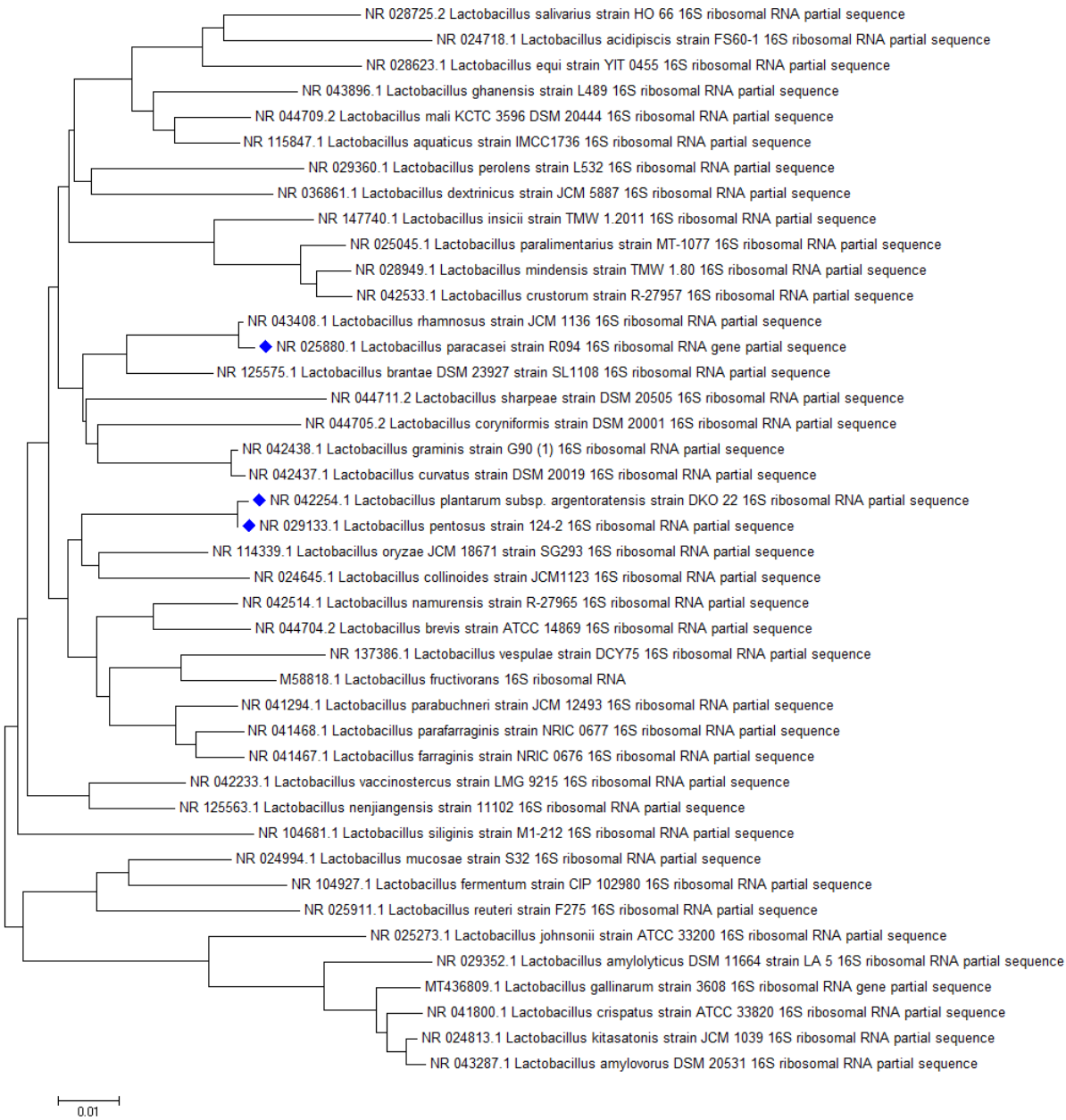
45. ábra MRS táplevesben 0,2 ppm toxin koncentráció mellett mért 3-5% közötti AFB1 kötési kapacitással rendelkező *Lactobacillus* törzsek

5.3.5 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 (46. ábra). Ahogy a AFB1 esetében, itt is látható, hogy a jó kötési képességekkel rendelkező törzsek közeli rokonágban álló fajokhoz tartoznak, mi több, a legjobb AFB1 és ST kötő fajok között átfedés van (44. és 47. ábra).



46. ábra Szterigmatocisztin kötő kapacitás (%) *Lactobacillus* törzsek esetében 0,2 ppm toxin koncentrációjú MRS táplevesben

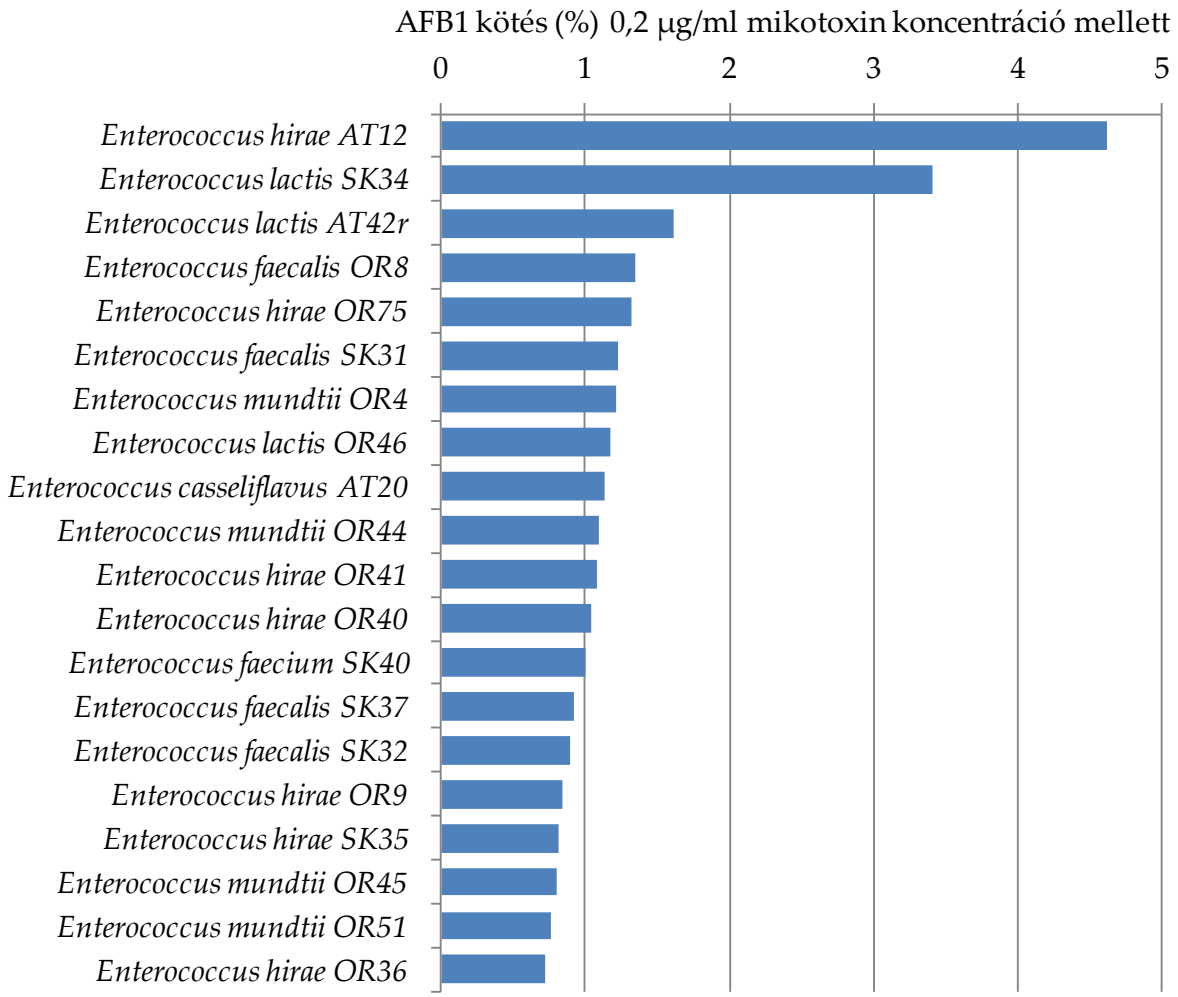


47. ábra A legjobb ST kötő *Lactobacillus* fajok filogenetikai rokonsága

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.

5.3.6 Enterococcus *törzsek AFB1 kötő kapacitása*

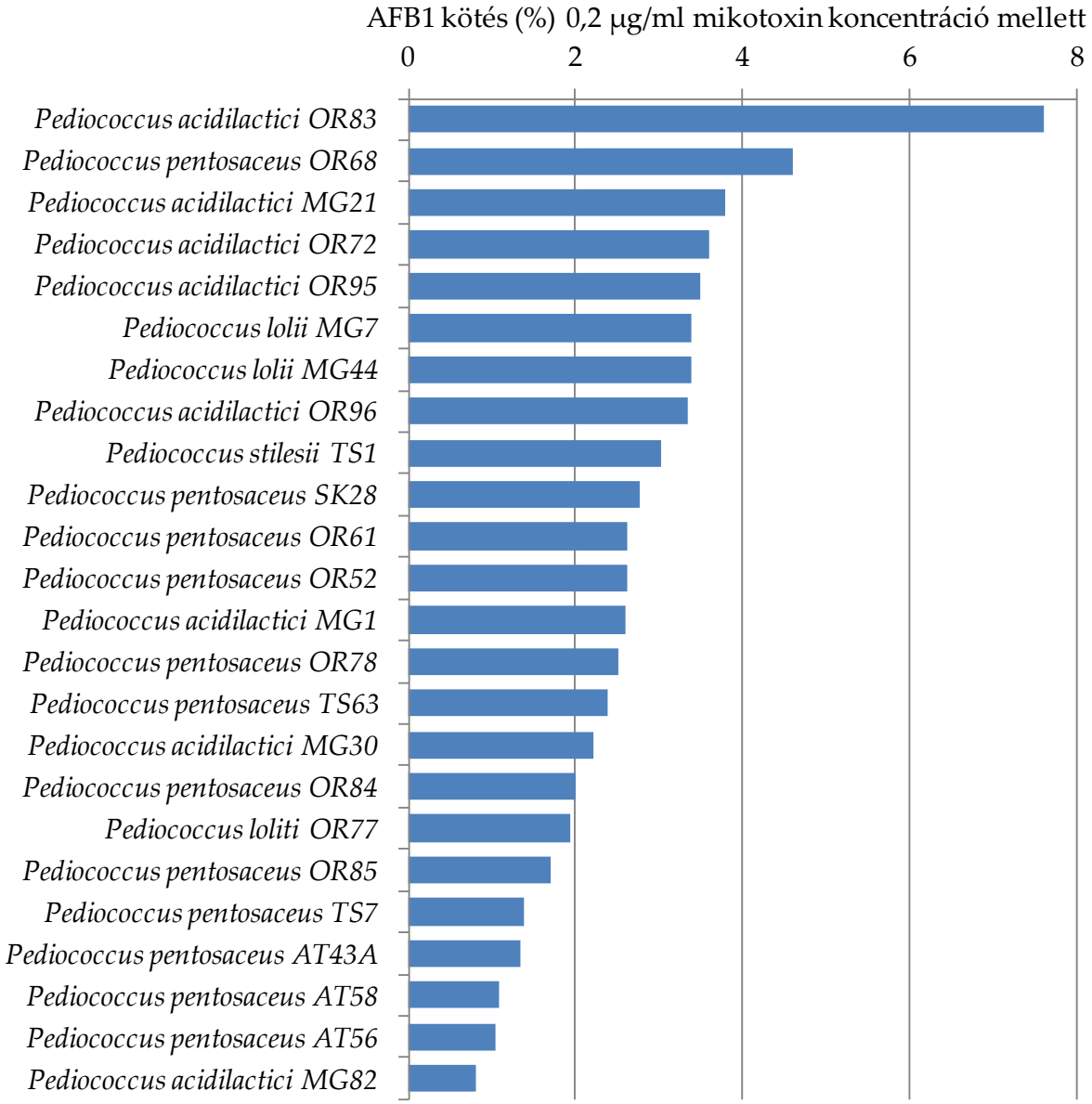
Húsz *Enterococcus* törzs AFB1 kötő képességét vizsgáltam a 4.4.4 pontban leírt módszerrel. *E. casseliflavus* fajhoz 1 törzs tartozott, az *E. faecalis* fajhoz 4, az *E. faecium* fajhoz 1, az *E. hirae* fajhoz 7, az *E. lactis* fajhoz 3 és az *E. mundtii* fajhoz 4. A vizsgált törzsek között a legmagasabb 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 (48. ábra). Juri *et al*. (2015) 50 ppm, illetve 100 ppm toxin koncentráció mellett vizsgálták a toxin megkötést. Az *E. faecium* GJ40 esetében 24-27%, illetve 17-24% értékeket kaptak. *E. faecium* MF4 esetében 36-42% és 27-32% közötti kötési értékeket mértek. Ezek a magas értékek eltérnek az általunk mértektől. Ennek oka lehet az eltérő törzsek, illetve a toxin kötési tesztelés eltérő metódusa.



48. ábra AFB1 kötő kapacitás (%) *Enterococcus* törzsek esetében 0,2 ppm toxin koncentrációjú MRS táplevesben

5.3.7 **Pediococcus** ***törzsek AFB1 kötési kapacitása***

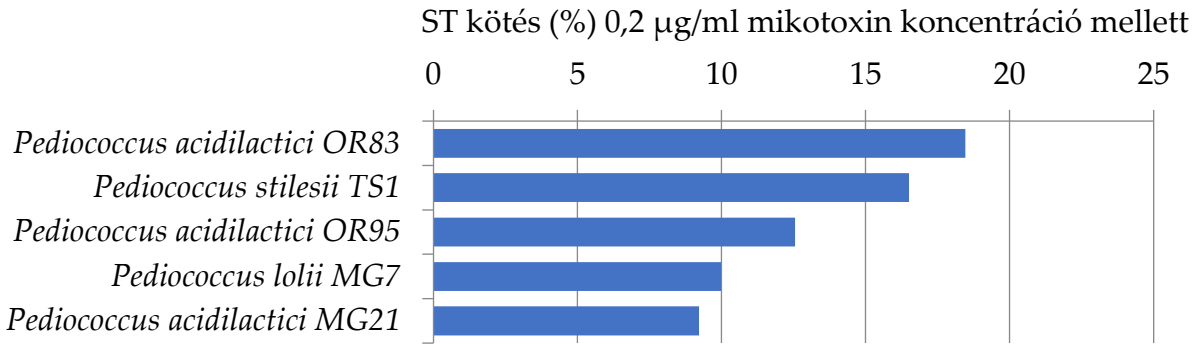
A *Pediococcus* nemzetség 24 törzsének AFB1 kötési képességét vizsgáltam. Ezek közül 8 törzs a *P. acidilactici*, 3 törzs a *P. lolli*, 12 törzs a *P. pentosaceus* és 1 törzs s *P. stilesii* fajokhoz tartozott (49. ábra). A vizsgált törzsek közül a *P. acidilactici* OR83 törzs bizonyult a legjobb AFB1 megkötőnek. A többi törzs 4% körüli vagy az alatti megkötési értéket mutatott. Zinedine *et al.* (2005) szintén alacsony értéket mértek a *P. acidilactici* P55 esetében, ahol is a megkötés 1,80% volt.



49. ábra AFB1 kötő kapacitás (%) *Pediococcus* törzsek esetében 0,2 ppm toxin koncentrációjú MRS táplevesben

5.3.8 Pediococcus *törzsek szterigmatocisztin kötési kapacitása*

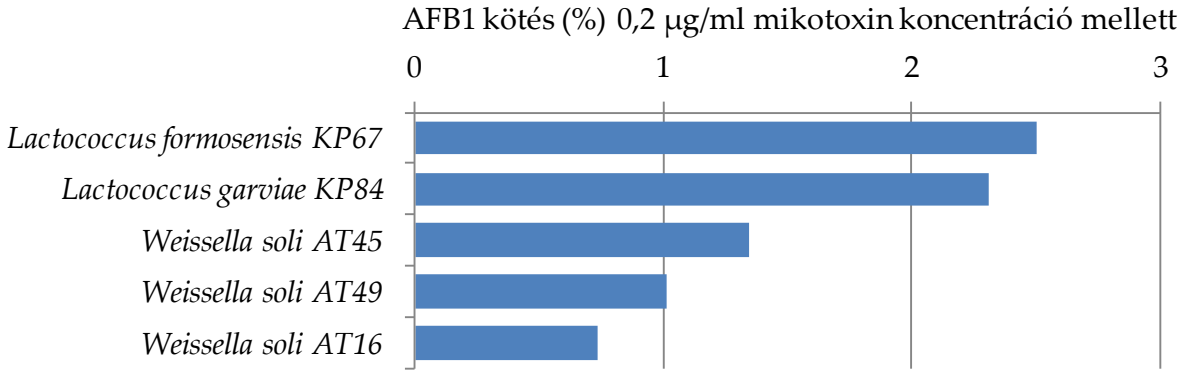
Öt *Pediococcus* nemzetséghez tartozó törzs ST megkötő képességét vizsgáltam. Az eredmények az 50. ábrán láthatóak. A megkötési értékek 9-18% között voltak. Ezek az eredmények megerősítik a *Lactobacillus* nemzetség törzseinél látottakat, miszerint a vizsgált tejsavbaktérium törzsek ST megkötő képessége kétszerese az AFB1-nek. Ezidáig a szakirodalomban nem volt publikált adat *Pediococcus* nemzetséghez tartozó törzsek ST kötő képességéről.



50. ábra ST kötő kapacitás (%) *Pediococcus* törzsek esetében 0,2 ppm toxin koncentrációjú MRS táplevesben

5.3.9 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 beállított paraméterek mellett az összes vizsgált törzs alacsony toxin kötési eredményt mutatott (51. ábra). Peltonen *et al*. (2001) három *Lc. lactis* törzset vizsgáltak és a kötési eredmények 5,6 és 41,1% között alakultak. Ez is igazolja saját megfigyelésemet, hogy egy fajon belül a törzsek között rendkívül nagy eltérések lehetnek. A *Weissella* nemzetség törzseinek AFB1 kötő képességéről csak kevés információ lelhető fel a szakirodalomban. A *Weissella cibaria* NN20 törzs esetében Nduti *et al.* (2018) 43,7% megkötési értéket mértek 10 ppm AFB1 koncentráció mellett fermentált tejben.



51. ábra AFB1 kötő kapacitás (%) *Lactococcus* és *Wessella* törzsek esetében 0,2 ppm toxin koncentrációjú MRS táplevesben

5.3.10 Tejsavbaktérium törzsek AFB1 kötő kapacitása nemzetségek függvényében

A vizsgált törzsek a *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* és *Weisella* nemzetségekhez tartoztak. A nemzetségek minél széleskörűbb összehasonlításához az egyes nemzetségekhez tartozó törzsek kötési adataiból átlag kötési értékeket, standard szórás értékeket, minimum és maximum kötési értékeket számoltam ki (7. táblázat). A legjobb aflatoxin B1 kötési képességgel a *Lactobacillus* nemzetség rendelkezett 3,16%-os értékkel. A szórás értéke is ennél a nemzetségnél volt a legmagasabb, és ez 20-szoros különbséget jelentett a minimum és maximum érték között. A második legjobb kötési értékekkel a *Pediococcus* nemzetség törzsei rendelkeztek, itt az átlag kötési érték 2,72% volt, a harmadik legjobb pedig a *Lactococcus* nemzetség volt. Az eredmények alapján a *Lactobacillus*, a *Pediococcus* vagy a *Lactococcus* nemzetség törzseit érdemes bio-detoxifikációs célokra használni, bár érdemes kiválasztani az átlagnál jóval magasabb kötési értékkel rendelkező törzseket.

7. táblázat Tejsavbaktérium nemzetségek AFB1 kötési kapacitásának %-os értékei 0,2 ppm toxin koncentráció mellett MRS táplevesben

Nemzetség	**Törzsek száma**	**Átlag kötési érték (%)**	**Korrigált tapasztalati szórás**	**Minimum kötési érték (%)**	**Maximális kötési érték (%)**
Lactobacillus	105	3,16	1,98	0,55	11,50
Pediococcus	24	2,72	1,42	0,80	7,60
Lactococcus	2	2,40	0,14	2,31	2,50
Enterococcus	20	1,35	0,96	0,72	4,62
Weissella	3	1,03	0,31	0,73	1,35

Új tudományos eredmények

A* Lactobacillus *nemzetség törzsfája alapján minden nagyobb klád AFB1 megkötő képességét teszteltem, átfogó képet kapva a nemzetség AFB1 megkötő képességéről.

A tejsavbaktériumok szterigmatocisztin megkötő képességéről a szakirodalomban nem lelhető fel adat, ez a munka foglalkozik vele először.

A tejsavbaktérium törzsek ST megkötése megközelítőleg kétszerese az AFB1-nek.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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 törzset a tudomány számára *Micrococcoides hystricis* néven írtuk le (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 típustörzseinek 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 *Pedicoccus* 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.

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Tizenöt különböző állatfaj székletmintáit vizsgáltam tejsavbaktérium összetételük szempontjából. Ezek az állatok főként emlősök és madarak, de egy hüllő és egy rovar is volt közöttük. Az állatok között nagy volt a diverzitás tejsavbaktérium összetétel szempontjából. A gorilla esetében például kizárólag a *Lactobacillus* nemzetség fajainak törzsei fordultak elő, míg a koala esetében nagyon diverz mikrobióta jelent meg, többek között patogén baktériumokat is tenyésztettem ki a mintából. A minták szélesztését követően minden állat esetében 100-100 telepet vettem le és inkubáltam tejsavbaktériumokra szelektív MRS táplevesben, de két állat (a gyűrűsfarkú maki, és a csupasz turkáló) mintáit leszámítva a levett telepeknek csak átlagosan a fele vagy még ennél is kevesebb volt újra felszaporítható hosszabb távon (összesen 687 törzs a több mint 1400-ból). Ennek oka lehet, hogy vannak olyan törzsek, amelyek ugyan a szélesztés során kinőnek tápagaron, de folyékony tápközegben már nem. Illetve az is előfordulhat, hogy a baktériumok elvesztik osztódó képességüket a számukra nem megfelelő környezeti paraméterek hatására. Tejsavbaktériumok esetében ez abból adódhat, hogy a flavoprotein oxidáz enzimük az oxidatív stressz elkerülése érdekében az oxigént vízzé és hidrogén-peroxiddá alakítja. A hidrogén-peroxid azonban felhalmozódhat és ez gátolhatja a sejtek osztódását (Condon 1987).

Az azonosítás költséghatékonyabbá tételéhez alkalmazott rep-PCR technika valóban csökkentette a szekvenálás költségeit, mivel körülbelül a minták negyedének/harmadának 16S rDNS PCR mintáját kellett csak megszekvenáltatni. A szekvenálást követően kiderült, hogy egy baktérium fajon belül vannak olyan törzsek, amelyek eltérő mintázattal rendelkeznek. Ez jelentheti azt, hogy egyes esetekben a rep-PCR technika fajon belüli különbségek észlelésére is képes. Ez azonban nem csökkentette jelentősen a módszer költséghatékonyságát, mivel csak néhány esetben fordult elő, tehát nem ez a jellemző a minták nagy részét tekintve.

A tejsavbaktériumok biológiai detoxifikáció céljából történő felhasználhatóságának vizsgálata kétféleképpen történt. Egyfelől a baktériumok által termelt másodlagos anyagcseretermékek penészgomba törzs szaporodását gátló hatásának vizsgálatával, másfelől a mikotoxinok sejtfelszínen való megkötődésének tesztelésével.

A penészgombák növekedését legjobban a *L. salivarius* faj SK6 törzse gátolta. Ahogy a baktérium törzsek esetében, úgy a penészgomba törzsek esetében is látható volt, hogy ugyan azon faj törzsei eltérő mértékben reagálnak ugyan azon hatásra. Az *A. flavus* Zt31 törzse a legkevésbé volt képes ellenállni a tejsavbaktérium törzsek gátló hatásának, míg a Zt80 törzs mutatta a legnagyobb ellenállást.

Mivel a szakirodalom említi, hogy a felülúszó is gátolhatja a penészgombák növekedését (Elsanhoty 2008, Taheur *et al*. 2019), ezért sejtmentes felülúszó hatását is teszteltem a legjobb gátlási képességgel rendelkező törzsek esetében, de az nem volt hatással a penészgomba törzsek növekedésére. Ebből arra lehet következtetni, hogy a penészgomba jelenléte indukálja a gátló metabolitok termelését a tejsavbaktériumok esetében.

Felmerült, hogy a baktériumok által termelt tejsav okozhatja-e a gátló hatást, de a 85%-os tejsavval folytatott vizsgálat nem mutatott számottevő gátlást, a 42,5%-os pedig egyáltalán nem mutatott gátló hatást. A tejsav mellett teszteltem az etanol és az ecetsav gátló képességét is, de az eredmények azt mutatták, hogy nincs gátló hatásuk. Ebből arra következtetek, hogy a vizsgált törzseim esetében a gátló hatást a mikrobák által termelt peptidek fejtik ki. Több, az utóbbi időben megjelent cikk eredményei is alátámasztják ezt a feltételezést (Luz *et al*. 2017, Muhialdin *et al*. 2020).

A jövőben szeretnénk siló oltóanyagként alkalmazni a legjobb gátlási képességekkel rendelkező törzseinket.

A mikotoxin megkötést 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 pufferban végezték, míg én MRS táplevest alkalmaztam, amely jobban reprezentálja a tejsavbaktériumok természetes közegét. Ebből kifolyólag nem vethetőek jól össze az eredményeim az irodalomban szereplőkkel. Chapot-Chartier *et al*. 2010-ben megjelent eredményei is alátámasztják a törzsek eltérő kötési értékeit. Leírták, hogy a megkötésben eddig a legnagyobb szereppel rendelkezőnek vélt peptidoglükánhoz egy sejtfal poliszacharid kapcsolódik kovalensen, egy réteget létrehozva körülötte. Ennek a poliszacharidnak a mennyisége a peptidoglükánon törzs szinten eltérő változatosságot mutathat. Ez megmagyarázza a fajon belül is nagymértékű eltéréseket a kötési értékekben. Szterigmatocisztinnel korábban még nem végeztek ilyen jellegű vizsgálatokat, pedig ez a toxin is káros hatású az emberi szervezetre nézve és a karcinogének 2B csoportjába sorolt vegyület. 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* nemzetségekhez tartozó törzseinek szterigmatocisztin kötő képességét is vizsgáljam. A legjobb toxinkötő képességekkel rendelkező törzseinkkel jelenleg is zajlanak állatetetési vizsgálatok. A

szarvasmarhák aflatoxinnal dúsított takarmányát toxinmegkötő tejsavbaktériumokkal egészítik ki, és a tej aflatoxin M1 tartalmát mérik 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 tejbe jutna.

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

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A tejsavbaktériumokról általánosan elmondható, hogy a GRAS mikrobák közé tartoznak. Ennek és különböző hasznos tulajdonságaiknak köszönhetően felhasználják őket az élelmiszeriparban, takarmány kiegészítőként és a humán gyógyászatban is. A magasabb rendű élőlények bélmikrobiótájának fontos tagjai. Kutatásom ezeknek a sokoldalú mikrobáknak a különböző biotechnológiai felhasználására terjedt ki. Ehhez a Fővárosi Állat- és Növénykert 15 egzotikus állatától származó székletmintából izoláltam tejsavbaktériumokat. Ezekből több mint 600 törzset számláló tejsavbaktérium törzsgyűjteményt hoztam létre, amely reprezentálja az emlősök, madarak, hüllők és kis mértékben a rovarok bélrendszerének tejsavbaktéririum mikrobiótáját is.

Az azonosítás során alkalmazott rep-PCR technikát segítségével költséghatékonyabbá tettem a baktériumok identifikálásának folyamatát. A rep-PCR eredményeképp kapott fajra jellemző mintázatok alapján csoportosítottam az izolált törzseket és így csoportonként csak 2-3 törzs szekvenálását kellett finanszírozni.

A tejsavbaktériumokról ismert, hogy egyes törzseik jól alkalmazhatóak a biológiai detoxifikáció során. Amellett, hogy vannak törzsek, amelyek anyagcseretermékeik révén képesek gátolni a penészgomba törzsek növekedését, az is ismert tény a szakirodalmi adatok alapján, hogy bizonyos törzsek sejtfelszínükön képesek megkötni a mikotoxin molekulákat. Ezért a rendelkezésemre álló, a tejsavbaktérium törzsgyűjtemény összetételét jól reprezentáló törzsekkel penészgomba-gátlási vizsgálatokat végeztem olyan gombatörzsekkel szemben, amelyek mikotoxint termelnek. A legjobb gátló képességgel a *L. salivarius* faj SK6 törzse rendelkezett, és az ehhez a fajhoz tartozó többi törzs esetében is jellemzően jó gátlási értékeket mértem. A törzsek élő sejtszuszpenziói mellett a néhány jól gátló törzs esetében a sejtmentes felülúszót hatását is vizsgáltam, mivel a szakirodalmi adatok említik annak gátló képességét (Elsanhoty 2008, Taheur *et al.* 2019). A tesztjeim alapján a vizsgált törzsek felülúszója nem volt hatással a penészgomba növekedésre. Vizsgáltam a tejsavbaktériumok által jellemzően termelt anyagcsere termékek (tejsav, ecetsav, etanol) hatását, de egyik sem mutatott gátló hatást. Ebből arra következtettem, hogy a gátlásért olyan komponensek felelhetnek, amelyek csak a penészgomba jelenlétében termelődnek. A legújabb kutatások szerint a tejsavbaktériumok olyan bioaktív peptideket termelnek, amelyek károsíthatják a hifafonalak csúcsát (Luz *et al.* 2017, Muhialdin *et al.* 2020).

Egyes tejsavbaktérium törzsekről az is ismert, hogy sejtfelszínükön mikotoxinokat képesek megkötni. Ezért a létrehozott törzsgyűjteményben előforduló összes fajból választottam törzseket,

amelyek aflatoxin B1 és szterigmatocisztin megkötő képességét is vizsgáltam. Az optimális kísérleti paraméterek kiválasztásához előkísérleteket végeztem. Teszteltem a toxin megkötés mértékét a csíraszám függvényében, illetve a toxin hatását a csíraszámra és az inkubációs idő hatását a toxin megkötésre. Az eredmények alapján elmondható, hogy a toxin megkötése 10^7 sejt/ml koncentrációtól volt detektálható, valamint, hogy a toxin jelenléte nem csökkentette a tejsavbaktérium törzsek szaporodási képességét, csíraszámát. Az inkubációs idő tekintetében a legtöbb törzs esetében nem volt jelentős különbség a 10 perces és a 48 órás inkubációs idő között, ahol volt, ott törzsfüggő volt, hogy melyik időtartammal járt nagyobb megkötés. Ebből arra következtettem, hogy a megkötés gyorsan megy végbe, és ezt a szakirodalmi adatok is alátámasztják (El-Nezami *et al*. 1997, Peltonen *et al*. 2001, Bueno 2007).

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 törzsgyűjteményéből megrendeltem további 25 faj típustörzsét, amelyeket bevontam a toxinkötési vizsgálatokba. A saját törzsgyűjteményem 20 legjobb AFB1 kötési képességgel rendelkező törzsének ST kötési képességét is vizsgáltam, illetve a BCCM törzsgyűjteményből rendelt 25 törzs ST kötési képességét is teszteltem. A tejsavbaktériumok szterigmatocisztin megkötő képességét korábban még nem vizsgálták. A vizsgált törzsek közül a legjobb AFB1 megkötési értékkel a *L. pentosus* TV3 törzse rendelkezett (11,5%), míg a legjobb ST megkötési értéket a *L. plantarum* TV1 (23%) törzsének esetében kaptam.

Az eredményekből kitűnik, hogy annak ellenére, hogy az AFB1 és a ST hasonló szerkezetű vegyület, mégis a szterigmatocisztinből körülbelül kétszer annyit kötöttek meg sejtfelszínükön a törzsek.

Ahhoz, hogy átfogó képet kaphassak a tejsavbaktériumok AFB1, illetve ST megkötő képességét illetően, a *Lactobacillus* nemzetség mellett a törzsgyűjtemény *Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus* és *Weissella* nemzetségeinek törzseit is vizsgáltam. Eredményeim alapján ezek a *Lactobacillus* nemzetséghez képest gyengébb megkötő képességgel rendelkeztek, esetleg a *Pediococcus,* illetve *Lactococcus* nemzetség törzsei között találhatunk olyan baktériumokat, amelyek javasolhatók lennének ilyen célra.

9. SUMMARY

Lactic acid bacteria are generally considered to be GRAS microbes. As a result, they are also used in the food industry, as a feed supplement, and in the human medication. They are important part of the intestinal microbiota of higher organisms. My research explored the various biotechnological uses of these versatile microbes. For this, I isolated lactic acid bacteria from fecal samples of 15 exotic animals of the Budapest Animal and Botanical Garden. From the isolates I have created a collection of lactic acid bacteria strains with more than 600 strains, which represents the lactic acid bacteria of the intestinal microbiota of mammals, birds, reptiles, and to a lesser extent, insects.

During the identification, I used the rep-PCR technique, which made the process more cost-effective. I grouped the isolated strains using the patterns obtained as a result of rep-PCR, and thus, sequencing of only 2-3 strains per group had to be financed.

Some strains of lactic acid bacteria are known to be useful in biological detoxification. In addition to the fact that there are strains that are able to inhibit the growth of mould strains through their metabolic products, it is also known from the literature that certain strains are able to bind mycotoxin molecules on their cell surface. Therefore, I performed inhibition studies against moulds with known mycotoxin producing abilities with lactic acid bacterium strains that well represented the composition of the lactic acid bacteria strain collection available to me. The SK6 strain of *L. salivarius* had the best inhibitory ability, and I also measured good inhibition values for the other strains belonging to this species. In addition to the suspension of the living strains, I also examined the effect of the cell-free supernatant of lactic acid bacterium strains of good inhibitory properties, as the literature data are unclear regarding the efficacy of the cell free supernatant. Based on my tests, the supernatant of the tested strains had no effect on mould growth. I investigated the effect of metabolic products (lactic acid, acetic acid, ethanol) typically produced by lactic acid bacteria, but none showed inhibitory effects. From this, I concluded that components that are only produced in the presence of mould may be responsible for inhibition. Recent research data suggest that lactic acid bacteria produce bioactive peptides that damege the tip of the mycelia.

Some strains of lactic acid bacteria are also known to be able to bind mycotoxins on their cell surface. Therefore, I selected strains from all species present in the established strain collection, and I examined their ability to bind aflatoxin B1 and sterigmatocystin. Preliminary experiments were performed to select the optimal parameters for the experiments. I tested the

relations of toxin binding ability and germ count, the effect of toxin on lactic acid bacteria growth and cell count, and the effect of incubation time on toxin binding.

Based on the results, it can be said that toxin binding was detectable from a concentration of 10^7 cells/ml and that the presence of the toxin did not reduce the germ count of the lactic acid bacterium strains. In terms of incubation time, for most strains, there was no significant differences between the 10-min and 48-h incubation. Where there was, the incubation time associated with greater decline was strain-dependent. From this, I concluded that the constraint occurs rapidly, and this is supported by the literature data (El-Nezami *et al*. 1997, Peltonen *et al*. 2001, Bueno *et al*. 2007).

In order to test the ability of the species of the genus *Lactobacillus* to bind AFB1 as comprehensively as possible, I constructed a tree based on the 16S rDNA sequences of all *Lactobacillus* species found in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database. Not all larger clades were represented in my own strain collection, so I ordered 25 additional type strains from BCCM strain collections, which I included in the toxin binding assays. I also examined the ST binding ability of the 20 strains with the best AFB1 binding ability in my own strain collection, and the ST binding ability of the 25 strains ordered from the BCCM strain collection were also tested. According to my knowledge, the sterigmatocystin binding ability of lactic acid bacterium strains has not yet been investigated.

Among the tested strains, the best AFB1 binding value was obtained from the *L. pentosus* TV3 strain (11.5%), while the best ST binding value was obtained from the *L. plantarum* TV1 strain (23%). The results show that despite the fact that AFB1 and ST are compounds with similar structures, the strains bound about twice as much sterigmatocystin.

In addition to the genus *Lactobacillus*, I also studied the strains of the genera *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, and *Weissella* in my strain collection regarding their mycotoxin binding abilities. However, they had weaker binding capacities compared to the genus *Lactobacillus*, perhaps strains of the genera *Pediococcus* or *Lactococcus* may have strains that could be suggested for this purpose.

Irodalomjegyzék

ALASSANE-KPEMBI, I., SCHATZMAYR, G., TARANU, I., MARIN, D., PUEL, O., & OSWALD, I.P. (2016): Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *0*, 00-00.

ALBERTS, J.F., ENGELBRECHT, Y., STEYN, P.S., HOLZAPFEL, W.H. & VAN ZYL, W.H. (2006): Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1–2), 121-126.

ALTINTAS, V., ANDREWS, M. & LARSEN, V. (2020): First reported human bloodstream infection with *Vagococcus lutrae*. *New Microbes and New Infections*, 34.

AMAIKE, S. & KELLER, N.P. (2011): *Aspergillus flavus. Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 107-133.

AMARETTI, A., BOTTARI, B., MORREALE, F., SARDARO, M.L.S., ANGELINO, D., RAIMONDI, S., ROSSI, M. & PELLEGRINI, N. (2020): Potential prebiotic effect of a long-chain dextran produced by *Weissella cibaria*: an in vitro evaluation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 71(5), 563-571.

AN, C., TAKAHASHI, C., KIMURA, B. & KUDA, T. (2010): Comparison of PCR-DGGE and PCRSSCP analysis for bacterial flora of Japanese traditional fermented fish products, aji-narezushi and iwashi-nukazuke. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1796–1801.

ANISIMOVA, E.A. & YARULLINA, D.R. (2019): Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol*., 76(12), 1407-1416.

BARTOWSKY, E.J. (2014): Malolactic Fermentation *Encyclopedia of Food Microbiology* (Második kiadás) Szerkesztők: Batt C.A. és Tortorello M.L.

BENNETT, D.C., TUN, H.M., KIM, J.E., LEUNG, F.C. & CHENG, K.M. (2013): Characterization of cecal microbiota of the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Veterinary Microbiology*, 166, 304–310.

BERRY, C.L. (1988): The pathology of mycotoxins. *J. Pathol*. 154, 301-311.

BIAN, G., MA, L., SU, Y. & ZHU, W. (2013): The microbial community in the feces of the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) as determined by Barcoded Pyrosequencing Analysis. *PLoS ONE*, 8(7), e70103.

BLOUT, W.P. (1961): Turkey “X” disease. *Turkeys*, 9(52), 55-58, 61, 77.

BOKHARI, F.M. & ALY, M.M. (2009): Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia. *Advances in Biological Research*, 3(3-4), 71-78.

BRASHEARS, M.M. & JARONI, D.J. (2003): Trimble Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Food Prot*., 66(3), 355-363.

BROADBENT, J.R., HOUCK, K., JOHNSON, M.E. & OBERG, C.J. (2003): Influence of adjunct use and cheese microenvironment on nostarter bacteria in reduced-fat Cheddar-type cheese. *Jornal of Dairy Science*, 86(9), 2773-2782.

BRODHAGEN, M. & KELLER, N.P. (2006): Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Mol Plant Pathol*., 7(4), 285-301.

BUENO, D.J., CASALE, C.H., PIZZOLITTO, R.P., SALVANO, M.A. & OLIVER, G. (2007): Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *J Food Prot*., 70(9), 2148-2154.

BULLERMAN, L.B. & BIANCHINI, A. (2007): Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol*., 119, 140–146.

BUYONG, N., KOK, J. & LUCHANSKY, J.B. (1998): Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4842-4845.

BYAPPANAHALLI, M.N., NEVERS, M.B., KORAJKIC, A., STALEY, Z.R. & HARWOOD, V.J. (2012): Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685-706.

CAI, Y., KUMAI, S., OGAWA, M., BENNO, Y. & NAKASE, T. (1999): Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Appl Environ Microbiol*., 65(7), 2901-2906.

CAPOZZI, V., RUSSO, P., DUEÑAS, M.T., LÓPEZ, P. & SPANO, G. (2012): Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), 1383-1394.

CASTELLS, M., RAMOS, A.J., SANCHIS, V. & MARÍN, S. (2007): Distribution of total aflatoxins in milled fractions of hulled rice. *J. Agric. Food Chem*., 55(7), 2760-2764.

CHELI, F., PINOTTI, L., ROSSI, L. & DELL'ORTO, V. (2013): Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: a review. *LWT-Food Sci. Technol*., 54, 307–314.

CHEN, Y.-S., YANAGIDA, F. & HSU, J.-S. (2006): Isolation and characterization of lactic acid bacteria from suan-tsai (fermented mustard), a traditional fermented food in Taiwan. *J Appl Microbiol.*, 101, 125–130.

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

CIEGLER, A., LILLEHOJ, E.B., PETERSON, R.E. & HALL, H.H. (1966): Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl. Microbiol*., 14(6), 934-939.

COLE, R.J. & COX, R.H. (1981): *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press: London, UK, pp. 67-93.

Commission Regulation (EU) No 574/2011. Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine, Ambrosia spp. and carry-over of certain coccidiostats and histomonostats and consolidating Annexes I and II 2011, L 159/7 (Letöltve: 2020. 07.30.)

Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 december 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. (Letöltve: 2021. 02. 02.)

CONDON, S. (1987): Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 269–280.

CORRY, J.E.L., CURTIS, G.D.W. & BAIRD, R.M. (2003): de man, rogosa and sharpe (MRS) agar. *Progress in Industrial Microbiology*, 37, 511-513.

CSERHÁTI, M., KRISZT, B., KRIFATON, C., SZOBOSZLAY, S., HAHN, J., … & KUKOLYA, J. (2013): Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains. *Int. J. Food Microbiol*., 166, 176–185.

DAS, A., BHATTACHARYA, S., PALANISWAMY, M. & ANGAYARKANNI, J. (2014): Biodegradation of aflatoxin B1 in contaminated rice straw by *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 and *Pleurotus ostreatus* GHBBF10 in the presence of metal salts and surfactants. *World J. Microbiol. Biotechnol*., 30, 2315–2324.

DEBEBE, T., HOLTZE, S., MORHART, M., HILDEBRANDT, T. B., RODEWALD, S., HUSE, K., PLATZER, M., WYOHANNES, D., YIRGA, S., LEMMA, A., THIEME, R., KÖNIG,

B. & BIRKENMEIER, G. (2016): Analysis of cultivable microbiota and diet intake pattern of the long-lived naked mole-rat. *Gut pathogens*, 8, 25.

DE QUIRÓS, B., MUÑOZ, J.C.L., CERCENADO, P. & BOUZA, E. (1991): *Leuconostoc* species as a cause of bacteremia: Two case reports and a literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10, 505–509.

DEVEGOWDA, G., ARVIND, B.I.R. & MORTON, M.G. (1996): Saccharomyces cerevisiae *and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers*. In: Proceedings of Australian Poultry Science Symposium. Poultry Research Foundation, University of Sydney, Sydney. pp. 103–106.

DÍAZ, D. & SMITH, T. (2005): Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. *The Mycotoxin Blue Book*, 323-340.

ELLIOTT, C.T., CONNOLLY, L. & KOLAWOLE, O. (2020): Potential adverse effects on animal health and performance caused by the addition of mineral adsorbents to feeds to reduce mycotoxin exposure. *Mycotoxin Res*., 36, 115–126.

EL-NEZAMI, H., KANKAANPAA, P., SALMINEN, S. & AHOKAS, J. (1998): Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 321-326.

ELSANHOTY, R.M. (2008): Screening of some lactobacillus strains for their antifungal activities against aflatoxin-producing aspergilli in vitro and maize. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 6(3).

FANDOHAN, P., AHOUANSOU, R., HOUSSOU, P., HELL, K., MARASAS, W.F. & WINGFIELD, M.J. (2006): Impact of mechanical shelling and dehulling on *Fusarium* infection and fumonisin contamination in maize. *Food Addit Contam*., 23(4), 415-421.

FANDOHAN, P., ZOUMENOU, D., HOUNHOUIGAN, D.J., MARASAS, W.F., WINGFIELD, M.J. & HELL, K. (2005): Fate of aflatoxins and fumonisins during the processing of maize into food products in Benin. *Int. J. Food Microbiol*., 98(3), 249-259.

FILHO, R.A.C.P., DÍAZ, S.J.A., FERNANDO, F.S., CHANG, Y-F., FILHO, R.L.A. & BERCHIERI, A.JR. (2015): Immunomodulatory activity and control of *Salmonella* Enteritidis colonization in the intestinal tract of chickens by *Lactobacillus* based probiotic. *Vet Immunol. Immunopathol*., 167(1-2), 64-69.

FLÓREZ, A.B., LADERO, V., ALVAREZ-MARTÍN, P., AMMOR, M.S., ALVAREZ, M.A. & MAYO, B. (2007): Acquired macrolide resistance in the human intestinal strain *Lactobacillus rhamnosus* E41 associated with a transition mutation in 23S rRNA genes. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 30, 341–344.

FOGEL, A.T. (2015): The gut microbiome of wild lemurs: a comparison of sympatric *Lemur catta* and *Propithecus verreauxi*. *Folia Primatol*, 86, 85-95.

FOLIGNÉ, B., DEWULF, J., BRETON, J., CLAISSE, O., LONVAUD-FUNEL, A. & POT, B. (2010): Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: immunomodulation by *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol*., 140(2-3), 136-145.

FRANZ, C.M.A.P., HUCH, M., ABRIOUEL, H., HOLZAPFEL, W. & GALVEZ, A. (2011): Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol*., 151, 125–140.

FUJII, I. (1999): Polyketide biosynthesis in filamentous fungi. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Szerkesztők: Sir Derek Barton, Koji Nakanishi, Otto Meth-Cohn, 409-441.

FUSCO, V., QUERO, G.M., CHO, G-S., KABISCH, J., MESKE, D., NEVE, H., BOCKELMANN, W. & FRANZ C.M.A.P. (2015): The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front Microbiol*., 6, 155.

GALVANO, F., PIETRI, A., BERTUZZI, T., BOGNANNO, M., CHIES, L., DE ANGELIS, A. & GALVANO, M. (1997): Activated carbons. In vitro affinity for fumonsin B1 and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J. Food Prot*., 60, 985–991.

GALVANO, F., PIETRI, A., BERTUZZI, T., PIVA, A., CHIES, L. & GALVANO, M. (1998): Activated carbons. In vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J. Food Prot*., 61, 469–475.

GERBALDO, G.A., BARBERIS, C., PASCUAL, L., DALCERO, A. & BARBERIS, L. (2012): Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiol. Lett.*, 332, 27–33.

GEVERS, D., HUYS, G. & SWINGS, J. (2001): Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 31–36.

GOLDIN, B.R. & GORBACH, S.L. (1984): The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 39(5), 756–761.

GOMEZ, A., PETRZELKOVA, K., YEOMAN, C.J., VLCKOVA, K., MRÁZEK, J., KOPPOVA, I., CARBONERO, F., ULANOV, A., MODRY, D., TODD, A., TORRALBA, M., NELSON, K.E., GASKINS, H.R., WILSON, B., STUMPF, R.M., WHITE, B.A. & LEIGH, S.R. (2015): Gut microbiome composition and metabolomic profiles of wild western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) reflect host ecology. *Mol Ecol*., 24(10), 2551-2565.

GUEIMONDE, M., SÁNCHEZ, B., DE LOS REYES-GAVILÁN, C. & MARGOLLES, A. (2013): Antibiotic resistance in probiotic bacteria. Frontiers in Microbiology, 4, 202.

GUENGERICH, F.P., JOHNSON, W.W., SHIMADA, T., UENG Y.F., YAMAZAKI, H. & LANGOUËT, S. (1998): Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutat Res*. 18;402(1-2):121-8.

GULINO, L.M., OUWERKERK, D., KANG, A.Y.H., MAGUIRE, A.J., KIENZLE, M. & KLIEVE, A.V. (2013): Shedding light on the microbial community of the macropod foregut using 454-amplicon pyrosequencing. *PLoS ONE*, 8(4), e61463.

HAMMES, W.P., WEISS, N. & HOLZAPFEL, W.P. (1991): The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* (eds Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H.). Springer, New York, USA, pp. 1535–1594.

HAN, J., WANG, Y., SONG, D., LU, Z., DONG, Z., … & LI, A. (2018): Effects of *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immune function and volatile fatty acid level of caecal digesta in broilers. *Food Agric. Immunol*., 29, 797–807.

HAN, K-S., KIM, Y., KIM, S-H. & OH, S. (2007): Characterization and purification of acidocin 1B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GP1B. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(5), 774-83.

HOPWOOD, D.A. & SHERMAN, D.H. (1990): Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet*., 24, 37-66.

HUANG, H., HUANG, S., CHEN, KING, V.A-E., LIN, Y-P. & TSEN, J-H. (2007): Basic characteristics of *Sporolactobacillus inulinus* BCRC 14647 for potential probiotic properties. *Curr. Microbiol*., 54, 396–404.

HUMPHREY, J.D. (1987): The disease status of Australian salmonids: bacteria and bacterial diseases. *J. Fish Dis*., 10, 403–410.

HUWIG, A., FREIMUND, S., KAPPELI, O. & DUTLER, H. (2001): Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122, 179–188.

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.

JI, C., FAN, Y. & ZHAO, L. (2016): Review on biological degradation of mycotoxins. *Anim. Nutr*., 2(3), 127–133.

JURI, F.M.G., DALCERO, A.M. & MAGNOLI, C.E. (2015): In vitro aflatoxin B1 binding capacity by two *Enterococcus faecium* strains isolated from healthy dog faeces. *J. Appl. Microbiol., 118*(3), 574–582.

JUSTÉ, A., LIEVENS, B., REDIERS, H., WILLEMS, K., HOLZAPFEL, W.H. & WOOD, B. (2014): *Tetragenococcus*. *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy, pp.* 213-228.

KAMBOJ, K., VASQUEZ, A. & BALADA-LLASAT, J. (2015): Identification and significance of *Weissella* species infections. *Frontiers in Microbiology,* 6, 1204.

KAUSHIK, G. (2015): Effect of processing on mycotoxin content in grains. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 55(12), 1672-1683.

KHATIBI, P.A., BERGER, G., WILSON, J., BROOKS, W.S., MCMASTER, … & SCHMALE, D.G. (2014): A comparison of two milling strategies to reduce the mycotoxin deoxynivalenol in barley. *J. Agric. Food Chem.*, 62(18), 4204-4213.

KITAHARA, K. & SUZUKI, J. (1963): *Sporolactobacillus* nov. subgen. *J. Gen. Appl. Microbiol*., 9, 59-71.

KOLOSSOVA, A., STROKA, J., BREIDBACH, A., KROEGER, K., AMBROSIO, M., BOUTEN, K. & ULBERTH, F. (2009): *Evaluation of the effect of mycotoxin binders in animal feed on the analytical performance of standardised methods for determination of mycotoxins in feed.* EUR 23997 EN- 2009. JRC scientific and technical reports. European Commission, Joint Research Centre, Brussels.

KONG, F., ZHAO, J., HAN, S., ZENG, B., YANG, J., SI, X., *ET AL*. (2014): Characterization of the gut microbiota in the red panda (*Ailurus fulgens*). *PLoS ONE,* 9(2), e87885.

KUDA, T., IZAWA, Y., ISHII, S., TAKAHASHI, H., TORIDO, Y. & KIMURA, B. (2012): Suppressive effect of *Tetragenococcus halophilus*, isolated from fish-nukazuke. *Food Chemistry*, 130, 569–574.

LANE, D.J., PACE, B., OLSEN, G.J., STAHL, D.A., SOGIN, M.L. & PACE, N.R. (1985): Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.

LEE, N-K., HAN, K.J., SON, S-H. EOM, S.J., LEE, S-K. & PAIKAC, H-D. (2015): Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. LWT - *Food Science and Technology*, 64(2), 1036-1041.

LEISNER, J.J., LAURSEN, B.G., PRÉVOST, H., DRIDER, D. & DALGAARD, P. (2007): *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS microbiology reviews*, 31(5), 592–613.

LIAO, S.F. & NYACHOTI, M. (2017): Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*, 3(4), 331-343.

LIU, H., JI, H. F., ZHANG, D. Y., WANG, S. X., WANG, J., SHAN, D.C. & WANG, Y.M. (2015): Effects of *Lactobacillus brevis* preparation on growth performance, fecal microflora and serum profile in weaned pigs. *Livest. Sci*., 178, 251–254.

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.

MA, Z.X., AMARO, F.X., ROMERO, J.J., PEREIRA, O.G., JEONG, K.C. & ADESOGAN, A.T. (2017): The capacity of silage inoculant bacteria to bind aflatoxin B1 in vitro and in artificially contaminated corn silage. *J Dairy Sci.*, 100(9), 7198-7210.

MAGNUSSON, J., STRÖM, K., ROOS, S., SJÖGREN, J. & SCHNÜRER, J. (2003): Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.*, 219(1), 129-135.

MATUMBA, L., VAN POUCKE, C., NJUMBE, E.E, JACOBS, B. & DE SAEGER, S. (2015): Effectiveness of hand sorting, flotation/washing, dehulling and combinations thereof on the decontamination of mycotoxin-contaminated white maize. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*., 32(6), 960-969.

MAZUMDER, P.M., & SASMAL, D. (2001): Mycotoxins - limits and regulations. *Ancient science of life*, 20(3), 1–19.

MESSAOUDI, S., KERGOURLAY, G., DALGALARRONDO, M., CHOISET, Y., FERCHICHI, M., … & DOUSSET, X. (2012): Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol*., 32(1), 129-134.

MÉNDEZ-ALBORES A., ARÁMBULA-VILLA G., LOAREA-PIÑA M. G. F., CASTAÑO-TOSTADO E. & MORENO-MARTÍNEZ E. (2005): Safety and efficacy evaluation of aqueous citric acid to degrade B-aflatoxins in maize. *Food Chem. Toxicol*., 43, 233–238.

MITCHELL, C., FREDRICKS, D., AGNEW, K. & HITTI, J. (2015): Hydrogen peroxide-producing lactobacilli are associated with lower levels of vaginal interleukin-1β, independent of bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis*., 42(7), 358-363.

MOL, J.G.J., PIETRI, A., MACDONALD, S.J., ANAGNOSTOPOULOS, C. & SPANJER, M. (2015): *Survey on sterigmatocystin in food*. Research report (EFSA supporting publication 2015 EN-774).

MUHIALDIN, B.J., ALGBOORY, 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.

NAQID, I.A., OWEN, J.P., MADDISON, B.C., GARDNER, D.S., FOSTER, N., … & GOUGH, K.C. (2015): Prebiotic and probiotic agents enhance antibody-based immune responses to *Salmonella* Typhimurium infection in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol*., 201, 57–65.

NDUTI N.N., REID G., SUMARAH M., HEKMAT S., MWANIKI M. & NJERU P.N. (2018): *Weissella cibaria* nn20 isolated from fermented kimere shows ability to sequester AFB1 in vitro and ferment milk with good viscosity and phin comparison to yogurt. *Food Science and Nutrition Technology*, 3(1), 000137.

NIDERKORN, V., BOUDRA, H. & MORGAVI, D.P. (2006): Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 849-856.

OSAWA, R., RAINEY, F., FUJISAWA, T., LANG, E., BUSSE, H.J., WALSH, T.P. & STACKEBRANDT, E. (1995): *Lonepinella koalarum* gen. nov., sp. nov., a New Tannin-Protein Complex Degrading Bacterium. *System. Appl. Microbiol.*, 18, 368-373.

PELTONEN, K., EL-NEZAMI, H., HASKARD, C., AHOKAS, J. & SALMINEN, S. (2001): Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Dairy Sci*., 84, 2152–2156.

PRADO, M.R., BLANDÓN, L.M., VANDENBERGHE, L.P., RODRIGUES, C., CASTRO, G.R., THOMAZ-SOCCOL, V. & SOCCOL, C.R. (2015): Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1177.

PURCHASE, I.F.H. & VAN DER WATT, J.J. (1973): Carcinogenicity of sterigmatocystin to rat skin. *Toxicol. Appl. Pharm*., 26, 274-281.

RAMOS, A.J. & HERNÁNDEZ, E. (1996): In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. *Animal Feed Science and Technology*, *62*, 263-269.

RATERS, M. & MATISSEK, R. (2008): Thermal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Mycotox. Res*., 24, 130–134.

RIOS, G., PINSON-GADAIS, L., ABECASSIS, J., ZAKHIA-ROZIS, N. & LULLIEN-PELLERIN, V. (2009): Assessment of dehulling efficiency to reduce deoxynivalenol and *Fusarium* level in durum wheat grains. *J. Cereal Sci*., 49, 387–392.

ROCHA, T.S., BAPTISTA, A., DONATO, T.C., MILBRADT, E., SAKAI, A., … & COPPOLA, M.P. (2012): Evaluation of in vitro and in vivo adhesion and immunomodulatory effect of *Lactobacillus* species strains isolated from chickens. *Poult. Sci*., 91, 362–369.

SALAS, M.L., THIERRY, A., LEMAÎTRE, M., GARRIC, G., HAREL-OGER, M., … & COTON, E. (2018): Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications. *Front. Microbiol*., 9, 1787.

SANDRI, C., CORREA, F., SPIEZIO, C., TREVISI, P., LUISE, D., MODESTO, M., REMY, S., MUZUNGAILE, M., CHECCUCCI, A., ZABORRA, C.A. & MATTARELLI, P. (2020): Fecal microbiota characterization of Seychelles Giant Tortoises (*Aldabrachelys gigantea*) living in both wild and controlled environments. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2474.

SCHÖBITZ, R.P., BÓRQUEZ, P.A., COSTA, M.E., CIAMPI, L.R. & BRITO, C.S. (2006): Bacteriocin like substance production by *Carnobacterium piscicola* in a continuous system with three culture broths. Study of antagonism against *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged salmon. *Braz. J. Microbiol*., 37(1).

SCUDAMORE, K.A., BAILLIE, H., PATEL, S. & EDWARDS, S.G. (2007): Occurrence and fate of *Fusarium* mycotoxins during commercial processing of oats in the UK. *Food Addit Contam.*, 24(12), 1374-1385.

SHELOMI, M., SITEPU, I.R., BOUNDY-MILLS, K.L. & KIMSEY L.S. (2015): Review of the gross anatomy and microbiology of the Phasmatodea digestive tract. *Journal of orthoptera research*, 24(1), 29-40.

SHIFFMAN, M.E., SOO, R.M., DENNIS, P.G., MORRISON, M., TYSON, G.W. & HUGENHOLTZ, P. (2017): Gene and genome-centric analyses of koala and wombat fecal microbiomes point to metabolic specialization for *Eucalyptus* digestion. *PeerJ*, 5, e4075.

SPERGSER, J., LONCARIC, I., TICHY, A., FRITZ, J. & SCOPE, A. (2018): The cultivable autochthonous microbiota of the critically endangered Northern bald ibis (*Geronticus eremita*). *PLoS ONE*, 13(4), e0195255.

STOFFELS, G., NISSEN-MEYER, J., GUDMUNDSDOTTIR, A., SLETTEN, K., HOLO, H. & NES, I.F. (1992): Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol*., 58(5), 1417–1422.

SUGIMOTO, T., MINAMISAWA, M., TAKANO, K., FURUKAWA, Y. & TSURUTA, O. (1976): Natural occurrence of ochratoxin and sterygmatocystin in moldy rice. *Proc Jpn Assoc Mycotoxicol*, 3, 4–3.

SWEENEY, M.J. & DOBSON, A.D.W. (1999): Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175(2), 149-163.

TAHEUR, F.B, MANSOUR, C., KOUIDHI, B. & CHAIEB, K. (2019): Use of lactic acid bacteria for the inhibition of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius* growth and mycotoxin production. *Toxicon*, 166, 15-23.

TAVAKOLI, M., HABIBI NAJAFI, M.B. & MOHEBBI, M. (2019): Effect of the milk fat content and starter culture selection on proteolysis and antioxidant activity of probiotic yogurt. *Heliyon*, 5(2), 01204.

TENIOLA, O.D., ADDO, P.A., BROST, I.M., FÄRBER, P., JANY, K-D., … & HOLZAPFEL, W.H. (2005): Degradation of aflatoxin B(1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM44556(T). *Int. J. Food Microbiol*., 105(2), 111-117.

TINGIRIKARI, J.M.R., KOTHARI, D. & GOYAL, A. (2014): Superior prebiotic and physicochemical properties of novel dextran from *Weissella cibaria* JAG8 for potential food applications. *Food Funct*., 5(9), 2324-2330.

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.

TSUCHIDA, S., KITAHARA, M., NGUEMA, P.P.M., NORIMITSU, S., FUJITA, S., YAMAGIWA, J., NGOMANDA, A., OHKUMA, M., & USHIDA, K. (2014): *Lactobacillus gorillae* sp. nov., isolated from the faeces of captive and wild western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Int J Syst Evol Microbiol.*, 64(Pt 12), 4001-4006.

VAN DER WESTHUIZEN, L., SHEPHARD, G.S., RHEEDER, J.P., BURGER, H.M., GELDERBLOM, W.C.A., WILD, C.P. & GONG, Y.Y. (2011): Optimising sorting and washing of home-grown maize to reduce fumonisin contamination under laboratory-controlled conditions. *Food Control*, 22, 396–400.

VERŠILOVSKIS, A. & DE SAEGER, S. (2010): Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods – An overview. *Mol.Nutr. Food Res*., 54, 136-147.

VILLAR, M., DE RUIZ HOLGADO, A.P., SANCHEZ, J.J., TRUCCO, R.E. & OLIVER, G. (1985): Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 664–666.

VINDEROLA, G. & RITIENI, A. (2015): Role of probiotics against mycotoxins and their deleterious effects. *Journal of Food Research*, 4(1), 10-21.

WACOO, A.P., MUKISA, I.M., MEEME, R., BYAKIKA, S., WENDIRO, D., SYBESMA, W. & KORT, R. (2019): Probiotic enrichment and reduction of aflatoxins in a traditional African maize-based fermented food. *Nutrients, 11*(2), 265-280.

WANG, C., CHANG, T., YANG, H. & CUI, M. (2015): Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 47, 231-236.

WANG, J., OGATA, M., HIRAI, H. & KAWAGISHI, H. (2011): Detoxification of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *FEMS Microbiol Lett.*, 314(2), 164-169.

WANG, L., LI, L., LV, Y., CHEN, Q., FENG, J. & ZHAO, X. (2018): *Lactobacillus plantarum* restores intestinal permeability disrupted by *Salmonella* infection in newly-hatched chicks. *Sci. Rep*., 8, 2229.

WANNUN, P., PIWAT, S. & TEANPAISAN, R. (2014): Purification and characterization of bacteriocin produced by oral *Lactobacillus paracasei* SD1. *Anaerobe*, 27, 17-21.

WIGHTWICK, A., WALTERS, R., ALLINSON, G., REICHMAN, S. & MENZIES, N. (2010): Environmental risks of fungicides used in horticultural production systems, Fungicides, Odile Carisse (Ed.), ISBN: 978-953-307-266-1, InTech.

WILLIAMS, R.E.O., HIRCH, A. & COWAN, S.T. (1953): *Aerococcus*, a new bacterial genus. *J. Gen. Microbiol.*, 8, 475-480.

WOOD, B.J.B. & HOLZAPFEL, W.H. (1995): *The genera of lactic acid bacteria*. Blackie Academic and Professional, London.

ZHANG, X., KUCA, K., DOHNAL, V., DOHNALOVÁ, L., WU, Q. & WU, C. (2014): Military potencial of biological toxins. *Journal of applied biomedicine,* 12, 63-77.

ZHENG, J., WITTOUCK, S., SALVETTI, E., FRANZ, C.M.A.P., HARRIS, H.M.B., MATTARELLI, P., O'TOOLE, P.W., POT, B., VANDAMME, P., WALTER, J., WATANABE, K., WUYTS, S., FELIS, G.E., GÄNZLE, M.G. & LEBEER, S. (2020): A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology,* 70(4), 2782-2858.

ZINEDINE, A., FAID, M. & BENLEMLIH, M. (2005): *In vitro* reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. *Int. J. Agric. Biol*. *7*(1), 67–70.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Batáné Dr. Vidács Ildikónak, akihez mindig fordulhattam a munkám során felmerülő kérdésekkel. Szakmai tapasztalata és tudása sokat segített a kutatás során felmerülő nehézségek megoldásában.

Köszönöm Dr. Székács Andrásnak a NAIK Agrár-környezettudományi Kutatóintézet igazgatójának és Dr. Kukolya Józsefnek a NAIK AKK Környezeti és Alkalmazott Mikrobiológiai Osztály osztályvezetőjének, hogy lehetőséget biztosítottak a kísérleteim elvégzéséhez.

Köszönet a NAIK AKK Környezeti és Alkalmazott Mikrobiológiai Osztályán minden jelenlegi és volt kollégámnak, akikhez a kutatás során mindig fordulhattam segítségért.

Köszönet illeti a NAIK-AKK Környezetanalitikai Osztályáról Dr. Mörtl Máriát, aki az analitikai vizsgálatok megtervezésénel sok segítséget nyújtott, illetve Magor Csilla Szilviát a HPLC mérések elvégzéséért.

Köszönöm a NAIK vezetőségének, hogy létrehozták a Kutatói utánpótlást elősegítő programot, amelynek keretein belül lehetőségem nyílt ezt a kutatást elvégezni.

A kutatásaim jelentős részének finanszírozása a NVKP- 16-1-2016-0009 és az OTKA K116631 projektekből történt.

Nem utolsó sorban pedig köszönöm családomnak, hogy mindvégig támogattak.