

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Tejsav baktériumok bakteriocin termelő képességének vizsgálata

Készítette:

Juhász Emőke

Biológia Bsc

Küldő intézmény:

Eszterházy Károly Főiskola

Egerfood Regionális Tudásközpont

Témavezető:

Dr. Pál Károly

Tartalomjegyzék

Fajnevek és rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
3. Célkitűzések	7
4. Anyag és módszer.....	8
4.1 Mintavételezés	8
4.2 Baktériumok tenyésztése	8
4.3 A telepek tisztítása	8
4.4 Alakfestés.....	8
4.5 A baktériumok lefagyasztása	8
4.6 Gátlási vizsgálatok	9
4.7 DNS kivonás a szájból izolált baktériumokból és <i>Lb. reuteri</i> -ből (DSMZ17938).....	9
4.8. PCR reakció a kivont DNS mintával	10
4.9 Agaróz gélelektroforézis.....	11
4.10 Szekvenálás.....	11
5. Eredmények.....	12
5.1 Baktériumok izolálása szájból, tisztításuk, morfológiai azonosításuk, katalogizálásuk.	12
5.2 Gátlási vizsgálatok	12
5.3 DNS kivonás eredményei	13
5.4 PCR kísérletek az univerzális E8F/E1115R baktérium primerekkel	14
5.5 A DNS szekvenálás eredményei, baktérium fajok azonosítása	15
5.6 BojA/858left PCR kísérletek a szájból izolált törzsekkel.....	15
5.7 B3226up/Bbdown PCR kísérletek a szájból izolált törzsekkel	18
5.8 GaUF/GaHR PCR kísérletek a szájból izolált törzsekkel.....	21
6. Összefoglalás.....	25
Köszönetnyilvánítás	27
Irodalomjegyzék	28
1. melléklet	31

Fajnevek és rövidítések jegyzéke

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lb. gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Lb. oris</i>	<i>Lactobacillus oris</i>
<i>Lb. reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lb. zeae</i>	<i>Lactobacillus zeae</i>
Da	dalton
MRS	de Man, Rogosa, Sharpe agar
NTC	Non Template Control (Templát mentes kontroll)
ORF	open reading frame (nyitott leolvasási keret)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeráz láncreakció)
TBE puffer	Tris-Borate-EDTA puffer
WHO	World Health Organization

1. Bevezetés

A fermentált élelmiszerek egészségre gyakorolt jótékony hatásai régóta ismeretesek, de a tudományos alaposságú vizsgálatok csak a XX. század elején kezdődtek meg. A kutatások során a figyelem középpontjába azok a baktériumok kerültek, amelyek anyagsere-útvonalaik a tejsavas erjedést is magukba foglalják, és ezáltal játszanak szerepet a savanyított élelmiszerek létrehozásában. Ebbe a csoportba többnyire a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetségbe tartozó fajok tartoznak.

A fermentált élelmiszerek élettanilag előnyös hatásait elsősorban annak köszönhetik, hogy a tejsav termelő törzsek a vastagbélbe kerülve csökkentik környezetük pH-ját, vagyis savanyítják a béltartalmat, amely kedvezőtlen hatást jelent a patogén mikrobák számára. Emellett még számos egyéb tulajdonsággal rendelkeznek a tejsav baktériumok, többek között más fajokkal szemben antagonista hatású fehérjét termelnek. Ezeket a fehérjét összefoglaló néven bakteriocineknek nevezzük, és pontosabb megismerésük nagy segítséget jelenthet az élelmiszerromlást okozó vagy éppen élelmiszerszennyező patogén mikrobákkal szembeni harcban.

Kísérleteim során szájból izolált *Lb. gasseri* baktérium törzsek bakteriocin termelő képességének felmérése volt a célom, és amint az Eredmények fejezetben látható, sikerült PCR-rel kimutatnom bakteriocin termelésért felelős géneket.

2. Irodalmi áttekintés

A tejsav baktériumokkal előállított élelmiszerek története több ezer évre nyúlik vissza. Már az ókorban felismerték az emberek, hogy bizonyos körülmények között ízletes erjesztett élelmiszereket tudnak előállítani a nyers tejből. Napjainkban a savanyított tejkészítmények piaca folyamatosan növekedik, köszönhetően annak, hogy az egészséges étrend részét képezik a különféle joghurtok, kefirek és más termékek.

A savanyításért felelős baktériumok túlnyomó többsége a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetség tagja. Elsősorban annak köszönhető egészségre gyakorolt előnyös hatásuk, hogy tejsavat és rövid szénláncú zsírsavakat termelnek, melyek jelentős mértékben csökkentik a vastagbélben uralkodó pH-t, ezáltal kedvezőtlen körülményeket teremtenek a kórokozó mikrobák számára. Számos tejsav baktérium törzset a „probiotikus” jelzővel illetnek, amely arra utal, hogy az adott mikrobatorzs valamilyen többlet pozitív hatással rendelkezik a nem probiotikus törzsekhez képest. A probiotikus hatás sokféleképpen megnyilvánulhat, ezek egyike a bakteriocin termelés.

Számos tejsav baktérium törzs, amelyet fermentált élelmiszerek készítéséhez alkalmaznak (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* és *Leuconostoc* nemzetség) erőteljes antagonizmust mutat más baktériumokkal szemben. Ezek lehetnek saját nemzetségük fajai vagy nem rokon romlást okozó mikroorganizmusok és patogének. A fenti baktériumok mellett számos *Bifidobacterium* törzsről is bizonyították, hogy gátló hatást fejtenek ki más mikrobákkal szemben (Biavati és mtsai, 2000). Egy másik kutatásban számos jelentős kórokozóval szemben tapasztaltak antagonista hatást (Gibson & Wang, 1994).

A gátló hatásért többnyire szerves savak (főként tejsav és ecetsav), hidrogén-peroxid, vagy az anyagcsere során keletkező melléktermékek a felelősek. Némely esetben azonban kimutatták, hogy a gátlást bakteriosztatikus vagy baktericid hatással rendelkező fehérjék az ún. bakteriocinek okozhatják (Vandenbergh, 1993; Servin, 2004; Makras & De Vuyst, 2006). 1976-ban született meg a bakteriocinek fogalmának definíciója. Eszerint a bakteriocinek mikroorganizmusok széles köre által termelt fehérjék, amelyek korlátozott számú közelrokon törzsszel szemben baktericid hatásúak (Harlander, 1993). A bakteriocinek közül egyesek széles hatásspektrumot mutatnak, bár többségük csak a Gram-pozitív mikroorganizmusok számára gátló hatású (Daba és mtsai, 1991).

A bakteriocinek lehetnek kicsi, néhány ezer Da méretű fehérjék, vagy összetett szerkezetűek, amelyek 10^6 Da-nál is nagyobb méretű alegységből állnak. A bakteriocin termelő törzsek immunitást fejlesztettek ki saját gátló hatásukra nézve, és az immunitásért felelős gének általában a termelésért felelős génekkel egy klaszterben helyezkednek el (Kun, 2008). A történelem során az elsőként izolált bakteriocin az *E. coli* által termelt kolicin volt 1925-ben. Ezt követte 1928-ban a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* által termelt nizin, amelynek használatát a WHO 1964-ben engedélyezte, mint természetes élelmiszer-tartósítót (Montville & Kaiser, 1993; Hansen, 1993).

A bakteriocinek négy osztályba (I, II, III, IV) és hat alosztályba (Ia, Ib, IIa, IIb, IIc, IId) sorolhatók (Kun, 2008). A IV. osztály azokat a bakteriocineket tartalmazza, amelyek nagy komplexeket alkotnak más makromolekulákkal, viszont ilyen bakteriocint még nem határoztak meg. Ez arra utalhat, hogy ez a típusú bakteriocin egy „műtermék” és a bakteriocinek kationos és hidrofób tulajdonsága eredményezi az ilyen komplex szerkezet létrejöttét (Jimenez-Diaz és mtsai, 1995).

A *Lb. gasseri* faj megtalálható az emberi tápcsatorna majdnem minden szakaszában, bennszülött fajnak számít a szájüregben (Reuter, 2001; Dal Bello & Hertel, 2006). Csecsemők székletéből izolálták kutatók olyan törzseit, amelyek bakteriocint termeltek. Érdekesség, hogy az azonosított bakteriocinek nem voltak azonosak minden törzsnél, több különböző fehérjét sikerült azonosítani. A *Lb. gasseri* KT7 törzséből a KT7 bakteriocint (Zhu és mtsai 2000) izolálták; a *Lb. gasseri* K7 és LF221 törzsében ugyanazokat a bakteriocineket azonosították, noha két külön izolátumról volt szó (Pernel és mtsai 2010); a *Lb. gasseri* LA39 és a *Lb. reuteri* LA6 törzséből izolált fehérjék szintén megegyeznek (Kawai és mtsai 1998; Kawai és mtsai 2001).

Munkánk során szájból izolált *Lb. gasseri* törzseket vizsgáltunk meg, teszteltük antagonizmusukat más baktériumokkal szemben és PCR-rel próbáltunk azonosítani bakteriocin termelésért felelős géneket.

3. Célkitűzések

Az EGERFOOD Regionális Tudásközpont laboratóriumaiban, több irányban is folynak kutatások, amelyeknek célja olyan baktériumok izolálása és vizsgálata, amelyekre alapozva akár új probiotikus termékek is kifejleszthetők lesznek a nem túl távoli jövőben. Az általam elvégzett kísérletek azt a célt szolgálják, hogy feltérképezzük *Lb. gasseri* bakteriocin termelő képességét, ezáltal lehetőséget teremtsünk a bakteriocin későbbi hasznosítására.

Célkitűzéseim az alábbiak voltak:

1. *Lb. gasseri* törzsek izolálása szájbüregből. Az irodalmi adatok alapján ugyanis a szájban ez a faj többé-kevésbé állandósult kolóniákat képez.
2. Az izolált *Lb. gasseri* törzsek azonosítása szekvenálással, ugyanis ezen a módon lehetséges az idő- és anyagigényes mikrobiológiai azonosítás kiváltása.
3. Az izolált *Lb. gasseri* törzsek antagonista hatásának kimutatása más baktériumok pázsitján. Ez a gátló hatás utalhat arra, hogy a törzs a szerves savak mellett esetleg bakteriocint is termel.
4. Bakteriocin gén jelenlétének vizsgálata specifikus primerekkel, PCR módszerrel. A vizsgálat során az irodalomban gassericin gyűjtőnév alatt szereplő, de különböző összetételű bakteriocineket kódoló gének azonosítása a cél.

4. Anyag és módszer

4.1 Mintavételezés

Steril mintavételező pálcikával vettünk mintát a száj nyálkahártyájáról, főleg a nyálmirigyek környékéről, a szájüreg faláról és a nyelv alól is 10 önkéntestől. A mintavételező pálcikáról a mintát 5 ml barna MRS tápfolyadékba, mint *Lactobacillus* specifikus dúsító táplevesbe mostuk. Ezután a mintákat 48 órán át inkubáltuk 37 °C-on.

4.2 Baktériumok tenyésztése

Az inkubációs idő letelte után a tápfolyadékból 100 µl-t barna MRS táptalajra szélesztettünk, a lemezeket 37 °C-os anaerob gázkamrába helyeztük (886 mbar nyomás, gázkeverék: 10% CO₂ + 10% H₂, N₂ elegy), majd 48 órán keresztül inkubáltuk.

4.3 A telepek tisztítása

A következő lépésben tisztítottuk a mintákat, vagyis átoltottuk a különböző baktérium telepeket külön Petri-csészékre, amelyeket újabb 48 órán keresztül inkubáltunk 37 °C-os anaerob gázkamrában. Ezt a lépést még kétszer megismételtük, hogy bizonyosak legyünk abban, hogy csak egy faj van egy Petri-csészén. A legutolsó tisztítás után a telepeket anaerob jarban tároltuk.

4.4 Alakfestés

A tiszta 2 napos telepeken alakfestést végeztünk, ahol karbolos bengál rózsát használtunk festékanyagként. Először kenetet készítettünk: a tárgylemezt Bunsen-égő lángjánál zsírtalanítottuk, vizet cseppentettünk rá, majd oltókaccsal belemostuk a vízcseppbe baktérium sejteket, ezt elkentük, szárítottuk és hővel rögzítettük. A karbolos bengál rózsát pár percig hagytuk a keneten, majd lemostuk, szárítottuk a lemezt és mikroszkóp alatt vizsgáltuk a sejteket immerziós olaj használata mellett.

4.5 A baktériumok lefagyasztása

48 órás inkubálás után Petri-csészéről egy kacsnyi telepet szuszpendáltunk 1,5 ml barna MRS tápfolyadékban (VWR, Németország) Eppendorf-csőben; ezeket 37 °C-on

inkubáltuk 24 órán át, majd 200 µl 87%-os glicerint adtunk a szuszpenzióhoz. Vortexeltük a csöveket majd -20 °C-on tároltuk a tenyészeteket további felhasználásig. Kilenc különböző morfológiájú telepet sikerült izolálnunk és ezeket fagyasztottuk le. A telepek a laborban használatos katalógusnak megfelelően az alábbi katalógusszámokat kapták: EKF50, EKF51, EKF52, EKF53, EKF54, EKF55, EKF56, EKF57, EKF58.

4.6 Gátlási vizsgálatok

MRS agart készítettünk: 33 g MRS agar port (Scharlau, Németország) 500 ml desztillált vízzel elkevertük, majd autoklávoztuk. Három baktériumból (*E. coli*, *Lb. casei*, *Lb. zeae*) készítettünk pázsitot, a következő módon: 0,5 McF denzitású szuszpenziót készítettünk a fiziológiás sóoldatban, majd ebből a szuszpenzióból 1 ml-t pipettáztunk Petri-csészébe és erre öntöttünk 25 ml MRS agart.

Miután a lemezek megszilárdultak, a 9 izolált törzsből egy kacsnyi telepet helyeztünk a felszínükre 10 µl-es szélesztőkaccsal. A lemezeket 48 órán keresztül inkubáltuk, majd feljegyeztük, hogy melyik telepek körül találtunk feltisztulási zónákat, ugyanis ez utal az antagonista hatásra (szerves sav és/vagy bakteriocin termelés).

4.7 DNS kivonás a szájból izolált baktériumokból és *Lb. reuteri*-ből (DSMZ17938)

A GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, USA) protokollja szerint vontuk ki a DNS-t. Először a sejtsuszpenziót vortexeltük, majd 500 µl-t kimérünk belőle 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. A sejteket 5 percig centrifugáltuk 18 620 g-n. A felülúszót leszívtuk, majd 200 µl frissen elkészített lizozim oldatot pipettáztunk a pellethez. A lizozim oldat összetétele a következő: 2000 µl 200mM Tris (Prolabo, EU), 800 µl 50mM EDTA (Reanal, Budapest), 10 ml desztillált víz, 400 mg lizozim por (Applichem, Németország), 200µl Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, Németország). Az oldat pH-ját 8-ra állítjuk, majd elkeverés után 20 ml-re töltjük fel desztillált vízzel. A mintákat ezt követően 37 °C-on inkubáltuk minimum 1 órán át thermoblokkban.

A továbbiakban a kitben leírt protokollt követtük. Az utolsó lépésben az általunk izolált baktériumok DNS-ét 200 µl tiszta desztillált vízzel, a törzsgyűjteményi *Lb. reuteri* DNS-ét pedig 200 µl Eluation Solution-nal eluáltuk. A DNS tisztaságát és mennyiségét NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA) típusú spektrofotométerrel mértük meg.

4.8. PCR reakció a kivont DNS mintával

Vizsgálataink során több különböző primerpárral végeztünk PCR kísérleteket. A DNS-ek illetve a PCR folyamatának ellenőrzésére az E8F és E1115R univerzális baktérium primereket használtunk, melyek a 16S rDNS konzervált régiójához kötődnek. A gassericin gének vizsgálatához a BojA/858left, B3226/Bbdown és GaUF/GaHR primereket használtuk (1. táblázat).

1. táblázat A PCR vizsgálatokhoz felhasznált primerek szekvenciái és forrásaik

Primer neve	Szekvenciája (5'-3')	A primer forrása
E8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Baker és mtsai 2003
E1115R	AGGGTTGCGCTCGTTG	Baker és mtsai 2003
BojA	TGGCGGATCAGTACAATGTG	Peternel és mtsai 2010
858left	GCTGCCTACAGTCAATTAGA	Peternel és mtsai 2010
B3226up	GGAGAAAGTAGAAAAAGCAC	Peternel és mtsai 2010
Bbdown	GTCTCTTCGGTTGGCGTTGT	Peternel és mtsai 2010
GaUF	CACTCGTAATGGATTTCCTA	Kawai és mtsai 2001
GaHR	GCCTTTTTTGAATACTCTATTC	Kawai és mtsai 2001

A PCR reakciókhoz a DreamTaq polimerázt (Fermentas, USA) és komponenseit használtuk, az elegyek összetétele egy reakcióra az alábbi volt: Dream Taq puffer 2,5 µl, 25 mM MgCl₂ 0,5 µl, 10 mM dNTP 0,5 µl, 5 U/ µl DreamTaq polimeráz 0,2 µl, 5pM primerek 1-1 µl, desztillált víz 17,3 µl. A PCR-t egy Corbett Thermocycler típusú készülékben hajtottuk végre.

Az E8F/E1115R primerpárhoz használt PCR program az alábbi volt:

1. 95 °C	3 perc	} 35x
2. 95 °C	5 másodperc	
65 °C	5 másodperc	
72 °C	10 másodperc	
3. 72 °C	5 perc	
4. 24 °C	1 másodperc	

A többi primerpár (BojA/858left, B3226up/Bbdown, GaUF/GaHR) esetén először elvégeztünk egy grádiens PCR vizsgálatot, hogy megállapítsuk a primerek optimális feltapadási hőmérsékletét, majd ennek alapján állítottuk össze a végleges programot. A

grádiens PCR program megegyezett a fenti programmal, annyi eltéréssel, hogy a 2. ciklusban az alábbiak voltak a lépések: 95 °C - 5 másodperc, 50-70 °C - 10 másodperc, 72 °C - 10 másodperc, 35-ször ismételve.

A hőmérséklet grádiens kísérlet elvégzése után a BojA/858left primerek optimalizált programjának 1., 3. és 4. ciklusa megegyezik a fenti programmal, a 2. ciklus lépései az alábbiak voltak: 95 °C - 5 másodperc, 60 °C - 10 másodperc, 72 °C - 10 másodperc, 35-ször ismételve.

A hőmérséklet grádiens kísérlet elvégzése után a GaUF/GaHR primerek optimalizált programjának 1., 3. és 4. ciklusa megegyezik a fenti programmal, a 2. ciklus lépései az alábbiak voltak: 95 °C - 5 másodperc, 55 °C - 5 másodperc, 72 °C - 5 másodperc.

A B3226up/Bbdown primerpárral elvégzett hőmérséklet grádiens PCR során nem tapasztaltunk termékképződést, ezért a PCR kísérleteket nem tudtuk tovább végezni.

4.9 Agaróz gélelektroforézis

A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen (SeaKem LE Agarose, Lonza) választottuk el. 50 ml TBE pufferben oldottunk fel 0,5 g agarózt, majd kiöntés előtt 5 µl 10 000x GelRedet (Biotium, USA) kevertünk el benne DNS festés céljából. A futtatást TBE pufferrel feltöltött kádban végeztük, 120 V-on 30 percen keresztül. 5 µl PCR elegyet futtattunk meg, a méretmarker 100 bp BenchTop Ladder (Promega, USA) volt. A géleket BioDoc Analyze (Biometra, Németország) típusú készülékben fotóztuk.

4.10 Szekvenálás

Az E8F/E1115R primerpárral amplifikált termékeket először gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a megfelelő termékeket a GeneJET PCR Purification Kit-tel (Fermentas, USA) tisztítottuk ki. A mintákat az LGC Genomics (Németország) laboratóriumában szekvenáltattuk meg, mindkét primerrel. Az eredményül kapott fragmenteket a ClustalX nevű programmal (<http://www.clustal.org/>) illesztettük össze, majd a szekvenciákat (és ezáltal az izolátumokat) az NCBI GenBank adatbázisában (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) történt BLAST kereséssel azonosítottuk.

5. Eredmények

5.1 Baktériumok izolálása szájból, tisztításuk, morfológiai azonosításuk, katalogizálásuk

A telepek tisztítása után az alakfestés során a kitenyésztett baktériumaink morfológiailag pálcika alakúak, ami megfelel a *Lactobacillus*ok morfológiai alakjának. A tisztított törzsek a laborban használatos katalógusnak megfelelően az alábbi katalógusszámokat kapták: EKF50, EKF51, EKF52, EKF53, EKF54, EKF55, EKF56, EKF57, EKF58. Az izolátumok szuszpenzióit 87%-os glicerinnel összekeverve -20 °C-os fagyasztóba helyeztük, későbbi felhasználás céljából.

5.2 Gátlási vizsgálatok

Az izolált törzsekkel gátlási vizsgálatokat is végeztünk 48 órás inkubálás után, amelyek eredményeit a 2. táblázat és az 1. melléklet mutatja be.

2. táblázat Gátlási vizsgálatok elvégzése az általunk szájból izolált baktérium törzsekkel. Termelő törzsek: szájból izolált baktériumok. Tesztörzsek: pázsitot alkotó baktériumok. Jelmagyarázat: „-”: nem volt feltisztulási zóna; „+”: keskeny feltisztulási zóna (1 mm); „++” közepes feltisztulási zóna (2-3 mm); „+++”: széles feltisztulási zóna (>3 mm)

Tesztörzsek	Termelő törzsek								
	EKF 50	EKF 51	EKF 52	EKF 53	EKF 54	EKF 55	EKF 56	EKF 57	EKF 58
<i>E. coli</i>	++	+	+++	++	++	+	+	+++	-
<i>Lb. casei</i>	+++	+	+++	-	+++	-	++	+	-
<i>Lb. zae</i>	++	-	++	+	++	-	++	++	-

A táblázatból látható, hogy az EKF52 törzs fejtette ki a legerősebb antagonisztikus hatást a tesztörzsekre, melyet az EKF50, EKF54, EKF57 és EKF56 követett. Az EKF51, EKF53, EKF55 és EKF58 jelű törzsek nagyon csekély gátló hatást fejtettek ki. A fentiekből az következik, hogy az erősebb gátló hatást kifejtő törzsek intenzívebben termelnek szerves savakat, és esetleg a bakteriocin termelése sem kizárt.

5.3 DNS kivonás eredményei

Miután a saját, szájból származó baktériumainkból kivontuk a DNS-t, a mintákat mennyiségi és minőségi ellenőrzés alá vetettük a NanoDrop készülék segítségével. A DNS kivonás eredményeit a 3. táblázat mutatja be.

3. táblázat DNS kivonás eredményei szájból izolált baktériumok esetében

Baktérium katalógusszáma	260/280 nm	260/230 nm	DNS mennyisége (ng/μl)
EKF50	1,85	1,66	27,0
EKF51	1,78	1,05	26,5
EKF52	2,14	1,96	133,3
EKF53	1,81	1,15	15,9
EKF54	2,21	2,20	108,4
EKF55	1,92	1,45	23,9
EKF56	1,63	0,91	37,0
EKF57	1,91	1,77	34,1
EKF58	2,19	1,94	123,5

A táblázatból látható, hogy egy nagyságrendnyi különbség is előfordul az izolált DNS-ek mennyisége között (EKF53: 15,9 ng/μl). Ennek oka elsősorban az lehet, hogy nem sikerült minden baktériumból azonos mennyiséget tenyészteni, amely a kivonáshoz használt szuszpenziók denzitásbeli különbségeiben is érzékelhető volt.

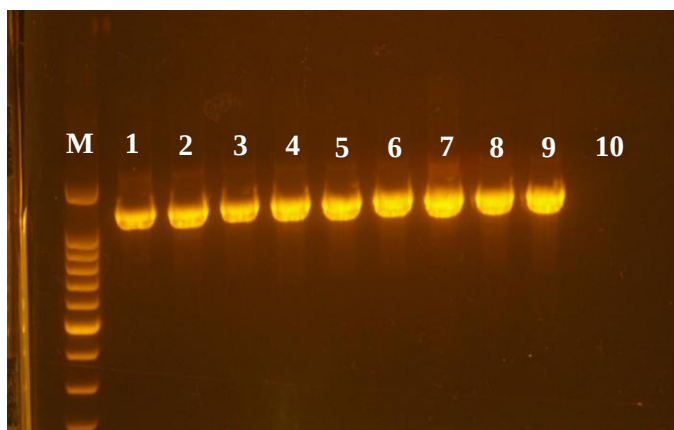
Egy DNS oldat tisztaságát a 260/280 nm-en és 260/230 nm-en mért értékek hányadosával lehet jellemezni. A DNS-nek 260 nm-en van elnyelési maximuma, a fehérjék aromás aminosavainak 280 nm-en, míg a fenolnak és poliszacharidoknak 230 nm-en. A hányadosok tehát megmutatják, hogy egy DNS oldat milyen mértékben tartalmaz szennyező anyagokat. Optimális esetben a 260/280 nm-es hányados értéke 1,8-2 között van, és ugyanez igaz a 260/230 nm-es hányadosra is, vagyis ezen értékek esetén mondhatjuk, hogy tiszta a DNS oldatunk. A táblázatból látható, hogy a minták többségének 260/280 nm-es hányadosa a határértékeken belül van, ellenben a 260/230 nm-es értékeket tekintve mindössze négy minta van, amely tisztának mondható. Mindezek ellenére a DNS-kivonatokat alkalmasnak ítéltük a PCR-hez, és ez a kísérletekben be is bizonyosodott.

A PCR-es kísérletekhez a minták törzsoldataiból azonos töménységű munkaoldatokat hígítottunk ki, melyeknek a koncentrációja 10 ng/μl volt. Ezt a lépést szükségesnek tartottuk elvégezni, mivel a korábbi kísérletekben ez a mennyiség megfelelőnek bizonyult az elvégzendő munkákhoz.

5.4 PCR kísérletek az univerzális E8F/E1115R baktérium primerekkel

Ezek a primerek a bakteriális 16S riboszómális RNS-kódoló régió konzervált szakaszaihoz kötnek, és egy kb. 1100 bp hosszúságú fragmentet amplifikálnak (Baker és mtsai 2003). Természetesen a termék mérete kicsi ingadozást mutathat, annak megfelelően, hogy egy adott baktérium törzsben a primerek által közrefogott régióban található-e inszerció vagy delécio a referenciaként használt *E. coli* törzshöz képest.

Az E8F/E1115R primerpár egyrészt arra alkalmas, hogy megállapítsuk, a DNS kivonat alkalmas-e a molekuláris biológiai munkákra. Ha ugyanis a DNS oldat olyan szennyeződések tartalmaz, amelyek gátolják az egyes enzimreakciókat, akkor ezt a PCR folyamán jó eséllyel ki lehet mutatni. Amint az 1. ábra mutatja, a PCR jól működött, mindegyik mintából képződött a várt nagyságú termék.



1. ábra E8F/E1115R PCR kísérlet eredménye a szájból izolált baktériumok DNS-ével. Jelmagyarázat: M: 100bp Benchtop Ladder, 1: EKF50, 2: EKF51, 3: EKF52, 4: EKF53, 5: EKF54, 6: EKF55, 7: EKF56, 8: EKF57, 9: EKF58, 10: NTC. A gélelektroforézist 1%-os agaróz gélen végeztük, 120V feszültségen 30 percig. A gélre 5 µl mintát vittünk fel.

Melléktermékek képződését és szennyeződést nem tapasztaltunk. Noha csak 5 µl-nyi terméket vittünk fel a gélre, a fotón látható, hogy igen fényes jeleket kaptunk, ami nagymérvű termékképződést jelent, tehát a PCR reakciót jól optimalizáltuk.

Mivel a termékek tiszták lettek, ezeket ki tudtuk tisztítani és el tudtuk küldeni szekvenáltatni.

5.5 A DNS szekvenálás eredményei, baktérium fajok azonosítása

Az E8F/E1115R PCR kísérletekben kapott termékeket (ld. 5.4 pont) tisztítás után szekvenáltattuk. A szekvenálást mindkét primerrel elvégeztettük, az eredményül kapott fragmenteket összeillesztettük a ClustalX programmal, majd a szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisában a BLAST keresési algoritmussal azonosítottuk. Az eredményeket a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat A szájból izolált baktérium törzsek DNS-éről az E8F/E1115R primerpárral készült termékek szekvenálása alapján kapott eredmények, az egyes izolátumok azonosítása.

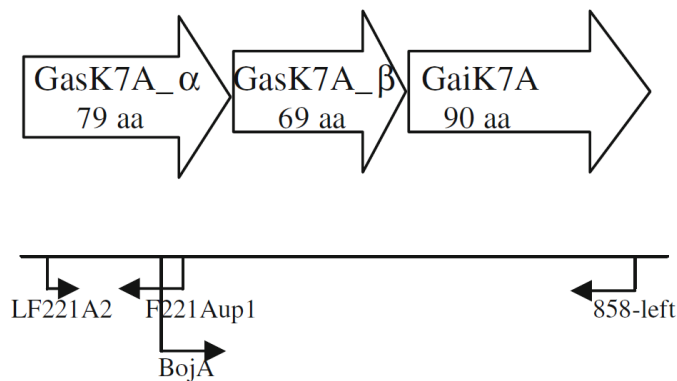
Katalógusszám	Szekvenálás eredménye
EKF50	<i>Lb. fermentum</i>
EKF51	<i>Lb. oris</i>
EKF52	<i>Lb. gasseri</i>
EKF53	<i>Lb. oris</i>
EKF54	<i>Lb. gasseri</i>
EKF55	<i>Lb. gasseri</i>
EKF56	<i>Lb. reuteri</i>
EKF57	<i>Lb. gasseri</i>
EKF58	<i>Lb. gasseri</i>

A szekvenálás alapján öt izolátum *Lb. gasseri*, kettő *Lb. oris*, egy-egy pedig *Lb. fermentum* és *Lb. reuteri*. Számomra meglepően magas a *Lb. gasseri* izolátumok aránya, kevesebbre számítottunk.

Ha összevetjük a szekvenálás eredményeit az antagonizmus vizsgálatokkal, akkor láthatjuk, hogy a legerősebb gátló hatást az EKF52 jelű *Lb. gasseri* törzs fejtette ki a tesztörzsekre (ld. 5.2 pont). Szintén jól gátolt az EKF54 és EKF57 jelű *Lb. gasseri* izolátum is. Ezek az eredmények biztatóak voltak a későbbi, bakteriocin gének kimutatását célzó kísérleteinkhez, bár természetesen a konkrét fehérje kimutatása nélkül csak közvetett következtetéseket tudunk levonni.

5.6 BojA/858left PCR kísérletek a szájból izolált törzsekkel

A primerpárt irodalmi adatok alapján rendeltük meg, mivel a cikkben (Peternel és mtsai 2010) leírtak alapján alkalmasnak tűnt a gassericin-K7A génklaszter részleges amplifikációjára (2. ábra).



2. ábra A BojA/858left primerpár által amplifikált régió a gassericin-K7A génklaszterben. GasK7A_α és GasK7A_β: struktúrgének; GaiK7A: immunitás gén. LF221A2 és F221Aup1: további primerek. (Forrás: Peternel és mtsai 2010).

Első lépésben véletlenszerűen kiválasztottuk az EKF55 jelű *Lb. gasseri* izolátumot és hőmérséklet grádiens PCR-t végeztünk, hogy megállapítsuk a primerek optimális annealing hőmérsékletét (3. ábra). Kontrollként az E8F/E1115R primerpárral is elvégeztük a PCR-t ugyanakkor, így ellenőrizni tudtuk, hogy a PCR elegy komponensei és a DNS megfelelő minőségűek, vagyis egy esetleges sikertelenség a BojA/858left primerpárral nem a komponensek hibája.



3. ábra A BojA/858left hőmérséklet grádiens PCR eredménye az EKF55 *Lb. gasseri* törzs DNS-ével, az E8F/E1115R ellenőrző PCR-rel kiegészítve. M: 100 bp Benchtop Ladder. Az annealing hőmérsékletek: 1: 50 °C, 2: 51,9 °C, 3: 53,8 °C, 4: 55,7 °C, 5: 57,5 °C, 6: 59,2 °C, 7: 60,8 °C, 8: 62,5 °C, 9: 64,3 °C, 10: 66,2 °C, 11: 68,1 °C, 12: 70,0 °C. 13: BojA/858left NTC 50 °C-on. 14: E8F/E1115R NTC 50 °C-on. 15: E8F/E1115R termék 64,3 °C-on. A gélelektroforézist 1%-os agaróz gélen végeztük, 120V feszültségen 30 percig. A géltre 5 µl mintát vittünk fel.

A PCR eredménye azt mutatta, hogy a BojA/858left primerpár széles hőmérséklet-tartományban működik, a későbbi kísérletekhez az 60 °C-os annealing hőmérsékletet választottuk.

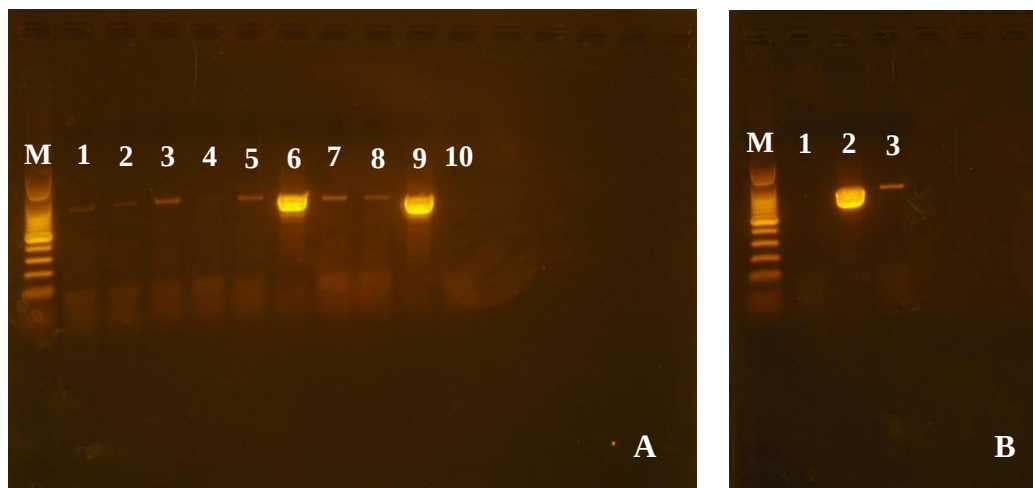
Az E8F/E1115R primerpár a várt terméket adta (15. minta), vagyis a komponensekkel nem volt gond, de ezt a sikeres kísérlet is igazolta.

A BojA/858left primerpárral elvégeztük a PCR-t az összes *Lb. gasseri* izolátumunkkal (4. ábra). Az eredmény azt mutatja, hogy a keresett génklaszter csak az EKF55 és EKF58 jelű izolátumokban van jelen.



4. ábra PCR kísérlet a BojA/858left primerpárral az öt, általunk szájból izolált *Lb. gasseri* törzs DNS-ével. M: 100 bp Benchtop Ladder. 1: EKF52, 2: EKF54, 3: EKF55, 4: EKF57, 5: EKF58, 6: NTC. A halványan látható jelek nem termékek, ugyanezt a jelet az NTC-ben is láthatjuk. A gélelektroforézist 1%-os agaróz gélen végeztük, 120V feszültségen 30 percig. A gélre 5 µl mintát vittünk fel.

Mivel találtunk olyan cikket, amelyben a kutatók leírták, hogy ugyanazt a bakteriocin gént megtalálták *Lb. gasseri* és *Lb. reuteri* törzsekben is (Kawai és mtsai 2001), a BojA/858left primerpárral a PCR kísérletet elvégeztük az összes szájból izolált baktérium törzsünk DNS-ével valamint a DSMZ20079 jelű *Lb. acidophilus*-szal (5A és 5B. ábra). Az eredmény egyrészt azt mutatta, hogy csak az *Lb. gasseri* izolátumok között található meg ez a gén, másrészt pedig még a *Lb. gasseri* törzsek közül sem mindegyikben, hiszen az előző kísérlet eredményeit sikerült megerősíteni: az öt *Lb. gasseri* izolátum közül csak kettőben tudtuk kimutatni a keresett gassericin-K7A klasztert.

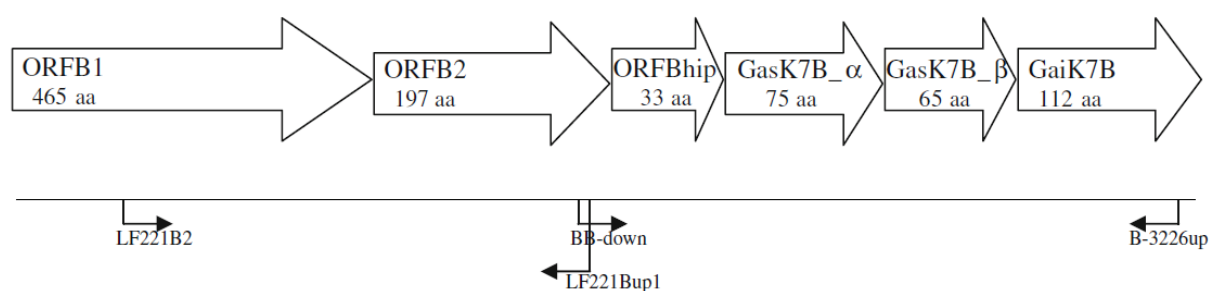


5A. ábra PCR kísérlet a BojA/858left primerpárral az általunk szájból izolált baktérium törzsek DNS-ével. M: 100 bp Benchtop Ladder. 1: EKF50, 2: EKF51, 3: EKF52, 4: EKF53, 5: EKF54, 6: EKF55, 7: EKF56, 8: EKF57, 9: EKF58, 10: NTC. A halványan látható jeleket nem tekintettük terméknek. A gélelektroforézist 1%-os agaróz gélen végeztük, 120V feszültségen 30 percig. A géltre 5 µl mintát vittünk fel.

5B. ábra PCR kísérlet a BojA/858left primerpárral az EKF55 *Lb. gasseri* izolátummal és a DSMZ20079 *Lb. acidophilus*-szal. M: 100 bp Benchtop Ladder. 1:EKF55, 2: DSMZ20079 *Lb. acidophilus*, 3: NTC.

5.7 B3226up/Bbdown PCR kísérletek a szájból izolált törzsekkel

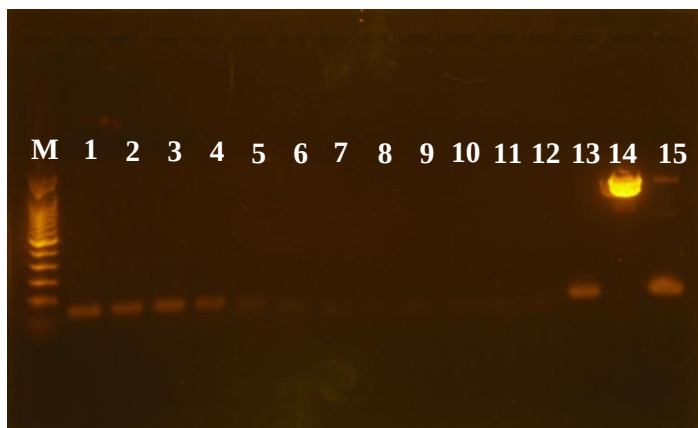
Mivel a cikkben, amely a gassericin-K7A kimutatását írja le, a kutatók a gassericin-K7B klaszter tagjainak (6. ábra) kimutatását is leírják (Peternel és mtsai 2010), mi is megszintetizáltattuk az ehhez szükséges B3226up és Bbdown primereket és elkezdjük a kísérleteket.



6. ábra A B3226up/Bbdown primerpár által amplifikált régió a gassericin-K7B génklaszterben. GasK7B_α és GasK7B_β: struktúrgének; GaiK7B: immunitás gén. LF221B2 és LF221Bup1: további primerek; ORFB1, ORFB2, BRFBhip: nyitott leolvasási keretek. (Forrás: Peternel és mtsai 2010).

Mivel az EKF55 jelű *Lb. gasseri* izolátumban ki tudtuk mutatni a gassericin-K7A gén jelenlétét, ezzel a törzzsel kezdtük meg a B3226up/Bbdown PCR reakció optimalizálását is. Várakozásaink ellenére nem kaptunk terméket. A reakciót több alkalommal is megismételtük, de egyszer sem tapasztaltunk termékképződést. Mivel az ellenőrzésként összeállított

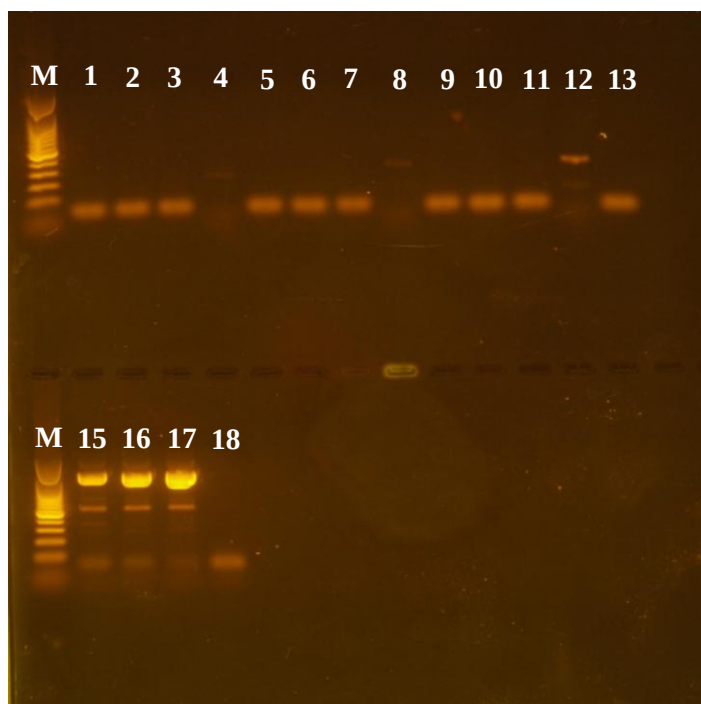
E8F/E1115R PCR reakcióban keletkezett termék (7. ábra), ezért két eshetőségre gondoltunk: 1. a primerek nem működnek megfelelően; 2. a gassericin-K7B génklaszter (vagy annak a primerek által amplifikált régiója) nincs jelen az EKF55 törzsben.



7. ábra A B3226up/Bbdown hőmérséklet grádiens PCR eredménye az EKF55 *Lb. gasseri* törzs DNS-ével, az E8F/E1115R ellenőrző PCR-rel kiegészítve. M: 100 bp Benchtop Ladder. Az annealing hőmérsékletek: 1: 50 °C, 2: 51,9 °C, 3: 53,8 °C, 4: 55,7 °C, 5: 57,5 °C, 6: 59,2 °C, 7: 60,8 °C, 8: 62,5 °C, 9: 64,3 °C, 10: 66,2 °C, 11: 68,1 °C, 12: 70,0 °C. 13: BojA/858left NTC 50 °C-on. 14: E8F/E1115R termék 64,3 °C-on, 15: E8F/E1115R NTC 50 °C-on. A gélelektroforézist 1%-os agaróz gélen végeztük, 120V feszültségen 30 percig. A gélre 5 µl mintát vittünk fel.

Mivel nem lehetett kizárni, hogy a sikertelen kísérlet oka az volt, hogy az EKF55-ös törzsben nincs jelen a gassericin-K7B klaszter, a PCR-t megismételtük az EKF52, EKF54 és EKF57 jelű *Lb. gasseri* törzsekkel. Mivel a három törzs esetén a teljes hőmérséklet grádiens kísérlet végrehajtásához feleslegesen nagy mennyiségű vegyszert kellett volna elhasználni, részleges hőmérséklet grádiens kísérletet végeztünk el. Ez azt jelenti, hogy a PCR készüléken ugyan a korábban is használatos, 50 °C- 70 °C közötti annealing hőmérsékletet állítottuk be, de mintákat csak három hőmérsékleti értékre helyeztünk el, az NTC-t pedig a legalacsonyabb hőmérsékletű helyre tettük. Ha a reakció működik, akkor legalább a legalsó hőmérsékleti értéken terméket kell, hogy kapjunk, esetleg a beállított hőmérsékleti skála középső értékén (60 °C körül) is kapunk terméket. Ebben az esetben a terméket eredményező DNS mintával már egy teljes hőmérséklet grádiens kísérletet is érdemes összeállítani, hogy megállapítsuk az optimális feltapadási hőmérséklet értékét. Ha viszont nem működik a reakció a legalacsonyabb annealing hőmérsékleten, akkor teljesen felesleges mindhárom mintával végrehajtani a teljes hőmérséklet grádiens vizsgálatot. A három DNS illetve a reakcióelegy komponenseinek működőképességét az előző esetekhez hasonlóan itt is az E8F/E1115R primerpárral végzett kontroll PCR-rel ellenőriztük.

A 8. ábrán látható, hogy a B3226up/Bbdown primerek egyik *Lb. gasseri* törzs DNS-ével sem adtak terméket. Mivel pozitív kontroll törzsünk nem volt (próbáltunk beszerezni egy ilyen törzset, de sajnos a laboratórium, amelyben azonosították ezeket a géneket, nem tudott számunkra mintát biztosítani), ezért csak találgatni tudunk az okokat illetően.



8. ábra A B3226up/Bbdown hőmérséklet grádiens PCR eredménye az EKF52, EKF54 és EKF57 jelű *Lb. gasseri* törzs DNS-ével, az E8F/E1115R ellenőrző PCR-rel kiegészítve. M: 100 bp Benchtop Ladder. 1: EKF52 50 °C, 2: EKF52 59,2 °C, 3: EKF52 70,0 °C, 4: B3226up/Bbdown NTC, 5: EKF54 50 °C, 6: EKF54 59,2 °C, 7: EKF54 70,0 °C, 8: B3226up/Bbdown NTC, 9: EKF57 50 °C, 10: EKF57 59,2 °C, 11: EKF57 70,0 °C, 12-13: B3226up/Bbdown NTC, 15: EKF52 E8F/E1115R kontroll, 16: EKF54 E8F/E1115R kontroll, 17: EKF57 E8F/E1115R kontroll, 18: E8F/E1115R NTC. A gélelektroforézist 1%-os agaróz gélen végeztük, 120V feszültségen 30 percig. A géltre 5 µl mintát vittünk fel.

Egy lehetséges magyarázat, hogy az annealing hőmérséklet magas volt, ezért nem tapadtak fel a primerek és nem képződtek terméket. Ennek az elgondolásnak ellentmond, hogy a cikkben, amelyből a primerek szekvenciáját begyűjtöttük, 50-55 °C volt megadva annealing hőmérsékletnek. Próbálkozásaink során jelentősen megnöveltük a PCR egyes lépéseinek időtartamát a más primerpároknál alkalmazotthoz képest, de így sem kaptunk terméket.

A másik lehetséges magyarázat, hogy a primerek szekvenciája nem volt megfelelő. Ezt a lehetőséget ugyan nem lehet kizárni, de mégsem tűnik valószínűnek, hiszen egy cikkben már publikálták az ezen primerekkel elvégzett kísérletek eredményét.

A harmadik és egyben legvalószínűbbnek tűnő ok lehet, hogy az általunk izolált *Lb. gasseri* törzsekben nincs jelen a gassericin-K7B génklaszter. Ennek a ténynek az érdekessége abban rejlik, hogy Peternel és mtsai az általuk vizsgált *Lb. gasseri* K7 törzsben megtalálták mind a gassericin-K7A, mind a gassericin-K7B klasztereket. Az eredményeink akár arra is utalhatnak, hogy a klaszternek csak az egyik (gassericin-K7A) tagja működőképes, vagy akár az sem.

5.8 GaUF/GaHR PCR kísérletek a szájból izolált törzsekkel

A BojA/858left és B3226up/Bbdown primerekkel végzett kísérleteink arra mutattak rá, hogy az irodalmi adatok alapján elvégzett kísérletek időnként meglepő eredménnyel szolgálhatnak. Mivel az öt, szájból izolált *Lb. gasseri* törzs közül csak kettőben (EKF55 és EKF58) sikerült kimutatni bakteriocin termelésért felelős gének (gassericin-K7A klaszter) jelenlétét, és ezekben a törzsekben is csak a gének egy részét (a gassericin-K7B klaszterre nem bukkantunk rá), új primerpárt kerestünk, hogy a maradék három törzs esetleges gassericin génjeire is rábukkantunk.

A GaUF/GaHR primerpár Kawai és mtsai 2001-es cikke alapján rendeltük meg, ezek a primerek a gassericin-A-ra specifikusak. Ezekről a primerekről nem csak azt reméltük, hogy abban a három *Lb. gasseri* törzsben is találunk bakteriocin gént, amelyek a BojA/858left primerekkel nem adtak terméket, hanem azt is, hogy esetleg más, szintén szájból izolált fajokban is megtaláljuk a gassericin-A génjét. A cikkben ugyanis arra következtetésre jutottak, hogy az ugyanazon niche-ből (4 hónapos csecsemő székletéből) izolált *Lb. gasseri* LA39 és *Lb. reuteri* LA6 törzsek ugyanazt a bakteriocint termelik, és a termelésért felelős gének is szinte teljes mértékben azonosak. Mivel mi szájból izoláltunk több baktérium fajt (és ezek között volt, amelyet ugyanannak a személynek a szájából), nem zártuk ki a lehetőségét, hogy nem csak a *Lb. gasseri* izolátumok, hanem a többi faj némelyike is tartalmazhatja ugyanazt a gént és ezt a PCR termékek analízisével tudjuk alátámasztani.

A korábbi kísérletekhez hasonlóan az első lépésben hőmérséklet grádiens PCR-t hajtottunk végre, hogy optimalizáljuk a PCR reakció körülményeit. A vizsgálatokat az EKF55 jelű *Lb. gasseri* izolátum DNS-ével kezdtük. Ez a törzs a BojA/858left primerpárral már adott terméket (a gassericin-A klaszter jelenlétét mutatta ki ezáltal), ezért kíváncsiak voltunk, hogy tartalmaz-e a baktérium genomja más típusú (ebben az esetben bakteriocin kódoló) régiót is.

A 9. ábrán látható, hogy ez a kísérlet nem hozott eredményt, a *Lb. gasseri* EKF55 izolátum nem adott pozitív jelet, nem kaptunk terméket. Ugyanezt a kísérletet elvégeztük az EKF52 jelű *Lb. gasseri* izolátummal is, de ebben az esetben sem volt eredményes a próbálkozásunk (10. ábra). Mindkét esetben kaptunk viszont terméket az E8F/E1115R primerekkel, vagyis a reakcióelegy és a DNS-ek is megfelelőek voltak.

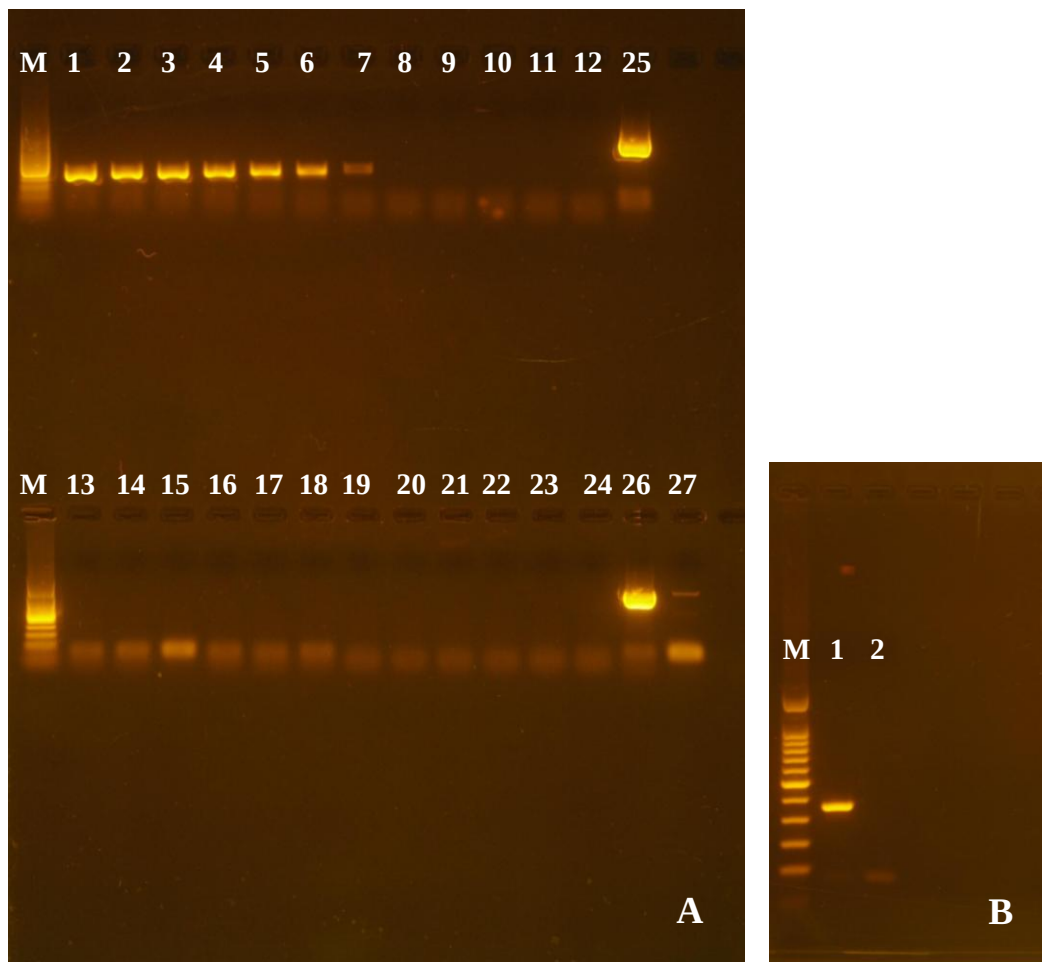


9. ábra A GaUF/GaHR hőmérséklet grádiens PCR eredménye az EKF55 *Lb. gasseri* törzs DNS-ével, az E8F/E1115R ellenőrző PCR-rel kiegészítve. M: 100 bp Benchtop Ladder. Az annealing hőmérsékletek: 1: 50 °C, 2: 51,9 °C, 3: 53,8 °C, 4: 55,7 °C, 5: 57,5 °C, 6: 59,2 °C, 7: 60,8 °C, 8: 62,5 °C, 9: 64,3 °C, 10: 66,2 °C, 11: 68,1 °C, 12: 70,0 °C. 13: GaUF/GaHR NTC 50 °C-on. 14: E8F/E1115R termék 64,3 °C-on, 15: E8F/E1115R NTC 50 °C-on. A gélelektroforézist 1%-os agaróz gélen végeztük, 120V feszültségen 30 percig. A gélre 5 µl mintát vittünk fel.



10. ábra A GaUF/GaHR hőmérséklet grádiens PCR eredménye az EKF52 *Lb. gasseri* törzs DNS-ével, az E8F/E1115R ellenőrző PCR-rel kiegészítve. M: 100 bp Benchtop Ladder. Az annealing hőmérsékletek: 1: 50 °C, 2: 51,9 °C, 3: 53,8 °C, 4: 55,7 °C, 5: 57,5 °C, 6: 59,2 °C, 7: 60,8 °C, 8: 62,5 °C, 9: 64,3 °C, 10: 66,2 °C, 11: 68,1 °C, 12: 70,0 °C. 13: GaUF/GaHR NTC 50 °C-on. 14: E8F/E1115R termék 64,3 °C-on, 15: E8F/E1115R NTC 50 °C-on. A gélelektroforézist 1%-os agaróz gélen végeztük, 120V feszültségen 30 percig. A gélre 5 µl mintát vittünk fel.

Mivel a fenti kísérletek eredménytelenek lettek, az EKF54 és EKF57 jelű *Lb. gasseri* izolátumokkal is elvégeztük a hőmérséklet grádiens kísérleteket. Az EKF54 izolátum pozitív jelet adott (11A. ábra), ezért a következő lépésben kiválasztottuk az 55 °C-ot, mint optimálisnak tűnő annealing hőmérsékletet, és így végeztünk el egy megerősítő PCR reakciót, amely szintén sikeres lett (11B ábra).

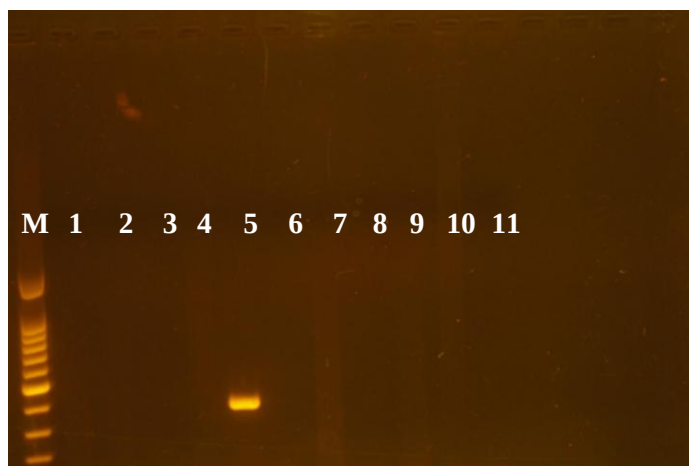


11A. ábra A GaUF/GaHR hőmérséklet grádiens PCR eredménye az EKF54 és EKF57 jelű *Lb. gasseri* törzsek DNS-ével, az E8F/E1115R ellenőrző PCR-rel kiegészítve. M: 100 bp Benchtop Ladder. Felső sor: EKF54 DNS. Az annealing hőmérsékletek: 1: 50 °C, 2: 51,9 °C, 3: 53,8 °C, 4: 55,7 °C, 5: 57,5 °C, 6: 59,2 °C, 7: 60,8 °C, 8: 62,5 °C, 9: 64,3 °C, 10: 66,2 °C, 11: 68,1 °C, 12: 70,0 °C. 25: EKF54 E8F/E1115R kontroll PCR. Alsó sor: EKF57 DNS. Az annealing hőmérsékletek: 13: 50 °C, 14: 51,9 °C, 15: 53,8 °C, 16: 55,7 °C, 17: 57,5 °C, 18: 59,2 °C, 19: 60,8 °C, 20: 62,5 °C, 21: 64,3 °C, 22: 66,2 °C, 23: 68,1 °C, 24: 70,0 °C. 26: EKF57 E8F/E1115R kontroll PCR, 27: GaUF/GaHR NTC.

11B. ábra GaUF/GaHR PCR eredménye 55 °C-os feltapadási hőmérsékleten az EKF 54 jelű *Lb. gasseri* DNS-sel. M. 100 bp Benchtop Ladder, 1: EKF54 DNS, 2: GaUF/GaHR NTC.

A gélelektroforézist 1%-os agaróz gélen végeztük, 120V feszültségen 30 percig. A géltre 5 µl mintát vittünk fel.

A sikeres kísérletek követően az összes, szájból izolált baktérium DNS-ével, valamint az EKF127 jelű *Lb. reuteri* (DSMZ 17938) törzs DNS-ével is elvégeztük a PCR reakciót 55 °C-os annealing hőmérsékleten. Az eredmények sajnos nem igazolták várakozásainkat, mert csak az EKF54 jelű *Lb. gasseri* DNS adott terméket, a többi baktérium közül egyik törzs sem (12. ábra).



12. ábra GaUF/GaHR PCR eredménye 55 °C-os feltapadási hőmérsékleten a szájból izolált baktériumok és a DSMZ17938 *Lb. reuteri* DNS-ével. M. 100 bp Benchtop Ladder, 1: EKF50, 2: EKF51, 3: EKF52, 4: EKF53, 5: EKF54, 6: EKF55, 7: EKF56, 8: EKF57, 9: EKF58, 10: DSMZ17938 *Lb. reuteri*, 11: GaUF/GaHR NTC. A gélelektroforézist 1%-os agaróz gélen végeztük, 120V feszültségen 30 percig. A gélre 5 µl mintát vittünk fel.

A cikkben leírtakat nem sikerült esetünkben igazolni, vagyis az azonos élőhelyről izolált baktériumok között sem sikerült kimutatni ugyanazon gén jelenlétét. Mindazonáltal, a szájüreg kevésbé kedvező élőhely a baktériumok számára, mint a vastagbél, hiszen a vastagbélhez viszonyítva a többnyire állandó hőmérséklettől eltekintve sokféle hatás éri a szájat (különböző ételek, italok pH módosító hatása, fűszerek, fogmosás és szájvíz) és a baktérium populáció sűrűsége sem éri el a béltartalomban mért értékeket, amelyek igen jelentősek lehetnek, akár 10^{12} baktérium is lehet a vastagbél tartalom egyetlen grammjában (Anuradha & Rajeshwari, 2005). Ezek a hatások pedig mind akadályozzák, hogy a különböző fajhoz tartozó baktériumok azonos géneket hordozzanak.

Amennyiben ilyen esettel találkozunk, akkor valószínűleg horizontális géntranszfer esete forog fenn. A bakteriocin termelés előnyt jelent a táplálékért és élőhelyért folytatott harcban a tejsavtermelő mikrobák számára, hiszen akár a közelrokon fajokat (szűk spektrumú), akár patogén törzseket (tág spektrumú bakteriocin) képesek gátolni ezáltal.

6. Összefoglalás

A tejsav baktériumok régóta ismert, az emberiség által számos fermentációs folyamatban használt mikrobák. Nem csupán az erjesztett élelmiszerek előállításában segédkeznek, hanem az egészség megőrzésében is aktív szerepet játszanak, miként azt már számos kutatás megállapította. Egészségmegőrző – és védő szerepüket annak köszönhetik, hogy a patogén baktériumok és gombák ellen képesek eredményesen fellépni a vastagbélben. Ezt egyrészt szerves savak (pl. tejsav, rövid szénláncú zsírsavak) termelésével érik el, amelynek köszönhetően a béltartalom pH-ja lecsökken, és ezt nem tolerálja túl jól a legtöbb mikroba, másrészt antagonisztikus hatású fehérjéket, ún. bakteriocineket termelnek.

Számos baktériumról derült ki az elmúlt közel 70 év során, hogy bakteriocineket termelnek, de csak az utóbbi két-három évtizedben indult meg a nagyarányú kutatás ezen anyagok bioszintézisének és hatásaik felderítésének céljából. Mivel az antibiotikumok nem megfelelő használata (rezisztencia kialakulása) és az antibiotikum-kutatások visszaesése miatt egyre komolyabb veszélyt jelentenek a kórokozó mikroorganizmusok, nagy szerepe lehet azoknak a bakteriocin készítményeknek, amelyek sikeresen alkalmazhatóak a veszélyesebb kórokozók ellen.

A *Lb. gasseri* törzsekről már több cikk is napvilágot látott, amelyekben leírták ezen törzsek bakteriocin termelő képességét, és közölték a termelő gének azonosítására használható primerek szekvenciáit. Munkám során szájból izolált *Lactobacillus* törzsek között kerestem *Lb. gasseri* izolátumokat és az alábbi célokat sikerült megvalósítanom:

1. Szájüregből izoláltam *Lactobacillus* fajokat, amelyek közül több *Lb. gasseri*-nek bizonyult. Kutatásaimat irodalmi adatok alapján kezdtem el, amelyek szerint a *Lb. gasseri* állandósultnak mondható kolóniákat képez az emberi tápcsatorna majdnem minden szakaszában.
2. Az izolátumokat szekvenálás segítségével azonosítottam. A 16S rDNS-re specifikus E8F/E1115R primerpárok segítségével amplifikáltam azt a terméket, amelynek szekvenálása lehetővé tette az izolátumok fajsztípus meghatározását és elkülönítését.
3. Kimutattam, hogy több, általam izolált *Lb. gasseri* törzs fejt ki gátló hatást más baktériumokra. A legerőteljesebb gátlást szintén egy *Lb. gasseri* törzs, az EKF52 fejtette ki. A PCR kísérletek során nem sikerült azonosítani az általunk vizsgált

három gén (gassericin-K7A, gassericin-K7B és gassericin-A) egyikét sem ebben a törzsben, ezért lehet, hogy csupán a törzs erőteljes szerves sav termelésének köszönhető az intenzív gátlás.

4. A PCR kísérletek során három *Lb. gasseri* izolátumban sikerült kimutatnom bakteriocin gén jelenlétét. A BojA/858left primerpárral a gassericin-K7A klasztert találtam meg az EKF55 és EKF58 jelű törzsekben, míg a GaUF/GaHR primerpárral a gassericin-A jelenlétét mutattam ki az EKF54 jelű törzsben. A többi *Lb. gasseri*-ben nem találtam bakteriocin géneket és az egyéb izolátumokban sem (5. táblázat).

5. táblázat Az izolátumok antagonista hatása és az azonosított gassericin gének

Teszt törzsek	Termelő törzsek								
	EKF 50	EKF 51	EKF 52	EKF 53	EKF 54	EKF 55	EKF 56	EKF 57	EKF 58
<i>E. coli</i>	++	+	+++	++	++	+	+	+++	-
<i>Lb. casei</i>	+++	+	+++	-	+++	-	++	+	-
<i>Lb. zeae</i>	++	-	++	+	++	-	++	++	-
Gassericin gének									
<i>gassericin-K7A klaszter</i>						van			van
<i>gassericin-K7B klaszter</i>									
<i>gassericin A</i>					van				

Kísérletem eredményei alapján véleményem szerint érdemes lenne további *Lb. gasseri* és más *Lactobacillus* törzseket izolálni önkéntesek szájüregéből, hiszen a bakteriocin gének olyan jellegű megoszlásáról, amelyeket tapasztaltam, még nem született felmérés.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni **dr. Kiss Attila** tanár úrnak, az Élelmiszertudományi Intézet főigazgatójának és **dr. Naár Zoltán** tanár úrnak, a Mikrobiológiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék tanszékvezetőjének, hogy kísérleteimet elvégezhettem a mikrobiológiai és molekuláris biológiai laboratóriumokban.

Sok köszönettel tartozom **Szén Orsolyának**, a Molekuláris Biológia Laboratórium munkatársának a rengeteg segítségért, amellyel a mikrobiológiai és molekuláris biológiai munkák során támogatott.

Köszönöm **Fejes Zsuzsannának** és **Hilyákné Kadlott Máriának**, a Mikrobiológiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék munkatársainak a segítségét.

Szeretném megköszönni az önkéntes mintaadóknak, hogy ezúton is hozzájárultak munkám sikeréhez.

Végül, de nem utolsósorban, köszönöm **dr. Pál Károlynak**, a Mikrobiológiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék kutatójának a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségét.

Irodalomjegyzék

Anuradha S., Rajeshwari K. (2005). Probiotics in health and disease. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine* 6:67-72.

Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55:541–555.

Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. (2000). Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50:117-131.

Daba H., Pandian S., Gosselin J.F., Simard R.E., Huang J., Lacroix C. (1991): Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:3450-3455.

Dal Bello F., Hertel C. (2006). Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. *Systematic and Applied Microbiology*, 29:69–76.

Gibson G.R., Wang X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 77:412-420.

Hansen J.N. (1993). The molecular biology of nisin and its structural analogues, 93- 119. p. In: Hoover D.G., Stevenson L.R. (eds.): Bacteriocins of lactic acid bacteria. San Diego, California: Academic Press, INC., 265 p.

Harlander S.K. (1993). Regulatory aspects of bacteriocin use, 233-249. In: Hoover D. G., Steenson L. R. (eds.): Bacteriocins of lactic acid bacteria. San Diego, California: Academic Press, Inc., 265 p.

Jimenez-Diaz R., Ruiz-Barba J.L., Cathcart D.P., Holo H., Nes I.F., Sletten K.H., Warner P.J. (1995): Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin 126 produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the

complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:4459-4463.

Kawai Y., Saito T., Suzuki M., Itoh T. (1998). Sequence analysis by cloning of the structural gene of gassericin A, a hydrophobic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62:887-892.

Kawai Y., Ishii Y., Koichiro U., Kitazawa H., Saito T., Itoh T: (2001). *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiology*, 18:407-415.

Kun Sz. (2008). Nem tejalapú probiotikus élelmiszerek előállítási lehetőségeinek megalapozása. Doktori értekezés.

Makras L., De Vuyst L. (2006). The *in vitro* inhibition of Gram-positive pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal*, 16:1049-1057.

Montville T.J., Kaiser A.L. (1993). Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins, pp.1-22. In Hoover D.G., Stevenson L.R. (eds.): Bacteriocins of lactic acid bacteria (Food science and Technology), San Diego, California: Academic Press, INC 265. p.

Peternel M.Z., Majhenic A.C., Holo H., Nes I.F., Salehian Z., Berlec A., Rogelj I. (2010). Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2:233–240.

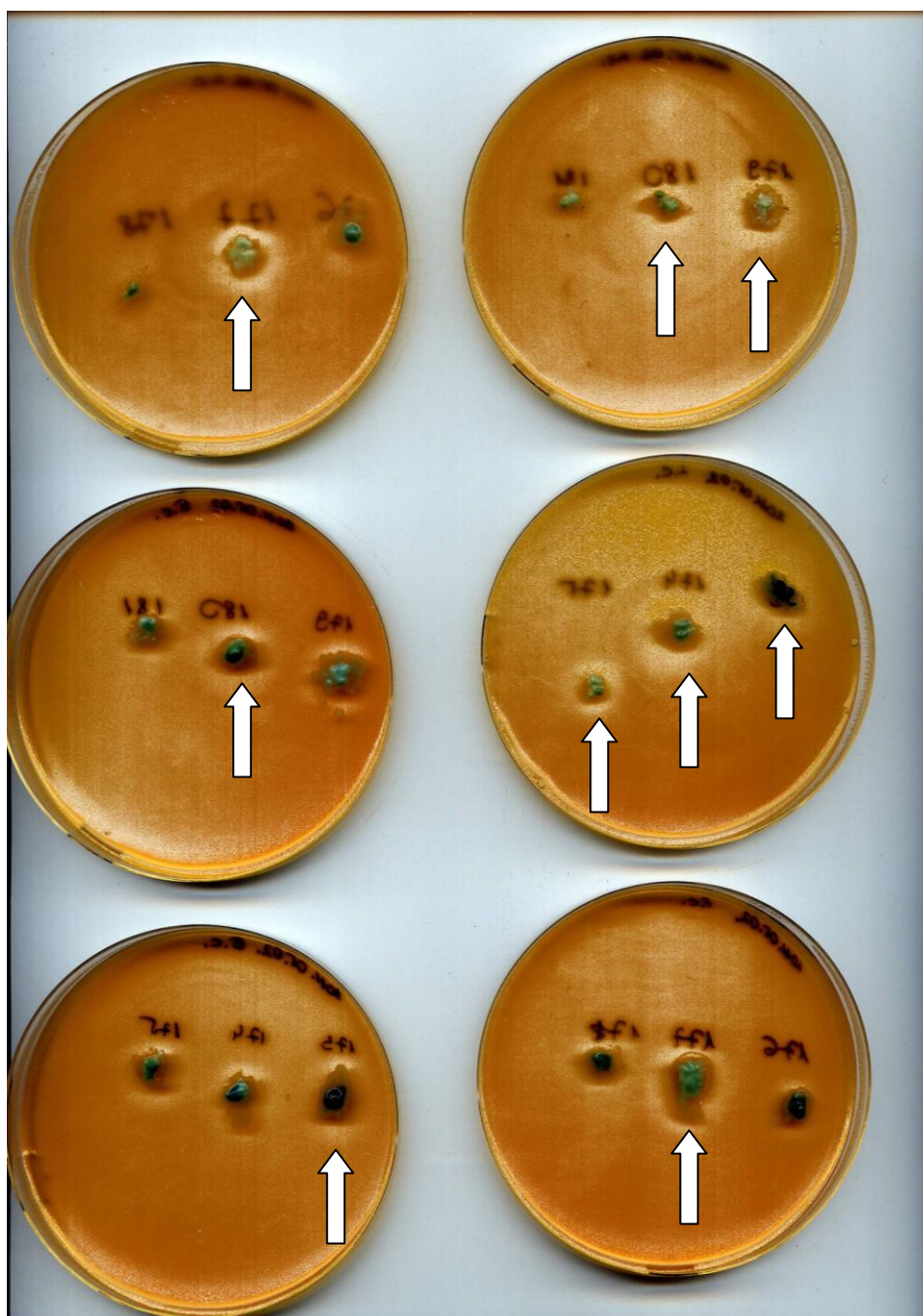
Reuter G. (2001). The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2:43-53.

Servin A.L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28:405-440.

Vandenbergh P.A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 12:221-238.

Zhu W.M., Liu W., Wu D.Q. (2000). Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *Journal of Applied Microbiology*, 88:877-886.

1. melléklet



Gátlási zónák vizsgálata. Fehér nyilak jelölik a jelentősebb feltisztulási zónákat, amelyek szerves sav és/vagy bakteriocin termelésre utalnak.

Nyilatkozat

Alulírott Juhász Emőke, büntetőjogi felelősségem tudatában kijelentem, hogy az általam benyújtott, Tejsav baktériumok bakteriocin termelő képességének vizsgálata című TDK dolgozat önálló szellemi termékem. Amennyiben mások munkáját felhasználtam, azokra megfelelően hivatkozom, beleértve a nyomtatott és az internetes forrásokat is.

Aláírással igazolom, hogy az elektronikusan feltöltött és a papíralapú szakdolgozatom formai és tartalmi szempontból mindenben megegyezik.

Eger, 2012.06.16.

Juhász Emőke