

36. OTDK Biológia Szekció

A T-2 toxin hatása a gombatermesztésre

Szerző:

Bélteki Dorka

Biológus mesterszakos hallgató

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Vajna Balázs habilitált adjunktus



Tartalomjegyzék

Absztrakt	3
Bevezetés.....	4
Célkitűzések	5
Anyagok és módszerek.....	6
Toxin-kezelés és mintavétel	6
A terméshozamok összehasonlítása, a termőtestek toxintartalmának vizsgálata és a toxin sorsának nyomonkövetése	7
Enzimaktivitás-mérés	7
Mikrobiális közösségek összetételének vizsgálata	9
A molekuláris munkák adatainak feldolgozása, elemzése	10
Eredmények és megvitatásuk	11
A terméshozamok összehasonlítása, a termőtestek toxintartalmának vizsgálata és a toxin sorsának nyomonkövetése	11
Enzimaktivitás	13
Mikrobiális közösség összetétele.....	14
Összefoglalás.....	16
Köszönetnyilvánítás	19
Irodalomjegyzék.....	20

Absztrakt

A mikotoxinok gombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, amelyek bekerülve az élelmiszerekbe vagy takarmányokba komoly egészségügyi és gazdasági kockázatot jelentenek. Kutatásunk célja az volt, hogy megtudjuk, milyen hatása van a trichotecének közé tartozó T-2 toxinnak a fehér csiperke (*Agaricus bisporus*) termesztésére. Vizsgáltuk, hogy a kezelés hogyan befolyásolja a termés hozamot, hogy a toxin bekerül-e a termőtestbe, valamint, hogy a toxin stabilan jelen van-e a termesztés során, vagy elbomlik. Az általam is végzett vizsgálatok során összehasonlítottuk a kezelt és kezeletlen minták baktérium- és gombaközösségét DNS és RNS szinten 16S rRNS gén, illetve ITS régió alapján. Másrészt megvizsgáltuk a mintákban található lignocellulóz-bontó enzimek aktivitását is. Különbségeket kerestünk a kezelt és kontroll minták között, valamint a termesztési fázisok között is. A toxin nem befolyásolta szignifikánsan a termés hozamot, valamint a termőtestbe sem került bele egészségügyi határérték feletti mennyiség a toxinból. A komposzt bakteriális közösségről elmondható, hogy a közösség összetételében sokkal nagyobb eltérés van a kiindulási szakasz és az I. terméshullám között, mint a toxinnal kezelt és a kezeletlen minták között. Hasonló trendet figyeltünk meg az enzimaktivitások összehasonlítása során is. Dolgozatomban körüljáróm, hogy mi lehet az oka, hogy látszólag nincs nyilvánvaló toxinhatás.

Bevezetés

A mikotoxinok komoly humán és állategészségügyi kockázatot jelentenek világszerte. Ennek oka, hogy könnyedén belekerülhetnek az élelmiszerek, illetve takarmányok alapanyagaiba, és rendkívül stabil szerkezetüknek hála a feldolgozás során sem bomlanak el és a késztermékben is változatlanul jelen vannak. Nagy dózisban fogyasztva ugyan okozhatnak akut mérgezést, azonban elsősorban hosszútávú kitétség esetén fejtik ki káros hatásukat a különböző szervekre, szervrendszerekre. A mikotoxinok nem alkotnak egy egységes csoportot, több száz molekula tartozik ide, amelyek változatos szerkezettel rendelkeznek, így élettani hatásai is eltérők. A szakirodalom alapvetően hat nagy csoportot különböztet meg: aflatoxinok, trichotecének, zearalenon, fumonizinek, ochratoxinok, és patulin (Alshannaq & Yu, 2017).

A mikotoxinok gombák másodlagos anyagcseretermékei. A legtöbb gondot az *Aspergillus*, a *Fusarium* és a *Penicillium* nemzetségek okozzák, innen kerül ki a legtöbb toxintermelő faj. Fontos megjegyezni, hogy egy faj akár többféle toxin előállítására is képes, azonban ezeknek a termelése csak bizonyos környezeti, ökológiai hatásokra következik be. A *Fusarium* fajok, amik a fumonizineket, a zearalenont és a trichotecéneket, köztük a T-2 toxint termelik, elsősorban gabonafélék élő szöveit kolonizálják a szántóföldön. Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetség tagjai pedig inkább a helytelen tárolás következtében fertőzi meg az élelmiszert és a takarmányt (Alshannaq & Yu, 2017).

A kutatásunk során azt vizsgáltuk, hogy milyen következményei lehetnek, ha mikotoxin kerülne a gombák termesztőközegébe. A csiperke (*Agaricus bisporus*) termesztéséhez használt komposzt hazánkban nagyrészt búzaszalmából készül, amely fertőzött lehet *Fusarium* fajokkal, illetve a hozzáadott ló- és csirketrágya nem csak a csiperkének biztosít nitrogénforrást, hanem a helytelen tárolás során esetlegesen bekerülő *Aspergillus* és *Penicillium* fajoknak is kedvezhet. Továbbá a mikotoxinok gyakran koncentrálnak az élelmiszerek gyártása során indirekt módon keletkező melléktermékekbe (Pinotti et al., 2016). Ilyen növényi hulladékokat pedig világszerte alkalmaznak a laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) termesztésére. Ezek alapján elmondható, hogy a mikotoxinok jelenléte a gombatermesztésre is kockázatot jelenthet, azonban ennek a kockázatnak a mértékéről jelenleg nincs elegendő információnk.

Célkitűzések

A kísérletünk során a trichotecének közé tartozó T-2 toxint juttattunk mesterségesen csiperke (*Agaricus bisporus*) és laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) termesztőközegbe. A fő kérdéseink a következők voltak: hogyan befolyásolta a toxinos kezelés a termés hozamot? Bekerült-e a toxin a termőtestbe, ezáltal jelent-e élelmiszerbiztonsági kockázatot a fogyasztókra nézve? Általánosságban mi lett a toxin sorsa a komposztban, stabilan jelen volt-e a termesztés során, vagy elbomlott? Hogy az utóbbi háttérben álló folyamatokba mélyebb betekintést nyerjünk, megvizsgáltuk, hogy a gombák lignocellulóz-bontó enzimeinek aktivitásában okozott-e változást a toxin. Továbbá összehasonlítottuk a termesztőközegek mikrobiális közösségét DNS és RNS szinten 16S rRNS gén, illetve ITS régió alapján. A dolgozatomban a csiperkegombával (*Agaricus bisporus*) kapcsolatos eredményeinket szeretném bemutatni. Ezen belül az enzimaktivitás mérésekre és a nukleinsav alapú munkákra fektetném a hangsúlyt, mivel ezeknek az elvégzésében vettem részt.

Anyagok és módszerek

Toxin-kezelés és mintavétel

A csiperketermesztés komposzton történik. A komposzt búzaszalma (40-50%), lótrágya (20-25%), csirketrágya (10-15%) és gipsz (5-10%) keverékéből áll. Az első fázis során összekeverik az alapanyagokat és rendszeres átforgatás mellett komposztálják. A második fázisban történik a hőkezelés, majd kondicionálás. Ezt követi a gombacsírával, azaz micéliummal bevont gabonaszemekkel való beoltás és a komposzt átszövetése. Ezt az átszövetett komposztot nevezzük harmadik fázisú komposztnak (Kabel et al., 2017). Ez a kész, harmadik fázisú komposzt kerül a termesztőkhöz, és ezt használtuk fel a kísérletünkben is.

A toxin termeltetéséhez a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet szakemberei rizsszemeket szövettek át egy toxintermelő *Fusarium sporotrichioides* törzsszel, ami az alkalmazott körülmények között T2-toxint és HT2-toxint is termelt. A toxinos rizst autoklávban sterilizálták és darálással homogenizálták. A kísérletünk során harmadik fázisú fehér csiperke komposzthoz adtuk ezt a keveréket. Az ilyen módon kezelt zsákokban a bemérési koncentrációknak megfelelően 10920 µg/kg T2-toxin és 2420 µg/kg HT2-toxin volt.

A toxinnal kezelt (T jelöléssel) és a kontroll (K jelöléssel) komposztból is 12-12 párhuzamos zsák került elhelyezésre a termesztő helyiségen belül hármas egységekben. A hőmérséklet, a páratartalom és a levegő CO₂ koncentrációja a normál protokoll szerint volt beállítva a termesztés során.

A termés hozamok összehasonlításához, a termőtestek toxintartalmának vizsgálatára a párhuzamosokból 9 zsák lett összesen felhasználva kezelésenként. Az enzim méréshez és a mikrobiális közösség összetételének elemzéséhez ezek közül 3-3 párhuzamos zsákból vettünk mintát a termesztés különböző szakaszaiban (ami nem keverendő össze a komposzt készítés fázisaival). Vettünk mintát a bekevert, kiindulási szakaszból (0-ás jelöléssel), az I. terméshullám során (1-es jelöléssel) és a II. terméshullám során (2-es jelöléssel); azonban ez utóbbi esetén a termés hozam és a toxinkoncentráció is olyan alacsony volt, hogy csak a kiindulási szakaszra és az I. terméshullámra fókuszáltunk inkább. A toxin sorsának nyomonkövetésére a maradék 3-3 zsákot használták fel.

NÉV	KEZELÉS	SZAKASZ	
FK10D	kontroll	kiindulási	D
FK30D	kontroll	kiindulási	D
FK50D	kontroll	kiindulási	D
FK30R	kontroll	kiindulási	R
FK50R	kontroll	kiindulási	R
FT10D	toxinos	kiindulási	D
FT30D	toxinos	kiindulási	D
FT50D	toxinos	kiindulási	D
FT10R	toxinos	kiindulási	R
FT30R	toxinos	kiindulási	R
FT50R	toxinos	kiindulási	R
FK11D	kontroll	I. terméshullám	D
FK31D	kontroll	I. terméshullám	D
FK51D	kontroll	I. terméshullám	D
FK11R	kontroll	I. terméshullám	R
FK31R	kontroll	I. terméshullám	R
FK51R	kontroll	I. terméshullám	R
FT31D	toxinos	I. terméshullám	D
FT51D	toxinos	I. terméshullám	D
FT31R	toxinos	I. terméshullám	R
FT51R	toxinos	I. terméshullám	R

1. táblázat: az általunk vett minták nevei és a rövidítések feloldása. Az 1, 3, 5-ös számok a párhuzamosokat jelölik

A terméshozamok összehasonlítása, a termőtestek toxintartalmának vizsgálata és a toxin sorsának nyomonkövetése

A kezelt és kezeletlen komposzt terméshozamát az első terméshullám során leszűretelt termőtestek összömege alapján hasonlították össze a MATE, Kertészettudományi Intézet szakemberei. A T2-toxinnak és bomlástermékeinek a koncentrációját a MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet szakemberei mérték meg a termőtestben, továbbá a komposztból vett mintákban is.

Enzimaktivitás-mérés

A fehér csiperke (*Agaricus bisporus*) szaprotróf gomba, elhalt növényi részekből szerzi a számára szükséges tápanyagokat. Ezeknek - a termeszőközeget is alkotó – növényi szöveteknek jelentős részét teszik ki a különféle sejtfalstruktúrák. A növényi sejtfal főképp

cellulózból, hemicellulózból (pl. xilán) és ligninből áll. Ezeket a poliszacharidokat elsősorban extracelluláris enzimek bontják le (Kabel et al., 2017). Mivel ezek az enzimek sejten kívül is stabilak, hiszen ezt követeli meg a funkciójuk, viszonylag könnyedén ki tudtuk őket vonni a mintákból: 2 órán át rázattunk 3 g mintát 48 ml foszfát-pufferben (50 mM, pH=7) 10 °C-on, majd ezt a kivonatot használtuk fel a mérésekhez. Az enzimaktivitás vizsgálatokat különböző mesterséges, kromogén szubsztrátokkal végeztük, a keletkező termékek koncentrációját pedig spektrofotométer (Sunrise, Tecan, microplate reader) segítségével határoztuk meg. A méréseket (Bánfi et al., 2015) leírása alapján végeztük. Összesen 8 enzimmal foglalkoztunk: endoglukanáz, endoxilanáz, β -glükózidáz, cellobióz-hidroláz, xilozidáz, exokitináz és mangán-peroxidáz. A cellulóz lebontása során az endoglukanáz 1-4 glükozidos kötéseket hidrolizál véletlenszerűen a polimeren belül. Az így létrejött rövidebb láncok hozzáférhetővé válnak a cellobióz-hidroláz számára, amely cellobióz egységeket hasít le a láncok végéről, illetve a β -glükózidáz számára, ami pedig glükóz egységeket hasít le, szintén a láncok végéről. A hemicellulóz bontásában az endoxilanáz vesz részt az 1-4 kötések hidrolizálásával a xilán láncon belül. Az így keletkezett rövidebb láncok végéről a xilozidáz hasít le xilóz egységeket. A lignin aromás összetevőinek eloxidálását többek között a mangán-peroxidáz katalizálja. Mindezek mellett egy kitin-bontó enzim – exokitináz, másnéven N-acetil-glükózaminidáz – aktivitását is mértük.

Az endoglukanáz és az endoxilanáz aktivitásának mérése Azo festékkel jelölt karboxi-metil-cellulóz és xilán kromogén szubsztrátok segítségével történt. Az inkubáció (2 h, 40 °C) után precipitáló oldattal (pH 5.0; 470 mM Na-acetát, 100 mM cink-acetát, etanolban feloldva) lett megállítva a reakció, majd egy centrifugálást (10 min, 10000 g) követően 595 nm-en mértünk abszorbanciát.

A β -glükózidáz, a cellobióz-hidroláz, a xilozidáz, és az exokitináz enzimekhez p-nitrofenil – glükozid/cellobiozid/xilozid/N-acetil-glükózaminid szubsztrátokat használtunk. A reakciót NaCO_3 (0,5M) hozzáadásával állítottuk le pár perc, illetve 2 óra inkubáció (40 °C) után. Az abszorbanciát 405 nm-en mértük. A hosszú és a rövid inkubáció méréseinek különbségét használtuk fel a számolásainkhoz.

A mangán-peroxidáz aktivitását DMAB (3,3-dimetilaminobenzoészav), és MBTH (3-metil-2-benzothiazolinon-hidrazon) oxidációjával mértük. Az eredményeket korrigáltuk mangánt nem tartalmazó reakcióoldatra kapott aktivitás levonásával. A méréskor egy görbét vettünk fel: 3 percen keresztül 30 másodpercenként mértünk abszorbanciát 590 nm-en.

Tudjuk Valášková és Baldrian, 2006-os cikke alapján, hogy a minták lefagyasztása, majd későbbi felolvasztása befolyásolja az enzimeket: általában csökken a mérhető enzimaktivitás. Hogy ezt a problémát kiküszöböljük, összeállítottunk egy mérést, amely során megfigyeltük, hogyan változik az enzimaktivitás a fagyasztás hatására. A minták nagyüzemi gombatermesztésből származtak. 3-3 párhuzamos mintát vettünk III. fázisú csiperkekomposztból (kiindulási szakasz), majd az I. terméshullám és II. terméshullám alatt is. Még a mintavétel napján elvégeztük az enzimaktivitás méréseket, majd a mintákat lefagyasztottuk. 4 hónap és 20 nap -80 °C -on való tárolás után újra lemértük az enzimaktivitást. A fagyasztott minták értékeit az eredeti értékek függvényében ábrázolva csökkenést tapasztaltunk. Ezt figyelembe véve az adatpontokra illesztett egyenesek meredekségeivel korrigáltuk a kísérlet során mért adatainkat.

Az adatainkról főkomponens-elemzést a Past 4.07b verzió (Hammer, 1999-2021.) segítségével végeztünk.

Mikrobiális közösségek összetételének vizsgálata

Kíváncsiak voltunk, hogyan hatott a toxin-kezelés a komposztban élő baktériumokra, mikrogombákra és archeákra, ezért megvizsgáltuk a minták mikrobiális közösségének összetételét DNS és RNS szinten. Úgy gondoljuk, hogy a DNS információt ad a jelenlévő fajok, nemzetségek diverzitásáról, azonban nem tesz különbséget az aktív és dormans sejtek között. Ezzel szemben a riboszomális RNS nagyobb mennyiségben kell, hogy jelen legyen a transzkripcionálisan aktív, intenzív metabolizmust folytató sejtek esetén.

A PowerSoil® Total RNA Isolation Kit-et használtuk az össz-nukleinsav kivonáshoz a mintáinkból. Az ehhez tartozó protokoll gyöngyös sejteltávolítást és egy fenol-kloroform-izoamil alkohol elegyet használó fázisszétválasztást tartalmaz a maximális hatékonyság érdekében. Számos tisztítási lépést követően végül egy szilika-oszlopról történő elúcióval nyerjük ki az RNS-t. Ennél a lépésnél kerül képbe a PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit, amelynek segítségével az oszlophoz kötött DNS is lemosható elkülönítve. Különösen fontosnak tartjuk, hogy az RNS és DNS kivonás is a mintáknak ugyanabból az 1 grammjából történt, hiszen bármennyire is törekedtünk a reprezentatív mintavételre, a gombatermesztő komposzt valójában egy nagyon heterogén közeg, és csak így lesz összehasonlítható egymással a mikrobiális összetétel RNS és DNS szinten.

Mivel a DNS-t és az RNS-t külön-külön akartuk vizsgálni, az RNS mintákat DNÁzzal kezeltük, hogy ne maradjon az oldatban DNS, hiszen az elúció során nem váltak el tökéletesen egymástól. A kezelés után ellenőrző PCR-t végeztünk, hogy valóban nem maradt-e felszaporítható mennyiségű DNS a mintában. Megfelelő tisztaság esetén az RNS-t átírtuk cDNS-sé a Thermo Scientific RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesys Kitje segítségével. A reverz transzkripciót is PCR-rel ellenőriztük, hogy valóban sikeres volt-e az átírás, azaz kaptunk-e PCR-terméket. A szekvenálni kívánt génszakaszok amplifikációja a DNS és a cDNS esetén is PCR-rel történt. Hogy csökkentsük a reakció esetleges torzító hatását az arányokra nézve, 3-3 párhuzamosat készítettünk Bacteria, Arhaea és Fungi primerekkel. Ezek a primerek a 16S rRNS marker gén egy részét szaporítják fel Bacteria és Archaea esetén, míg a Fungi primerek a 5,8S és 28S rRNS gén közötti ITS2 régiót. A PCR során Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) enzimmel végeztük az amplifikációt. Bacteria esetén B341F és 805R primer szettet, Archaea esetén A519F és A855R primereket (Klindworth et al., 2013), míg a Fungihoz ITS3_KYO2 (Toju et al., 2012) és ITS4 (White et al., 1990) primereket használtunk. A kész PCR-termékeket elküldtük Talajbiom kutató transzdiszciplináris kiválósági központba (Martonvásár), ahol az Illumina MiSeq szekvenálást végezték.

A molekuláris munkák adatainak feldolgozása, elemzése

A szekvenciákat a Seed szoftver v2.1.1-es verziójával dolgoztuk fel (Vetrovsky *et al.*, 2018). A feldolgozás menete a következő lépésekből állt: 1.) A forward és reverse szekvenciák illesztés majd a szekvenciák minőségi szűrése. 2.) A singleton szekvenciák eltávolítása 3.) Gombák esetén az ITS2 régió kivágása a hosszabb szekvenciából (ITS-extrakció) 4.) A 97%, vagy annál nagyobb hasonlósággal rendelkező szekvenciák OTU-kba (Operational Taxonomic Unit) csoportosítása és a kimérák eltávolítása a vsearch v2.15.0 használatával; 5.) Az OTU-reprezentáns szekvenciák azonosítása BLASTn v.2.5.0 segítségével az ARB-SILVA v138 (Bacteria esetén) adatbázist, illetve a UNITE v8.2 (gombák esetén) adatbázist felhasználva. 6.) Az OTU-táblázat elkészítése és a diverzitási indexek kiszámolása.

Hogy a statisztikai elemzésekhez minden minta ugyanannyi szekvenciát tartalmazzon a Bacteria szekvenciákból egy almintát készítettünk a legkisebb szekvenciaszámú mintához igazodva és ezzel dolgoztunk tovább. A Fungi esetén erre nem volt szükség, mivel nem végeztünk olyan elemzést, ami ezt megkívánta volna

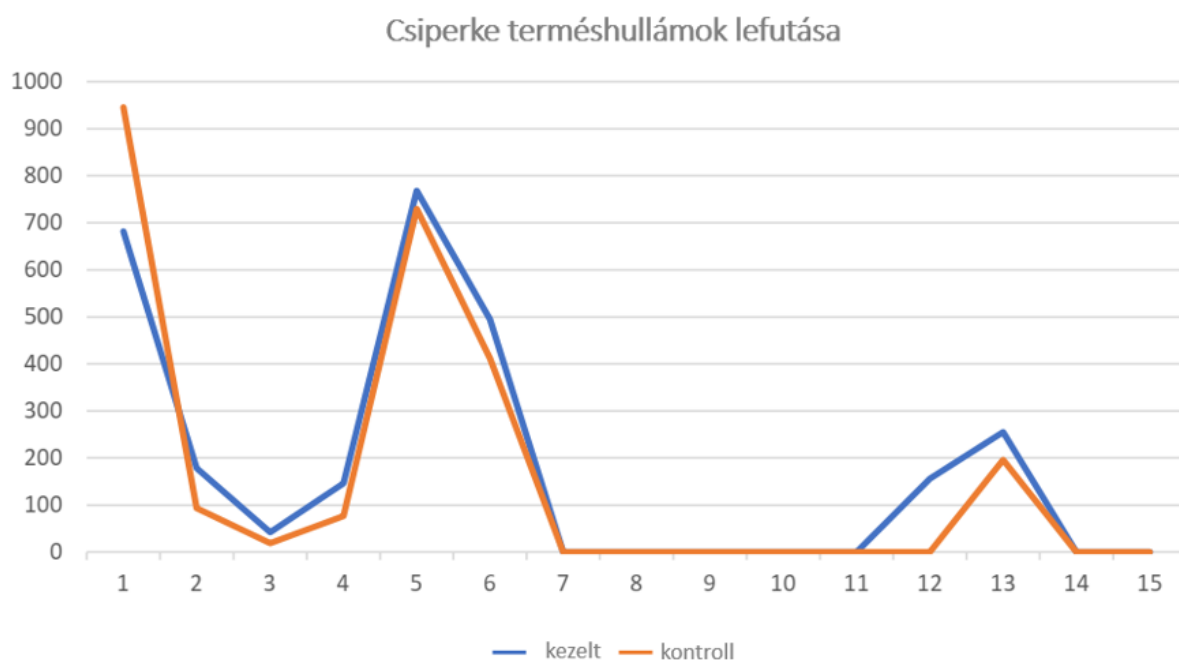
A baktérium közösségek filogenetikai összetételét az R szoftver ampvis2 csomagja segítségével jelenítettük meg (R Core Team, 2021, Andersen *et al.*, 2018).

Az NMDS elemzést (Non-metric multidimensional scaling) a Past 4.07b verzió (Hammer, 1999-2021.) segítségével végeztünk.

Eredmények és megvitatásuk

A terméshozamok összehasonlítása, a termőtestek toxintartalmának vizsgálata és a toxin sorsának nyomonkövetése

A leszüretelt termőtestek össz tömege kis szórással, átlagosan 2650-2750 g között volt a toxinnal kezelt és a kezeletlen mintákban is. Ez alapján kijelenthető, hogy a toxinos kezelés egyáltalán nem befolyásolta a terméshozamot. Emellett a terméshullámok lefutása sem tért el a toxinnal kezelt és a kontroll mintákban, ez jól látható az 1. ábrán.

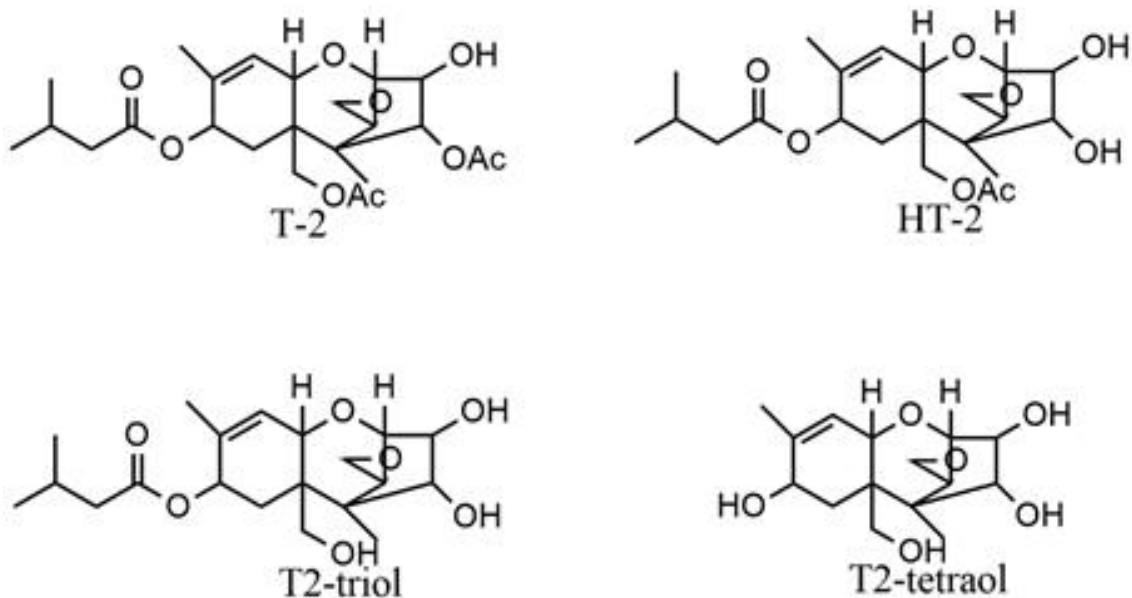


1. ábra: a naponta leszüretelt termőtestek tömege (Geösel András ábrája)

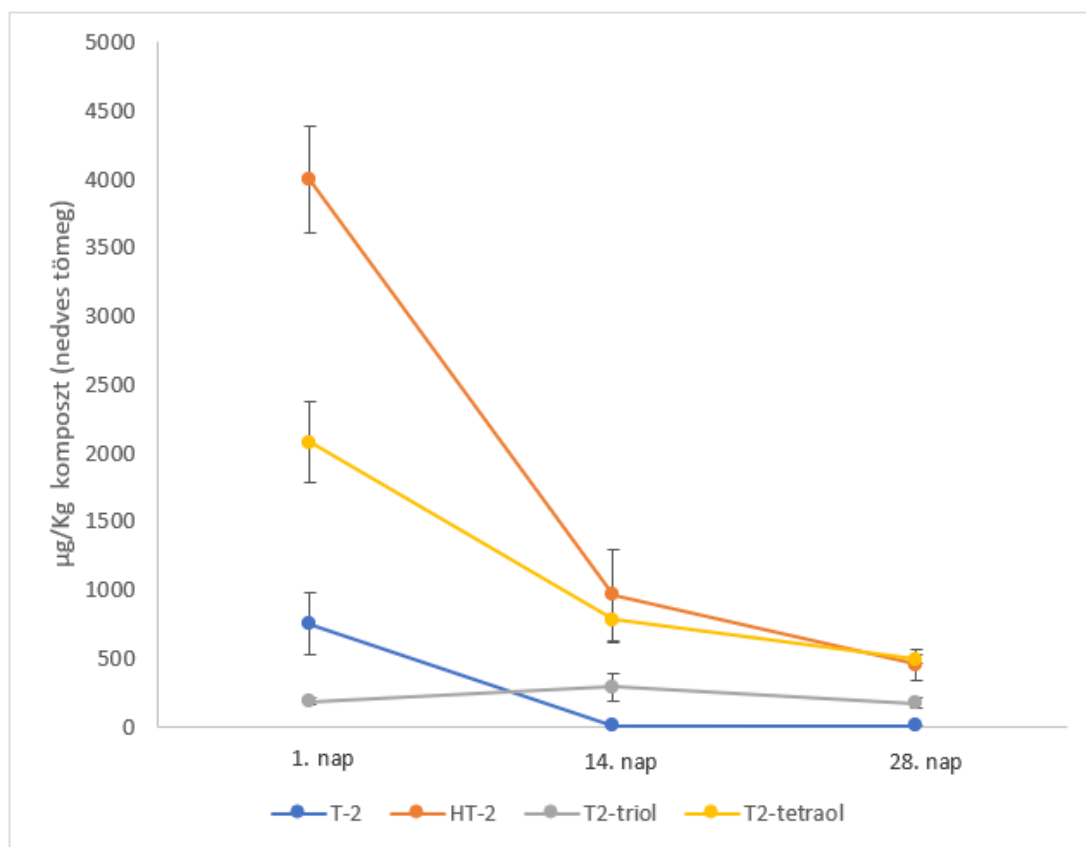
A toxintartalom a termőtestben minimális volt. A T2-toxint gyakorlatilag nem lehetett kimutatni. A HT2-toxin koncentrációja pedig 10-20 ng/g körül mozgott, nedves tömegre vonatkoztatva, ami jóval a megengedett határérték alatt van. Gabona késztermékekre 25-200 ug/kg-os határértékek vannak megszabva (Nébih, 2021.)

A komposzt toxintartalmát a termesztés során 3 mintavétellel követték nyomon. Az első a bekeverés után közvetlenül, a második a 14. napon, a harmadik a 28. napon történt, a terméshullámoknak megfelelően. A mérések azt mutatják, hogy a T2-toxin koncentrációja már

a kiindulási mintában kevesebb volt a bemérési koncentrációnál. Érdekes módon a HT2-toxin koncentrációja megemelkedett a bemérési koncentrációhoz képest. Ez összefüggésben állhat, a T2 hirtelen csökkenésével, hiszen a HT2 a T2 bomlásterméke. Mindkét toxin mennyisége a kiindulási szakaszt követően gyors ütemben csökkent, a második terméshullámra T2 gyakorlatilag nem volt kimutatható a rendszerből és HT2 is csak kis koncentrációban. A toxinok további bomlástermékei, a T2-triol és a T2-tetraol már a kiindulási mintában is jelen voltak, majd ezek mennyisége is hamar lecsökkent. Ez az eredmény nagyon különös, figyelembe véve, hogy az irodalom alapján a T2-toxin és a HT2-toxin is – a többi mikotoxinhoz hasonlóan – igen ellenálló molekulákként van számontartva. Alapvetően ez a stabilitás az, ami miatt jelentős élelmiszeripari kockázatot okoznak, hiszen nem bomlanak el a feldolgozási folyamatok során. Még nem tudjuk pontosan, hogy a kísérletünk során mi történt a toxinnal. Elképzelhető, hogy részben adszorbeálódott a komposztban jelenlévő szerves anyagok felszínén, továbbá, hogy spontán lebomlott, vagy a közegben élő mikroorganizmusok használták fel. Hogy jobban megértsük, hogy mi is történt, összeállítottunk egy kísérletet, mely során steril és nem steril komposztot hasonlítottunk össze, hogy mi történik bennük a hozzáadott, bekevert toxinnal, azonban ennek a kiértékelése még folyamatban van.



2. ábra: Varga Emese ábrája a T2-toxinról és bomlástermékeiről

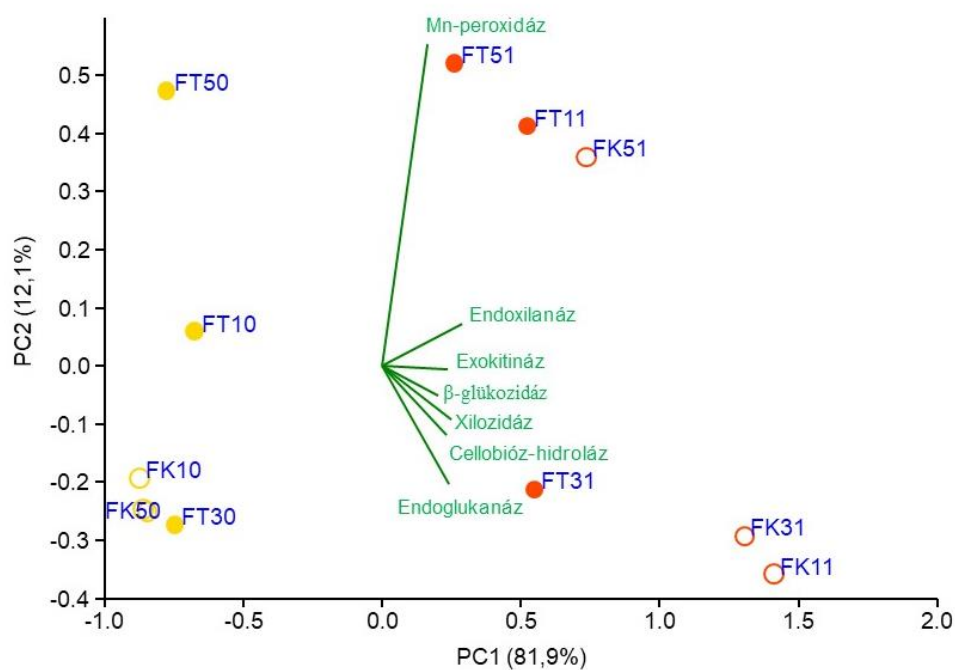


3. ábra: A T2-toxin és a HT2-toxin és bomlástermékeik, a T2-triol és a T2-tetraol koncentrációjának változása a csiperkekomposztban a termesztés időtartama során (Varga Emese ábrája).

Enzimaktivitás

Általánosságban elmondható, hogy a mérések alapján az I. terméshullám alatt jóval magasabb volt az enzimaktivitás minden esetben, mint a kiindulási mintákban. Az endoglukanáz, az endoxilanáz, a cellobióz-hidroláz és a xilozidáz esetében a kiindulási szakaszban mért enzimaktivitások értékei – még a fagyasztás miatti csökkenésre korrigálva is – minimálisak voltak. A β -glükózidáz és a kitin sejtfal átalakításában szerepet játszó N-acetil-glükózaminidáz, enzimek számottevő aktivitást mutattak már a kiindulási mintákban is, ám ezek továbbra is jóval alacsonyabbak voltak az I. hullám értékeinél. A mangán-peroxidáz, az előbbiekhöz hasonlóan, a kiindulási minták egy részében jelentős aktivitást mutatott, míg egy részében nem volt mérhető aktivitása. Valamilyen szinten itt is elválasztható a termesztés 2 szakasza egymástól, azonban a párhuzamos minták közötti óriási szórás miatt nem figyelhető meg egyértelmű tendencia. A cellulóz és hemicellulóz bontó enzimek aktivitása ugrásszerűen megnövekedése szorosan összefügg a termőtestek képzésével (Kabel et al., 2017).

Összességében elmondható, hogy a kiindulási minták jól elkülöníthetők az I. hullám mintáitól, azonban nem figyelhető meg semmilyen szétválás a toxin kezelés hatására.

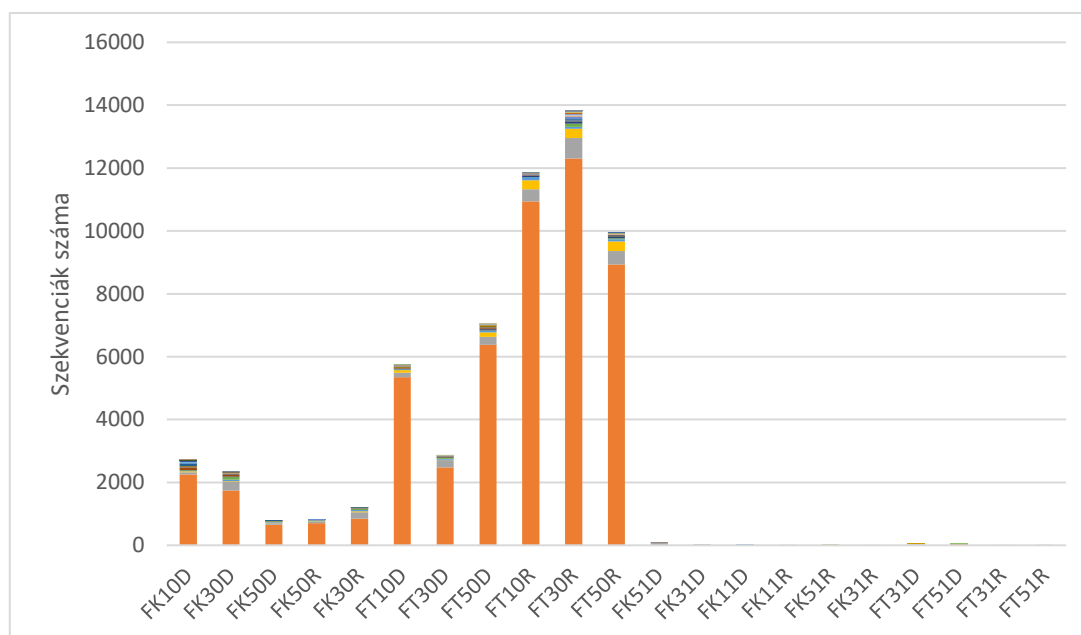


4. ábra: a minták enzimaktivitásai alapján készült főkomponens elemzés. Látható, hogy elválnak a kiindulási szakaszból (sárga) származó minták az I. terméshullám (piros) mintáitól. Nem figyelhető meg ilyen szétválás a toxinnal kezelt (kitöltött kör) és a kontroll (üres kör) között. A minták kódolásához lásd az 1. táblázatot

Mikrobiális közösség összetétele

Az újgenerációs szekvenálás eredményeike alapján nem sikerült felszaporítanunk Archaeákhoz tartozó DNS-t, sem cDNS-t.

Gombák közül, nem meglepő módon, a csiperke volt túlsúlyban. Az ezen felül jelenlévő OTU-k (Operational Taxonomic Unit) eloszlását a 4. ábra szemlélteti. A csiperkétől eltekintve a kiindulási mintákban egy ozmotoleráns élesztő, a *Debaryomyces hansenii* volt domináns, azonban az I. terméshullámra ennek is jelentősen lecsökkent a mennyisége. Az alacsony kópiaszámokból látszik, hogy a csiperke mellett csak kevés más gomba tudott megmaradni, és ez a szám az I. terméshullám alatt jelentősen még tovább csökkent.



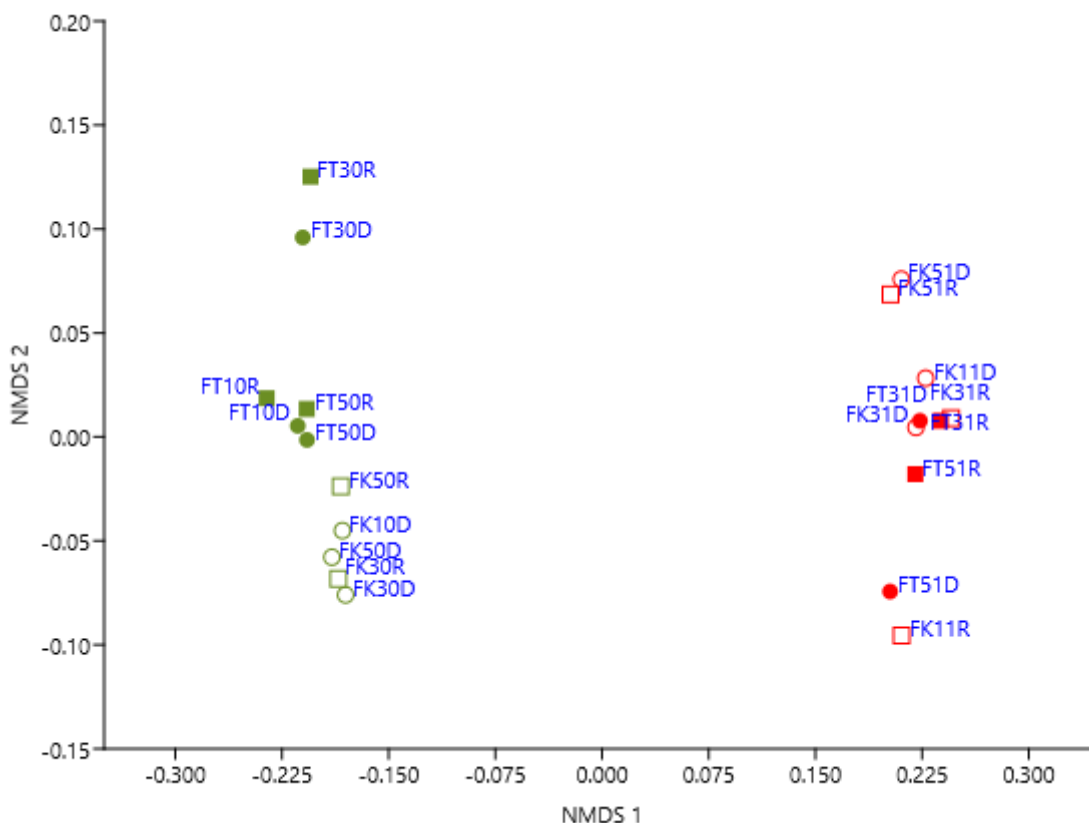
5. ábra: a komposztban jelenlévő, az *Agaricus bisporus* szekvenciákon felüli Fungi OTU-k eloszlása. A narancssárga jelöli a *Debaryomyces hansenii*t

A Bacteria doménből a 10 legabundánsabb OTU-t az 1. táblázat sorolja fel. A kiindulási szakasz összes szekvenciájának 40-60%-át *Staphylococcus*, *Glutamibacter* és *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó fajok teszik ki a kontroll és a kezelt mintákban is. Ezt a körülbelül 50%-os dominanciát az I. terméshullám idejére egyértelműen átveszi egy, az *Alcaligenaceae* családba tartozó faj. Ebbe a csoportba változatos életmódú Gram-negatív, többnyire pálca alakú baktériumok tartoznak. Előfordulnak vízben, talajban és állati/emberi szervezetben is (Rosenberg et al., 2014). Gombatermesztésből legjobb tudomásunk szerint eddig még nem írták le (McGee et al., 2017).

	Nemzetség	Faj
1.	Uncultured Alcaligenaceae	
2.	Staphylococcus	<i>Staphylococcus succinus</i>
3.	Glutamicibacter	<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>
4.	Ureibacillus	<i>Ureibacillus defluvii</i>
5.	Klebsiella	uncultured <i>Kluyvera</i> sp.
6.	Sphingobacterium	uncultured Bacteroidetes bacterium
7.	Pseudomonas	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>
8.	Uncultured Gemmatimonadota	
9.	Thermobifida	<i>Thermobifida cellulosilytica</i>
10.	Thermostaphylospora	<i>Thermostaphylospora grisealba</i>

2. táblázat: a 10 legnagyobb szekvenciaszámmal rendelkező Bacteria OTU

A mintákat összevetve egymással, láthatjuk, hogy a kontroll és a toxinnal kezelt minták között nincs jelentős különbség. Az azonos mintából származó DNSek és cDNSek gyakorlatilag megfeleltethetők egymásnak. A kiindulási szakasz és az I. terméshullám itt is élesen elválik egymástól. Ezek az észrevételek jól megfigyelhetők a bakteriális közösségről készített hőtérképen (6. ábra), illetve az éles szétválás a NMDS elemzésen még szembetűnőbb (5. ábra).



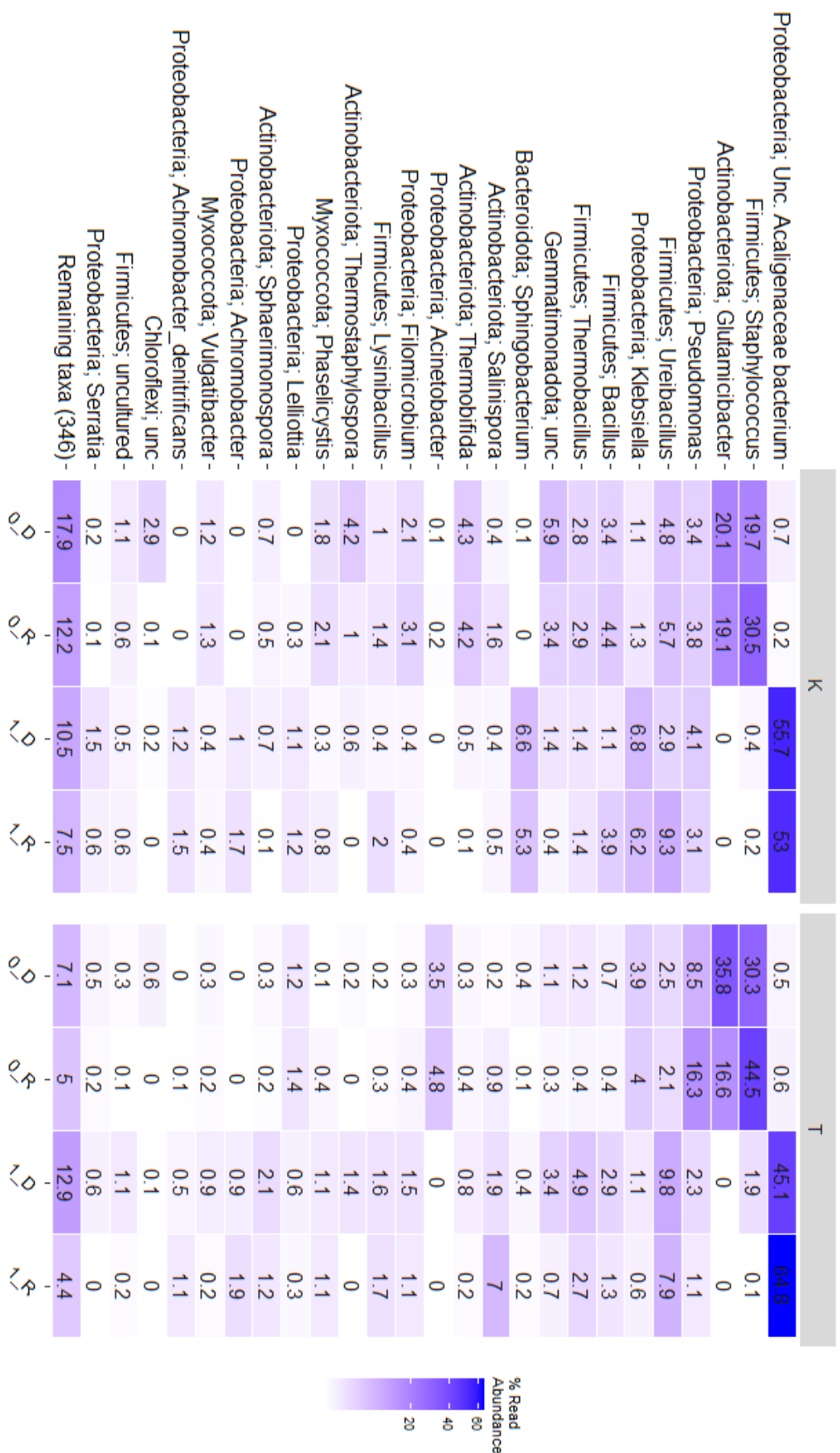
6. ábra: NMDS elemzés a minták bakteriális közösségének összetétele alapján.

Jelmagyarázat: kiindulási szakasz (zöld), I. terméshullám (piros), toxinnal kezelt (kitöltött), kontroll (üres), DNS (kör), RNS (négyzet)

Összefoglalás

Összességében elmondható, hogy enzimaktivitás és mikrobiális közösség szempontjából is a kiindulási minták (vegetatív szakasz) jól elkülönülnek az I. terméshullám mintáitól (reproduktív szakasz), azonban a T2-toxinos kezelés következtében ilyen szétválás nem tapasztalható. Az eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a toxinos kezelés nem volt hatással a csiperkegombára

sem termés hozam szintjén, sem az enzimaktivitás szintjén. A toxin nem került be számottevő mennyiségben a termőtestbe, valamint a termesztőközegben található mikrobiális közösségek összetételét sem befolyásolta látszólag. Emellett mind a T2-toxin, mind a HT2-toxin koncentrációja különösen gyorsan lecsökkent a rendszerben. Ezek az eredmények nagyon meglepőek, alapvetően nem erre számítottunk. Az irodalom alapján a mikotoxinok igen stabil molekulák, ebben rejlik fő élelmiszeripari kockázatuk. Ezért különösen érdekes és jelentős, hogy egy ilyen nagymértékű toxin-kezelés nem indukált változást a csiperke termesztésben, és látszólag nem jelent az esetében semmilyen kockázatot. Hogy ennek mi a pontos magyarázata, azt még nem tudjuk, csak találgatni tudunk. Lehetséges, hogy a komposzt speciális tulajdonságai miatt, például az enyhén savas pH vagy valamilyen jelenlévő vegyület következtében a toxin kikötődik az összetevők felszínére. A bomlástermékek megjelenése azonban a toxin degradációjára utal, ennek sebessége viszont szokatlanul gyors a mikrobiális lebontáshoz képest. Hogy el tudjuk különíteni a biotikus és abiotikus folyamatokat, további kísérleteket állítottunk össze, azonban ezek eredményére még várunk kell.



7. ábra: Hőkép a bakteriális közösség összetételéről

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Vajna Balázs habilitált adjunktusnak a rengeteg segítségét és iránymutatását, valamint hallgatótársamnak, Mátyás Eszternek a rengeteg munkáját, amelyek lehetővé tette ennek a dolgozatnak a létrejöttét.

Köszönöm továbbá a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet és a MATE, Kertészettudományi Intézet szakembereinek a hozzájárulásukat.

Emellett köszönöm az Eötvös Loránd Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékének a befogadást.

Irodalomjegyzék

- Alshannaq, A., & Yu, J. (2017). Occurrence , Toxicity , and Analysis of Major Mycotoxins in Food. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Bánfi R, B., Z, P., J, K., S, L., A, N., M, D., P, T., K, M., & B, V. (2015). Characterisation of the large-scale production process of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with the analysis of succession and spatial heterogeneity of lignocellulolytic enzyme activities. *Fungal Biology*, 119(12), 1354–1363. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2015.10.003>
- Hammer (1999-2021): Hammer Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9 pp
- Kabel, M. A., Jurak, E., Mäkelä, M. R., & de Vries, R. P. (2017). Occurrence and function of enzymes for lignocellulose degradation in commercial *Agaricus bisporus* cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2017 101:11, 101(11), 4363–4369. <https://doi.org/10.1007/S00253-017-8294-5>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1–e1. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS808>
- McGee, H. Byrne, A. Irvine & J. Wilson (2017) Diversity and dynamics of the DNA- and cDNA-derived compost fungal communities throughout the commercial cultivation process for *Agaricus bisporus*, *Mycologia*, 109:3, 475-484, DOI: 10.1080/00275514.2017.1349498
- NÉBIH (2021.): Gabonaalapú élelmiszerek fuzárium toxin szennyezettségének csökkentési lehetőségei (<https://portal.nebih.gov.hu/-/gabonaalapu-elelmiszerek-fuzarium-toxin-szennyezettsegenek-csokkentesei-lehetosegei>) 2021.10.29.
- Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell’Orto, V., & Cheli, F. (2016). Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on Cereal Byproducts. In *Toxins* (Vol. 8, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/TOXINS8020045>
- R Core Team (2021) R: A Language and Environment for Statistical Computing. *ampvis2: an R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data*. Andersen K.S., Kirkegaard R.H., Karst S.M., Albertsen M. (2018) *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/299537>
- Rosenberg et al, The Prokaryotes – Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria, DOI 10.1007/978-3-642-30197-1_397, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLOS ONE*, 7(7), e40863. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0040863>
- Valášková, V., & Baldrian, P. (2006). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology*, 157(2), 119–124. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2005.06.004>

- Vetrovsky, T., Baldrian, P. and Morais, D. (2018) SEED 2: A user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics* **34**: 2292–2294.
- White, T.M., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press, San Diego, CA*, pp. 315–321