

Biológia TDK 2022, tavaszi forduló

**Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék**

**Egy újonnan izolált *Debaryomyces hansenii* törzs killer aktivitásának
vizsgálata**

Merber Richárd

Biológus MSc I. évfolyam

Németh Nelli

Biológus MSc II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Pfeiffer Ilona

Szeged

2022

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Bevezető.....	3
Opportunista patogén élesztőgombák.....	3
Élesztőgombák killer toxinjai.....	4
A killer toxinok alkalmazási lehetőségei.....	7
A <i>Debaryomyces hansenii</i> jellemzése és jelentősége.....	8
Célkitűzés.....	12
Anyagok és módszerek	13
Felhasznált anyagok és mikroorganizmusok.....	13
Felhasznált izolátumok	13
Tápközegek	14
Festékek	15
Pufferek.....	15
Felhasznált eszközök	16
Felhasznált módszerek.....	17
Tenyésztési körülmények.....	17
Toxintartalmú fermentlé előállítása	17
Hatásspektrum vizsgálat	17
NaCl hatása a hőstabilitásra	17
Élőcsíraszám meghatározás	18
A toxin hatásának vizsgálata <i>C. tropicalis</i> sejtekre áramlási citometria alkalmazásával .	18
MALDI-TOF analízis	18
Sejtfal festése	19
Kitináz aktivitás vizsgálata	19
A toxin hatása <i>C. tropicalis</i> által képzett biofilmre	19
Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis	20

Eredmények és értékelésük	21
Hatásspektrum vizsgálat	21
A NaCl hatása a toxin hőstabilitására	21
A toxin hatása a <i>C. tropicalis</i> élő csíraszámára	23
A <i>D. hansenii</i> toxin tartalmú fermentlé hatása <i>C. tropicalis</i> CBS 94 sejtekre - áramlási citometria	24
A toxin tisztítása	25
MALDI-TOF analízis	25
Kitináz aktivitás kimutatása	26
<i>C. tropicalis</i> sejtek Kalkofluor fehér festése	26
A toxin hatása <i>C. tropicalis</i> biofilm degradációjára	28
Összefoglalás	29
Köszönetnyilvánítás	31
Irodalomjegyzék	32
Tételes szerzői hozzájárulás	36

Bevezető

Opportunista patogén élesztőgombák

A gombák az egész világon elterjedtek, számos fajuk megtalálható talajban, vízben, valamint előfordulnak növények, melegvérű állatok és az ember szervezetében is. Az ismert gomba fajok közül mindössze néhány száz kórokozót ismerünk, ezek nagy része növénypatogén és csak kevés faj képes humán megbetegedések kiváltására. A gombák által okozott humán megbetegedéseknek négy fajtája különíthető el: a termőtest elfogyasztásával kialakuló micetizmusok; a spórák által okozott allergiás reakciók; a környezetbe kiválasztott másodlagos anyagcseretermékek (toxinek) által okozott mikotoxikózisok; valamint a patogén gombák által kialakított betegségek¹. A patogén gombák által okozott, egyre növekvő számban előforduló fertőzéseket mikózisoknak nevezzük, melyek hátterében a szervezetben túlzottan elszaporodó gombasejtek állnak^{2,3,4}. Az egészséges embereket megfertőzni képes fajokat, melyek leggyakrabban a bőr felszínén létrejövő, kután vagy szuperficiális betegségeket okoznak, elsődleges patogéneknek nevezzük^{1,5,6}. A bőrt (10-25%), hüvelyt (50-75%) vagy az emésztőrendszert érintő betegségek jellemző tünetei (emésztési zavarok, hasmenés, hüvelyi gyulladás, hajhullás) nem specifikusak és nem súlyosak^{1,7}.

A ritkábban előforduló, ugyanakkor magas mortalitási rátával rendelkező szisztémás mikózisokat oportunistá invazív patogének okozzák, amelyek virulenciája jóval alacsonyabb, mint az elsődleges patogén gombáknak^{6,7}. Az évente előforduló átlagosan másfél millió gombafertőzés okozta haláleset 90%-áért az *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* és *Pneumocystis* nemzetségek tagjai felelősek. Szisztémás mikózis csak immunosuppresszív kezeléseken átesett vagy immunrendszeret érintő betegségekben (pl.: AIDS) szenvedő páciensek körében fordul elő, amelyet antifungális szerekkel, antibiotikumokkal kezelnek. A legtöbb cryptococcosis-sal diagnosztizált beteg például hibásan működő CD4+ limfocitákkal rendelkezik; valamint a *Candida* fajok okozta keringési rendszert érintő megbetegedések az esetek többségében szervtranszplantációt, műtéteket, invazív kezelési módokat, hosszan tartó katéterezést követően alakulnak ki⁷.

Antifungális szerekből igen kevés áll rendelkezésünkre (pl.: azolok, griseofulvin, echinocandin), amelyeknek az egyre gyakoribbá váló használata során folyamatosan alakulnak ki rezisztens patogén törzsek^{1,7}. A primer patogének közé is sorolható, szájpenészt okozó *Candida albicans* felelős a legtöbb invazív candidiázis kialakításáért. Ez a faj az egészséges emberek emésztőrendszerében is megtalálható a baktériumok mellett^{8,9}. Korábban a faj törzsei

flukonazolra érzékenyek voltak, azonban az antifungális szer fokozott használata az opportunistá patogén törzsek érzékenységeének kiszámíthatatlanságát eredményezte⁸. A daganatos megbetegedésekkel, neutropéniával küzdő páciensek gyakran fertőződnek meg *C. tropicalis*-szal, amely a harmadik leggyakrabban izolált faj a *C. albicans* mögött. Széles hatásspektrummal rendelkező antibiotikumok alkalmazása és hosszú ideig tartó katéterezés tovább növeli a betegség kialakulásának kockázatát^{10,11}. A *C. tropicalis* a *C. albicans*-nál magasabb virulenciával, és az összes *Candida* faj között a legnagyobb mortalitási rátával rendelkezik; amely tulajdonságoknak a hátterében a biofilm-képzés képessége, a proteináz-szekréció és a törzsek dimorfizmusa állhat¹⁰. A *C. tropicalis* okozta candidiázis a fejlett országokban a negyedik leggyakoribb nosocomialis, keringési rendszert érintő fertőzéssel kialakuló mikózis, melynek kezelésére elsősorban amphotericin B-t vagy echinocandint alkalmaznak¹¹.

A mikózis diagnózisának felállítása a nem specifikus tünetek miatt nehézkes, az esetek száma növekszik az immunrendszert legyengítő állapotok (pl.: cukorbetegség, autoimmun betegségek) és kezelésük gyakoriságának növekedésével^{1,6,12}. Az antifungális szerek alkalmazásának fokozatos emelkedésével létrejött rezisztens patogén törzsek jelentős problémát okoznak az egészségügyben^{1,8,12}. Az echinocandinok bevezetése óta forgalomba került néhány antimikotikum nem elegendő a probléma megoldására, valamint az új szerek aktivitás-spektruma is limitált lehet^{7,12}.

Élesztőgombák killer toxinjai

A komplex ökoszisztémákat alkotó mikroorganizmusok, így az élesztőgombák között is versengés léphet fel, amennyiben azonos élőhelyen található, ugyanazon tápanyagforrásokat hasznosítanak^{13,14}. Az élesztőgombák, más mikroorganizmusokhoz hasonlóan, környezetüket természetes és mesterséges körülmények között is, gyakran specifikus és nem-specifikus anyagcsere termékek kibocsátásával alakítják át, melyek antimikrobiális hatásúak lehetnek^{13,15,16}. Az élesztőgombák kompetitor fajokra gyakorolt hatását antagonizmusnak nevezzük¹³. A nem-specifikus másodlagos anyagcseretermékek közé tartoznak például a kis molekulasúlyú szerves savak, amelyek a környezet pH-ját csökkentik; valamint a néhány aminosav hosszúságú, nem-riboszómálisan termelődő fehérjék^{13,16}. A nagyobb molekulaméretű specifikus vegyületeknek két csoportja különíthető el: glikolipidek és (gliko)proteinek; utóbbiak termelésére nem csak élesztőgombák, hanem magasabb rendű állatok (pl.: emlősök) is képesek^{13,15}. A (gliko)proteinek fungicid vagy fungisztatikus hatással

rendelkező fehérje-természetű molekulák, amelyeket más néven mikocineknek, zimocineknek vagy killer toxinoknak/killer faktornak nevezünk^{13,16}.

A változatos (20-100 kDa) méretű killer faktorokat termelni képes élesztőgomba-törzsek a killer törzsek¹⁶. A killer jelenség nem azonos a killer-like jelenséggel, amely a glikolipid természetű ágensekre jellemző^{13,16}. A killer jelenséget Bevan és Makover fedezte fel 1963-ban a *Saccharomyces cerevisiae*-ben^{17,18}. Napjainkig több mint 100 Ascomycota és 50 Basidiomycota fajnál igazolták a killer aktivitás meglétét; amelyek legalább 20 különböző nemzetségbe sorolhatóak^{16,18,19}. A killer toxinokra a nagyfokú diverzitás jellemző, akár fajon belül, törzsek között is eltérés mutatkozhat molekuláris méretük, bioszintézisük, érési folyamataik terén; valamint az azokat kódoló struktúrgének elhelyezkedésében is különbözhetnek^{15,16}. Néhány esetben az ezen toxinokat kódoló gének a kromoszómákon találhatóak (pl.: *S. cerevisiae* KHR, KHS toxinok); némelyek virális eredetű dsRNS molekulákon (pl.: *S. cerevisiae* K1, K2 és K28 toxinok) vagy lineáris kettős szálú DNS plazmidokon (pl.: *C. mrakii* HMK) kódoltak^{14,16}.

A killer toxinok szűk hatásspektrummal rendelkeznek: egyazon fajon belül sem hatnak minden törzsre, továbbá minél távolabbi rokonság áll fenn a kompetitorok között, annál kevésbé valószínű, hogy az adott faj vagy nemzetség tagjai az adott élőhelyen hátrányba kerülnek a killer törzsekkel szemben¹³. Ritkán előfordul, hogy fonalas gombák vagy baktériumok sejtjeit is elpusztítják vagy gátolják a sejteket a növekedésben¹⁴.

Az élesztőgombákat a killer jelenség kapcsán négyféle fenotípus jellemzi: killer (K^+R^+), szenzitív (K^-R^-), neutrális (K^-R^+) és killer/szenzitív (K^+R^-)^{14,15,16}. A killer törzsek nem érzékenyek a saját maguk által termelt (gliko)proteinekre, amelyek azonban a közeli rokonságban álló fajok toxinra szenzitív törzseinek pusztulásához vezethetnek^{13,15,20}. Amennyiben egy mikocin-termelésre képes törzs egy másik killer törzs toxinjára érzékenységet mutat, a saját másodlagos anyagcsereterméke más érzékeny törzsekre lesz hatással¹⁴. Nem minden élesztőgomba termel toxinokat és nem mindegyik érzékeny rájuk: azok a törzsek, amelyek extracelluláris (gliko)proteinek jelenlétében életben maradnak, és nem rendelkeznek saját mikocinnal, neutrális fenotípusúak. Az egyes toxinokra való érzékenység törzsek, fajok és nemzetségek szintjén jelentősen különbözhet; valamint a hatás mértékét a termelődött toxin mennyisége és az aktivitáshoz szükséges optimális hőmérséklet- és pH- is befolyásolja^{13,14}.

A killer toxinok megfelelő aktivitásához elengedhetetlen a savas pH-tartomány (pH 3-6), valamint a 40 °C alatti hőmérséklet^{13,15}. Számos kísérlet igazolta, hogy a toxinok nagy része maximális aktivitását átlagosan 4 és 5 közötti pH-n és 15-20 (bizonyos esetekben 20-35) °C-on történő inkubáció során éri el^{13,15,21}. Az optimális környezeti feltételek nemzetségenként,

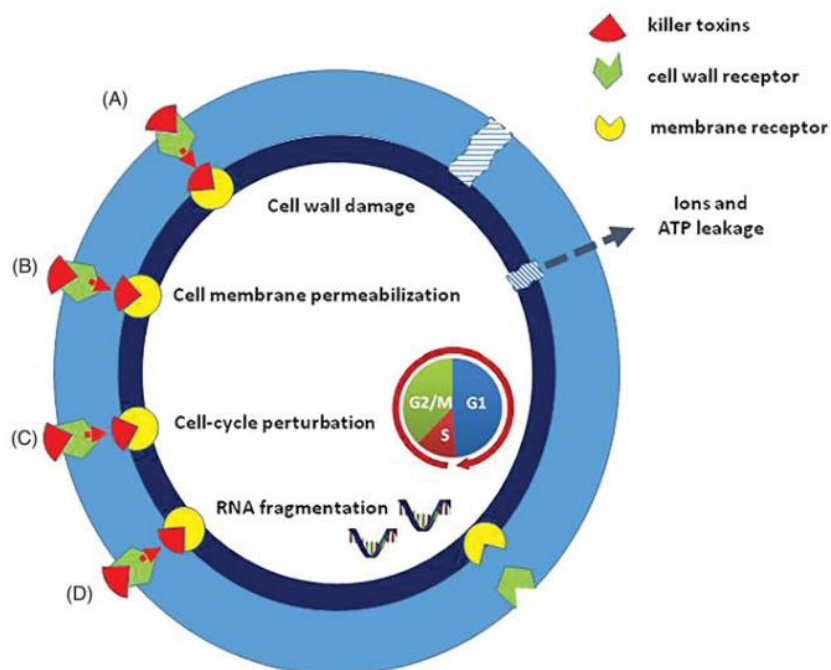
fajonként, de akár törzsenként is erősen eltérhetnek; de ezek biztosítása nem elegendő a sikeres kísérletek végrehajtásához. Az inaktivitásra utaló eredményeket befolyásolhatja a nem-megfelelő target kiválasztása, amely, annak ellenére, hogy más, hasonló mikocinek gátolják, nem feltétlenül mutat érzékenységet a vizsgált toxinra is¹³. A killer és szenzitív törzsek kívánt kölcsönhatásához megfelelő ploiditásra is szükség van: haploid *S. cerevisiae* által termelt K1 toxin például nem hatásos diploid sejtek ellen¹⁹. Továbbá a szenzitív törzseknek az adott kísérletben alkalmazott sejt-koncentrációja is nagymértékben befolyásolja az ellenük fellépő killer aktivitás kimutathatóságát. A toxin aktivitás intenzitásának vizsgálatához a szilárd táptalajok megfelelőbbek a tápoldatoknál, mert azokban a fehérjék stabilabbak. Az aktivitás halotoleráns élesztőgombák (pl.: *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia* fajok) esetén a tápközeg sótartalmával is összefüggésbe hozható. Amennyiben a tenyésztéshez használt táptalajhoz átlagosan 4-12%-os arányban NaCl-ot adunk, a toxinok aktivitása megemelkedik¹³.

A killer faktorokat kódoló struktúrgénekről átíródott preprotoxinból protoxin, a protoxinból pedig érett killer toxin képződik proteolitikus hasításokkal, szignál peptidázok (pl: Kex1 és Kex2, *S. cerevisiae*, *C. mrakii*) segítségével^{14,15,16}. A fehérjetermészetű killer toxinok ezután gyakran N-glikoziláción esnek át. Az érési folyamaton átesett fehérjemolekulák nagy része egy, ritkábban két, legfeljebb három alegységből épül fel, melyek között diszulfid-hidak találhatóak^{13,16,19}. A toxinok mérete 1,8-150 kDa közé esik, ugyanakkor ritkán haladja meg a 100 kDa-t - ilyen nagy méretű mikocinokkal egyes *Pichia* és *Kluyveromyces* fajok rendelkeznek^{13,15,19}.

A mikocinek a target sejtekbe jutva fejtik ki hatásukat. Ennek eléréséhez szükség van a kitin-tartalmú sejtfalon való áthatolásra és a sejtmembrán elérésére, ami egy receptor-mediált kétlépéses folyamat keretében valósul meg^{19,21}. Az első fázis gyors ütemű, energiafüggetlen folyamat, melynek során a killer toxin megfelelő funkciójú alegysége a sejtfal valamely komponenséhez kötődik, ami receptorként szolgál számára^{13,14}. A leggyakrabban azonosított komponensek a β -1,6-D-glükánok vagy β -1,3-D-glükánok, a kitin, a mannán és a mannoproteinek^{19,21}. Ugyan a sejtfal receptorok felismerése, mint első lépés, esszenciális; kísérletek igazolták, hogy a pozitív többlet-töltésű toxinok képesek lehetnek a negatív felszínű szferoplasztokhoz kapcsolódni¹⁹. A második fázis energia-függő, lassú folyamat, amely során a toxin a plazmamembránhoz kötődik egy másodlagos receptorhoz való kapcsolódással^{13,19}. Az elsődleges és másodlagos receptorokhoz való kötődéshez elengedhetetlen az optimális pH-tartomány^{13,18}.

A killer toxinok hatásmechanizmusa többféle. Bizonyos esetekben már a sejtfalhoz való kötődéskor kifejtik hatásukat, míg más toxinok a másodlagos receptorhoz való kapcsolódásuk

után lépnek működésbe: ion-permeábilis pórust, csatornát hoznak létre a membránban, vagy az intracelluláris térbe hatolnak, ahol az RNS fragmentációját, a DNS és sejtfa-komponensek szintézisét, vagy a sejtciklust gátolhatják^{13,19,21} (1. ábra). Például a *Kluyveromyces lactis* által termelt killer toxin a G1 fázisban megállítja a sejtciklust; míg más toxinok a sejtfa-komponenseket hidrolizálják vagy megakadályozzák a β -1,3-glükán szintézisét (*W. saturnus varietas mrakii*)^{13,18,20}. A *S. cerevisiae* KT28 toxinja a DNS-szintézist gátolja, a *K. lactis* toxinja a tRNS hasítását végzi el zimocin aktivitásával^{18,20}. Az *Ustilago maydis* KP4 virálisan kódolt toxinja sejtnövekedést és osztódást gátol a kalcium-felvétel megakadályozásával. A *K. siamensis* HN12-1 és *M. frigida* 2E00797 toxinok képesek a szenzitív sejtek morfológiájának megváltoztatására, a sejtfaon durva felszíni képletek létrehozásával²¹.



1. ábra: A killer toxinok hatásmechanizmusa¹⁹.

A killer toxinok alkalmazási lehetőségei

A killer törzsek által termelt toxinok előnyös tulajdonságaik miatt az elmúlt húsz évben a biotechnológia számos területén felhasználásra kerültek. Az élelmiszeriparban más mikroorganizmusok elszaporodásának megakadályozására használják őket, főképpen fermentációs folyamatok során, sör, bor és kenyér előállításakor^{14,16}. Léteznek mesterségesen létrehozott *S. cerevisiae* törzsek, amelyeket erre a célra nemesítettek. A killer toxinok, mint biokontroll ágensek felhasználása felválthatja a mesterséges tartósítószer alkalmazását.

Mezőgazdaságban történő alkalmazásuk növénypatogének elleni védekezés formájában valósul meg, melynek során killer plazmidokat használnak vektorként fehérje-expresszióra rekombináns DNS technológiában¹⁴. Az így létrehozott transzgenikus növények (pl.: kukorica - *U. maydis* KP4 toxin) rezisztenssé váltak a megfelelő kórokozók ellen.

A gyógyászat terén antibiotikumokra rezisztens humán patogén gombák elleni kezelésre használhatják őket a jövőben, például *C. albicans* és *Cr. neoformans* okozta súlyos szisztémás mikózisok kezelésére¹⁶. Azonban a toxinok természetes módon történő alkalmazása gyenge stabilitásuk miatt nehézkes: az emberi testben uralkodó környezeti viszonyok (37 °C) gyakran nem megfelelőek az optimális aktivitáshoz. Polonelli és Morace 1988-ban anti-idiotipikus antitesteket fejlesztettek ki *W. anomalus* UCSC 25F (*P. anomala* PaKT) toxinból, amelyek csupán a toxinok aktív centrumát tartalmazták^{16,19}. Az egyláncú variábilis fragmentumokat fág-display könyvtárakban tárolták, és igazolták killer aktivitásukat - ezeket antibiotikumszerű antitesteknek (antibiodbody) nevezzük¹⁶. Az antibiodbody-kból származó decapeptidek a killer peptidek (KP), amelyek kis méretüknek köszönhetően gazdaságosabban és könnyebben előállíthatók, mint az antitestek, melyekből származnak^{16,19}.

A killer toxinok felhasználása a fajon belüli törzs specifikációra hatékony és gazdaságos eszköz lehet. Ez a módszer a biotyping, amelynek eredményes jövőt jósolnak^{14,15}.

A *Debaryomyces hansenii* jellemzése és jelentősége

A *Debaryomyces* nemzetségbe haploid, ivartalanul sarjadzással szaporodó fajok tartoznak. Ivaros szaporodásuk ritkán fordul elő, melyet heterogámia (szomatogámia), néhány esetben izogámia jellemez. A rövid diploid fázist meiózis, majd aszkuszképződés követi²⁹. Az aszkuszok 1-4 haploid aszkospórát tartalmaznak^{17,22}. A nemzetségbe tartozó fajokra nem vagy alig jellemző fermentáció, sejtlégzésük azonban jelentős. Nem képesek nitrát-asszimilációra, ugyanakkor széleskörűen ismertek koenzim-Q9-szintézisükről²².

A *Debaryomyces hansenii* (anamorf: *C. famata*) egy flavonoid-felhalmozásra (pl.: riboflavin) képes, halotoleráns élesztőgomba faj, amely a *Candida* nemzetség CTG kládjába tartozik^{23,24,25}. Ebben a csoportban a CUG triplet - rendhagyó módon - szerint kódol leucin helyett²³. Számos *Candida* fajhoz hasonlóan az egészséges humán mikrobióta része, ugyanakkor csupán alacsony virulenciával rendelkezik az opportunistá patogénekhez képest, melyet a Dujon és munkatársai által 2004-ben publikált genom-szekvenciájában a *C. albicans*-éhoz hasonló virulencia-faktorok ortológjainak hiánya is alátámaszt^{23,25}. A *D. hansenii* genetikai állománya több nem-virulencia-génnek több paralógját is tartalmazza

(kromoszómális polimorfizmus), mely magyarázatul szolgál az *Ascomycota* törzsbe sorolt faj extrémofilitására, a szélsőséges környezeti viszonyokhoz való alkalmazkodási képességére^{23,26}. A faj pulzáltatott mezejű gélelektroforézis (PFGE) vizsgálat alapján két taxonra osztható: *D. hansenii* var. *hansenii* és *D. hansenii* var. *fabryi*²⁵. Egyes törzsei a *C. neoformans*-hoz és *C. albicans*-hoz hasonlóan opportunistáknak minősülnek, míg mások Európai Unió engedéllyel rendelkeznek: szerepelnek a European Food Safety Authority (EFSA) QPS (Qualified Presumption of Safety) listáján, azaz az élelmiszeripar számára biztonságos a használatuk^{26,27,28}. Természetes módon is előfordulnak tejtermékeken (pl.: sajtok), gyümölcsökön, füstölt húson és egyéb, magas cukortartalmú élelmiszereken; valamint jelen lehetnek a sörök és borok erjedési folyamatai során^{22,27}.

Az említett fajt legelőször tengervízből izolálták, azonban optimális élőhelyeit magas diverzitás jellemzi xero-, halo- és ozmotoleranciája miatt: alacsony vízaktivitású környezetben is előfordulhat, valamint a táptalaj akár 25% NaCl-, 18% glicerin- és 5% glükóz-tartalmát is elviseli^{22,24}. Kísérletek igazolták, hogy a táptalaj megfelelő NaCl-, Na⁺- vagy K⁺-tartalma pozitív hatással van a telepek növekedésére²⁹. A *D. hansenii* növekedéséhez szükséges optimális pH 4-6 közötti, azonban kísérletekkel igazolták, hogy 3 és 10 közötti pH-tartományban is képes túlélésre, továbbá enyhén alkalikus pH-n is képes életben maradni^{17,22,30}. Optimális növekedési hőmérséklete 20 és 25 °C közé tehető; de egyes törzsek életben maradhatnak 10, 5 és 0 °C alatt is²². Metabolikus aktivitása és sótűrési képessége között szoros összefüggés állítható fel: glicerin termelésére, lebontására és intracelluláris felhalmozására is képes, amelyek közül az utóbbi felelős az intracelluláris nátriumion-koncentrációra érzékeny metabolikus folyamatok megfelelő körülményeinek kialakításáért^{25,31}.

A faj élelmiszeripari felhasználásra kerül füstölt húson, sajtokon, egyéb feldolgozott élelmiszerek előállításánál, amely folyamat eredményesebbé tételére további vizsgálatok folynak³¹. Más élesztőgombákhoz hasonlóan, különböző anyagcseretermékek előállításával jelentősen befolyásolhatja a késztermékek aromáját, színét, textúráját és ízét, amely tulajdonsága jövőbeni felhasználási lehetőségeket hordoz^{30,31}.

Egyes *D. hansenii* törzsek által termelt immunstimulánsok más élesztőgombák által termelt poliaminok, kitin és mannán mellett probiotikus hatásúak lehetnek bizonyos állatokra (pl.: β -glükánok, újszülött kecske; hal)^{28,32}. Néhány metabolit emberi alkalmazása is lehetségessé válhat a jövőben, például gyulladásos folyamatok csökkentése céljából, a citokin-szekréció szabályozásával³⁵. A faj biotechnológiai jelentősége intenzív lipid- és flavonoid-bioszintézisében rejlik, valamint az élelmiszeripar számára lipázokat, exopeptidázokat termel, valamint termofil β -glükozidázokat üzemanyag-alkohol előállítására^{24,30}. Számos szénforrást

képes hasznosítani, xilózból xilitolt állít elő²⁴. Bizonyos törzsek peroxiszómális amin-oxidázaik segítségével képesek az élelmiszerekkel kapcsolatba kerülő többi mikroba által, aminosav-dekarboxilációval szintetizált biogén aminok lebontására³³.

A *D. hansenii* egyes törzsei 10-20 °C között tenyésztve (gliko)proteineket, killer toxinokat termelnek, amelyeknek optimális működési körülményei 20 °C (25-30 °C) és pH 4-4,5 tartomány^{34,35,36}. Vannak olyan molekulák, amelyek már pH 5 felett elveszítik aktivitásukat, míg mások pH 3-6 tartományban stabilak maradnak^{27,37}. A *D. hansenii* törzsekből származó, 31,5 kDa nagyságú TEM8 és TEM17 toxinokra például a pH 2,5-5,5 közötti magas aktivitás jellemző³⁸. Az első killer jelenséget mutató törzset Gunge és munkatársai azonosították 1993-ban, és megfigyelték, hogy a toxin csak NaCl vagy KCl jelenlétében bizonyult aktívnak a tesztelt törzsekkel szemben^{18,22}. Bár a toxinok maximális aktivitása 20 °C-on érhető el, afelett pedig elvesztik hatásukat; léteznek olyan mikocinek, amelyek alacsonyabb (5 °C) és magasabb (37 °C) hőmérsékleten is aktívak maradhatnak^{22,36,37}. A *D. hansenii* var. *fabryi* által termelt toxin 35 °C-on, a *D. hansenii* var. *hansenii* esetén 39 °C-on is aktivitást mutat^{22,27}. Ez arra utal, hogy a toxinok felhasználása mezőgazdasági, biotechnológiai jelentőségük mellett eredményes lehet humánpatogén élesztőgombák okozta nosocomialis fertőzések elleni védekezésben^{17,18}. A *D. hansenii* törzsek által termelt toxinok hatékonyságát *C. tropicalis* és *C. albicans*, valamint egyes *Trychophyton* fajok ellen kísérlettel igazolták^{17,18,36}. A toxinok hatását befolyásolják a target sejtekben működő szignalizációs útvonalak (pl.: MAPK Hog1)³⁶. Továbbá hatást gyakorolnak rájuk a multi- és pleiotrópikus drog-rezisztenciában nagy szerepet játszó transzporterek, pumpák (MDR, PDR, ABC-transzporter)^{39,40}.

A toxinok termelését nem csak a környezeti faktorok befolyásolják, hanem az alkalmazott táptalaj és annak komponensei is: megfelelő pH és sótartalom mellett a komplex táptalajoknak elegendő fehérjeforrást kell tartalmaznia^{37,38}. A szintetikus táptalajok általában nem alkalmasak toxintermeltetésre³⁷. DMSO hozzáadása pozitívan hat a toxinok termelésére, a polietilén-glikollal és glicerinnel kiegészített táptalajok nagyobb toxin-stabilitást és emelkedett termelést biztosítanak^{35,37,38}. A szerin-proteáz inhibitor PMSF elősegíti a toxinmennyiség növekedését a táptalajban a szekretált fehérjebontó enzimek gátlásával, azonban egyes *D. hansenii* törzsek esetén ez a hatás nem tapasztalható. SDS hozzáadásával a sejtek növekedése és a toxintermelés gátolható³⁷.

Korábbi munkánk során a SZTE Mikrobiológiai Tanszék törzsgyűjteményében található *Debaryomyces hansenii* törzsek killer aktivitását vizsgáltuk humán patogén *Candida* és *Cryptococcus* törzsekre. Öt killer aktivitást mutató törzset azonosítottunk, ezek a *D. hansenii* SZMC 26628, SZMC 26637, SZMC 26720, SZMC 26738, SZMC 26757, melyekre a *Candida*

tropicalis és *C. glabrata* bizonyultak érzékenyek. Megállapítottuk, hogy a killer toxinok kromoszómálisan kódolt fehérje molekulák, mert extrakromoszómális elemek jelenlétét nem tudtuk kimutatni a törzsekben. A toxinok pedig proteináz K emésztés hatására elvesztették aktivitásukat. A hőmérséklet emelésével csökkent, ugyanakkor a NaCl koncentráció növelésével fokozódott az aktivitás. Különböző pórusméretű fehérjeszűrők használatával a toxinok a 10 és 100 kDa közötti mérettartományba estek⁴¹.

Célkitűzés

A kutatási munkánk kezdetén célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék törzsgyűjteményében megtalálható *D. hansenii* SZMC 26738 törzs által termelt toxintartalmú fermentlé

- hatásspektrumát, a vizsgálatba humánpatogén valamint élelmiszerromlást okozó élesztőgombákat is bevonva
- hőstabilitását NaCl jelenlétében
- hatásmódját (élőcsíraszám meghatározás, áramlási citométer)
- által okozott morfológiai változásokat az érzékeny *C. tropicalis* CBS 94 sejteken
- hatását a *C. tropicalis* CBS 94 által képzett biofilmre
- fehérje tartalmát (MALDI-TOF analízis)

Anyagok és módszerek

Felhasznált anyagok és mikroorganizmusok

Felhasznált izolátumok

1. táblázat. A hatásspektrum vizsgálatához felhasznált törzsek

Faj	Törzsszám
<i>Debaryomyces hansenii</i>	SZMC 26738
<i>Debaryomyces hansenii</i>	SZMC 27788
<i>Debaryomyces prosipidis</i>	SZMC 26708
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Candida albicans</i>	SC 5314
<i>Candida albicans</i>	SZMC 1458
<i>Candida auris</i>	0381
<i>Candida deformans</i>	SZMC 26745
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987
<i>Candida glabrata</i>	CBS 138
<i>Candida globosa</i>	SZMC 26734
<i>Candida krusei</i>	CBS 573
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 604
<i>Candida tropicalis</i>	CBS 94
<i>Candida tropicalis</i>	SZMC 1366
<i>Candida tropicalis</i>	SZMC 1410
<i>Candida tropicalis</i>	SZMC 9092
<i>Candida zeylanoides</i>	SZMC 26714
<i>Cryptococcus neoformans</i>	IFM 5844
<i>Cryptococcus neoformans</i>	IFO 410
<i>Cutaneotrichosporon curvatus</i>	SZMC 26710
<i>Lachancea fermentati</i>	CBS 707
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	CBS 1072
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ATCC 9533
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	SZMC 0004
<i>Trichophyton tonsurans</i>	ATCC 28942
<i>Yarrowia galli</i>	SZMC 26730
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	CBS 4688
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	CBS 684
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CBS 441
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	SZMC 27782

ATCC: American Type Culture Collection

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

IFM: Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University

IFO: Institute for Fermentation, Osaka, Japan

SC: Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, New Jersey, USA

SZMC: Szeged Microbiology Collection

Tápközegek

AIM tápoldat

AIM-V® + AlbuMAX® (BSA) (1x) Serum free medium (Gibco)

koncentrált sósavval pH 4-re beállítva.

YPD (élesztő kivonat – pepton – glükóz) tápoldat

1 % (m/V) glükóz

1 % (m/V) pepton

0,5% (m/V) élesztő kivonat

PDB (burgonya – glükóz tápoldat) tápoldat

20% (m/V) burgonya keményítő kivonat (VWR)

2% (m/V) glükóz

YPD táptalaj

1% (m/V) glükóz

1% (m/V) pepton

0,5% (m/V) élesztő kivonat

2% (m/V) agar

Metilénkék tartalmú YPD táptalaj

1% (m/V) glükóz

1% (m/V) pepton

0,5% (m/V) élesztő kivonat

2% (m/V) agar

0,1% (m/V) metilénkék (10 mg/ml)

citrát pufferrel pH 4-re állítva

Kitin tartalmú táptalaj

1% (m/V) mannit

0,5% (m/V) KH_2PO_4

0,2% (m/V) NaNO_3

0,1% (m/V) MgSO_4

2% (m/V) agar

0,1 g/l kolloid kitin

Festékek

Kalkofluor Fehér (Sigma-Aldrich, 1 mg/ml)

Propidium-jodid (Sigma-Aldrich, 1 mg/ml)

Kongó Vörös oldat (1 mg/ml desztillált vízben)

Coomassie Briliáns kék festék

0,1% (V/V) Coomassie Briliáns kék

10% (V/V) jégecet

50% (V/V) metanol

Pufferek

McIlvain puffer

A törzsoldat: 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (35,59 g/l)

B törzsoldat: 0,1 M citromsav $\times \text{H}_2\text{O}$ (21,01 g/l)

Fehérje futtatáshoz használt 2x loading puffer

500 mM ditioneitol

50% (V/V) glicerin

0,5% (V/V) brómfenolkék

10% (V/V) Nátrium-dodecil-szulfát

250 mM Tris-HCl pH 6,8

NuPAGE MES SDS puffer 20x (Thermo Fisher)

PBS (foszfát pufferelt sóoldat)

1,42 mg/ml Na_2HPO_4

0,24 mg/ml KH_2PO_4

0,2 mg/ml KCl

8,0 mg/ml NaCl

pH 7,4

XTT (nátrium 3'-[1- (fenilaminokarbonil)- 3,4- tetrazólium]-bis (4-methoxy6-nitro) benzol szulfonilsav hidrát) oldat

0,5 mg/ml XTT (Invitrogen)

1 μM menadion

PBS pufferben oldva

1 M NaCl oldat

Festékmentesítő oldat

10% jégecet

40% metanol

Felhasznált eszközök

Zeiss Axioscope 40 mikroszkóp Axiocam Mrc kamera

Beta 2-B LSC plus (Martin Christ) Liofilizáló készülék

Durapore® Membrán Filter, 0,22 μm (Millipore)

Heraeus Pico 17 centrifuga (Thermo Scientific)

AMICON Ultra Centrifugaszűrők (Merck)

Amnis FlowSight (Luminex)

BIO-RAD Mini-PROTEAN TGX előre gyártott, 10 zsebes, 12% poliakrilamid tartalmú gél (Bio-rad)

SpectroStar nano (BMG labtech) spektrofotométer

Zeiss Axioscope 40 mikroszkóp és Axiocam Mrc kamera

Felhasznált módszerek

Tenyésztési körülmények

Az élesztőgomba törzseket YPD táptalajra oltva 48 órán át növesztettük. A tenyésztési hőmérséklet a *Candida*, *Cryptococcus*, *Lachancea*, *Lodderomyces*, *Trychophyton* és *Yarrowia* törzsek esetében 30 °C, a *Wickerhamomyces* és *Cutaneotrichosporon* törzsek esetében 20 °C, a *Zygosaccharomyces* és *Debaryomyces* törzseknél pedig 25 °C volt.

A tenyészeteket felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

A toxin-érzékenységi teszthez a sejteket 3 ml YPD tápoldatban rázatva (50 rpm) növesztettük 24 órán át, az előbb felsoroltak megfelelő hőmérsékleteken.

Toxintartalmú fermentlé előállítása

A *D. hansenii* SZMC 26738 killer törzset 25 °C-on rázógépből (50 rpm) növesztettük 48 órán át YPD, illetve PDB tápoldatban, a tenyészeteket centrifugáltuk (5 perc, 10.000 rpm, szobahőmérséklet) majd a felülúszót 0,22 µm pórusméretű szűrőn átszűrtük.

Az így nyert sejtmentes fermentlevet -70 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át, majd liofilizáló készülékben a folyadék felét elvontuk a mintákból. A töményített fermentleveket használtuk a kísérletek során.

Hatásspektrum vizsgálat

A vizsgált törzsek 24 órás tenyészetét masszív oltással vittük fel metilénkéket tartalmazó, pH 4 YPD táptalaj felszínére, majd a felszín beszáradását követően a killer *D. hansenii* törzset a táptalaj felületére oltottuk, és a csészéket 25 °C-os termosztátban inkubáltuk 48 órán át. Ezt követően vizsgáltuk a megjelenő gátlási zónákat.

2. táblázat: pH 4 McIlvain puffer készítése 50 ml végtérfogatban

pH	A törzsoldat: 0,2 M Na ₂ HPO ₄	B törzsoldat: 0,1 M citromsav
4	19,275 ml	30,725 ml

NaCl hatása a hőstabilitásra

A killer *D. hansenii* törzs YPD tápoldatban, illetve 8% nátrium-kloridot tartalmazó YPD tápoldatban termelt fermentlevét hőkezeltük 24 órán át 25, illetve 37 °C-on. A *C. tropicalis* CBS 94 törzs 24 órás tenyészetéből YPD táplemezen masszív oltást készítettünk, majd a kezelés kezdetétől számítva 5, illetve 24 órával kicsepegtettük 5 µl-t a fermentlevekből. A csészéket 48 órán át 25 °C-on sötétben inkubáltuk.

Élőcsíraszám meghatározás

A *C. tropicalis* CBS 94 törzs 24 órás YPD tápoldatban nevelt tenyészetéből a sejteket centrifugálással kiülepítettük (5 perc, 5000 rpm), mostuk 1 ml steril desztillált vízzel, majd a sejtszámot Bürker-kamrában állapítottuk meg. A kísérlethez 10^6 darab sejtet oltottunk le 0,5 ml toxin-tartalmú valamint 0,5 ml 8% nátrium-kloriddal kiegészített toxint tartalmazó fermentlébe. Kontrollként 10^6 sejtet oltottunk 0,5 ml YPD valamint 0,5 ml 8% NaCl-tartalmú YPD tápoldatba. A mintákat 24 órán át rázatás nélkül inkubáltunk 25 °C-on és 37 °C-on.

Az inkubációs idő elteltével mintákból a sejteket kiülepítettük (5 perc, 5000 rpm), majd tízes léptékű hígítási sort készítettünk. A hígítási sorok 10^2 , 10^3 és 10^4 léptékű hígításaiból 25 µl-t szélesztettük ki YPD táptalajra 3-3 párhuzamosban. A csészéket 30 °C-on 72 órán át inkubáltuk, majd megszámoltuk a telepeket.

A toxin hatásának vizsgálata *C. tropicalis* sejtekre áramlási citometria alkalmazásával

A *C. tropicalis* CBS 94 törzs 24 órás YPD tápoldatban nevelt tenyészetéből a sejteket centrifugálással kiülepítettük (5 perc, 5000 rpm), mostuk 1 ml steril desztillált vízzel, majd a sejtszámot Bürker-kamrában megszámoltuk. A kísérlethez 10^6 darab sejtet oltottunk le 1 ml toxin-tartalmú fermentlébe valamint 1 ml YPD tápoldatba (kontroll minta), majd 24 órát inkubáltuk a mintákat 25 °C-on.

Az inkubációs idő elteltével a mintákat centrifugáltuk (10.000 rpm, 5 perc, szobahőmérséklet), majd a sejteket desztillált vízben felfuszpendáltuk. Az YPD tápoldatban inkubált sejteket 3 egyenlő részre osztottuk. A mintákat ismét centrifugáltuk. Az egyik kontroll minta sejtjeit 100 µl PBS-ben felfuszpendáltuk és nem festettük, a másik kontroll sejtjeit 1 ml 70%-os etanollal kezeltük 1 órán át, a maradék 2 minta sejtjeit PBS-sel mostuk. A 3 festeni kívánt mintát felvettük 100 µl 5 µg/ml-es propidium-jodid oldatban, és sötétben, 25 °C-os termosztátban 10 percen át festettük, majd centrifugáltuk a mintákat (10.000 rpm, 5 perc, szobahőmérséklet) és felvettük őket 100 µl PBS-ben. Az így kapott 4 mintában (festetlen kontroll, festett kontroll, etanol-kezelt és festett kontroll, toxin-kezelt és festett minta) áramlási citométerrel vizsgáltuk 10.000 sejt propidium-jodiddal történt festődését.

MALDI-TOF analízis

A *D. hansenii* két törzse, az SZMC 26738 killer törzs és az SZMC 27788 nem killer törzs által YPD tápoldatban termelt fermentlevet 50 és 30 kDa-os centrifuga szűrőkkel frakcionáltuk. A két minta 30 és 50 kDa közé eső frakcióinak MALDI-TOF analízisét a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Proteomikai kutatócsoportja végezte el.

Sejtfal festése

A *C. tropicalis* CBS 94 törzs 24 órás YPD tápoldatban nevelt tenyészetéből a sejteket centrifugálással kiülepítettük (5 perc, 5000 rpm), mostuk 1 ml steril desztillált vízzel, majd a sejtszámot Bürker-kamrában megszámloltuk. A kísérlethez 10^6 darab sejtet oltottunk le 1-1ml YPD tápoldatba és a toxin-tartalmú fermentlébe; 5 órát inkubáltuk a mintákat 25 °C-os termosztátban. A sejteket centrifugáltuk (10.000 rpm, 5 perc, szobahőmérséklet), a felülúszót leöntöttük, majd PBS-ben mostuk a sejteket. A csőben maradt folyadékban felszuszpendáltuk a sejteket, ezután 5 µg/ml-es Kalkofluor fehér festéket adtunk hozzá 1:1 arányban, és fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk a mintákat (350 nm excitációs és 432 nm emissziós szűrővel). Mintánként 50 különálló festődött sejt fluoreszcenciáját mértük meg számszerűsítve FiJi (ImageJ) szoftver segítségével.

Kitináz aktivitás vizsgálata

Kolloid kitint tartalmazó táplemezre oltottuk a killer *D. hansenii* törzset és 7 napig növesztettük 25 °C-os termosztátban.

A 7 napos 25 °C-os inkubálást követően a csészékre 10 ml Kongó Vörös oldatot pipettáztunk, majd ezt követően 1 órás inkubáció után a festékoldatot leöntöttük. Ezután a csészékre 10 ml 1 M NaCl oldatot pipettáztunk, amit ismét 1 óra inkubáció követett. A NaCl leöntése után a csészéket vízzel mostuk és vizuálisan detektáltuk az eredményt.

A toxin hatása *C. tropicalis* által képzett biofilmre

C. tropicalis CBS 94 törzs YPD tápoldatban nevelt 24 órás tenyészetéből 5×10^4 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk AIM tápoldatban. A szuszpenzióból 100 µl-t pipettáztunk két darab 96 lyukú mikrotiterlap zsebeibe. Az egyik mikrotiterlapot 25, míg a másikat 37 °C-os 5% szén-dioxidot tartalmazó termosztátba helyeztük és 72 órát inkubáltuk, hogy a sejtek kitapadjanak a mikrotiterlap felszínére. A kialakult biofilmeket kétszer mostuk 100 µl PBS-sel, majd 24 órán át kezeltük 25, illetve 37 °C-on a következő anyagokkal: 100 µl toxin-tartalmú fermentlé, 100 µl toxin-tartalmú fermentlé 8% NaCl-dal kiegészítve, 100 µl YPD tápoldat valamint 100 µl YPD tápoldat 8% NaCl-dal kiegészítve. A 24 órás kezelést követően a mintákat kétszer mostuk 100 µl PBS-sel, majd a biofilmekre 100 µl 0,5 mg/ml XTT és 1 µM menadion tartalmú PBS oldatot pipettáztunk. A mintákat 2 órára 25 illetve 37 °C-os termosztátba helyeztük. Az inkubációs idő után a felülúszóból 80 µl-ke új zsebekbe pipettáztunk és fotométerrel megmértük az optikai denzitást 490 nm-en. A vizsgálatokat 5 biológiai párhuzamossal végeztük el.

Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

A *D. hansenii* fermentlevéből háromféle mintát készítettünk, 1 µl, 2 µl, illetve 3 µl mennyiséget AIM tápoldattal egészítettünk ki 10 µl-re. Ezután 10 µl 2x loading oldatot adtunk a mintákhoz. A gél zsebeibe felvittünk 15 µl-t az előkészített mintákból, valamint egy zsebbe 5 µl fehérje molekulasúly markert (Invitrogen SeeBlue plus 2 prestained standard (1x)) pipettáztunk, majd 1x NuPAGE MES SDS pufferben megfuttattuk a gél (kezdetben 5 perc 90 V, ezután 35 perc 200 V feszültségen).

Futást követően a gél Coomassie Brilliant Blue festékkoldattal festettük enyhe rázatás közben 20 percen át, majd festékmentesítő oldattal addig mostuk a gél, amíg a felesleges festékmennyiség ki nem oldódott belőle.

Eredmények és értékelésük

Hatásspektrum vizsgálat

A vizsgált humánpatogén és élelmiszerromlást okozó élesztőgombák közül 7 faj 10 törzse bizonyult szenzitívnek a *D. hansenii* által termelt killer toxinra (3. táblázat). Az érzékeny törzsek közül a széles gátlási zónát adó, humánpatogén *C. tropicalis* CBS 94 törzset használtuk a későbbi vizsgálatok során. A killer törzs körül kialakult gátlási zóna peremén az elpusztult sejtekben felhalmozódó metilénkéék miatt kék gyűrű alakult ki (2. ábra), ez alapján a toxin pórusképző sajátosságú, mivel a metilénkéék az elpusztult sejtekbe diffundál és azokat kéken megfesti.



2. ábra *D. hansenii* SZMC 26738 törzs killer aktivitása *C. tropicalis* CBS 94 pázsiton.

A nyíl a metilénkéékkel festődött elpusztult sejteket jelöli.

A NaCl hatása a toxin hőstabilitására

Korábbi vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy a toxin hőmérséklet érzékeny (40 °C-on 60 perc inkubációt követően jelentősen csökkent az aktivitása). Kimutattuk továbbá, hogy 8% nátrium-klorid jelenlétében fokozott aktivitással bír.

Vizsgáltuk, hogy a NaCl jelenléte a toxin hőstabilitására hatással van-e. Megállapítottuk, hogy a 8% nátrium-kloridot tartalmazó fermentlé aktív maradt 24 óra a 37 °C-on történő hőkezelés után is, míg a NaCl-ot nem tartalmazó fermentlé elvesztette aktivitását. A 25 °C-on kezelt NaCl-t tartalmazó illetve nem-tartalmazó fermentlék közel azonos aktivitást mutattak 24 óra inkubáció után.

3. táblázat *D. hansenii* killer aktivitása, YPD táptalajon, 48 órán át 25 °C-on végzett inkubálást követően.

Faj	Törzsszám	gátlási zóna
<i>Debaryomyces prosopidis</i>	SZMC 26708	+
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	-
<i>Candida albicans</i>	SC 5314	-
<i>Candida albicans</i>	SZMC 1458	-
<i>Candida auris</i>	0381	-
<i>Candida deformans</i>	SZMC 26745	+
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987	-
<i>Candida glabrata</i>	CBS 138	+
<i>Candida globosa</i>	SZMC 26734	+
<i>Candida krusei</i>	CBS 573	-
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 604	-
<i>Candida tropicalis</i>	CBS 94	+++
<i>Candida tropicalis</i>	SZMC 1366	+++
<i>Candida tropicalis</i>	SZMC 1410	+++
<i>Candida tropicalis</i>	SZMC 9092	+++
<i>Candida zeylanoides</i>	SZMC 26714	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	IFM 5844	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	IFO 410	-
<i>Cutaneotrichosporon curvatus</i>	SZMC 26710	-
<i>Lachancea fermentati</i>	CBS 707	-
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	CBS 1072	-
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ATCC 9533	-
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	SZMC 0004	-
<i>Trichophyton tonsurans</i>	ATCC 28942	-
<i>Yarrowia galli</i>	SZMC 26730	+
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	CBS 4688	-
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	CBS 684	-
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CBS 441	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	SZMC 27782	+++

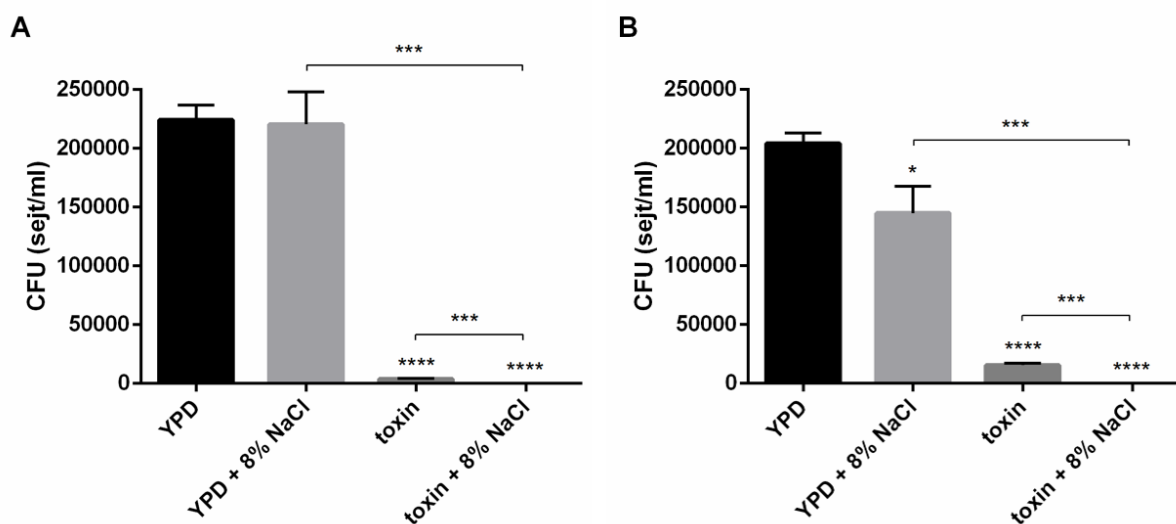
ATCC: American Type Culture Collection, CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, IFM: Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, IFO: Institute for Fermentation, Osaka, Japan, SC: Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, New Jersey, USA, SZMC: Szeged Microbiology Collection

-: nincs gátlás, +: keskeny gátlási zóna, +++: széles gátlási zóna

A toxin hatása a *C. tropicalis* élő csíraszámára

A toxin hatását a *C. tropicalis* élőcsíraszámára 8% NaCl-ot tartalmazó, valamint NaCl-mentes fermentlében is vizsgáltuk 25, illetve 37 °C-on 24 órás kezelés után. Kontrollként YPD tápoldatban, illetve 8% NaCl-tartalmú YPD tápoldatban inkubáltuk a sejteket.

Megállapítottuk, hogy a toxint tartalmazó fermentlé szignifikánsan csökkentette az élőcsíraszámot mind 25, mind 37 °C-on (3. ábra). Eredményeink azt bizonyították, hogy a toxin hatását a 8% NaCl szignifikánsan növelte mindkét hőmérsékleten (3. ábra). A csíraszám jelentősen csökkent 37 °C-on a 25 °C-hoz képest 8% NaCl tartalmú YPD tápoldat jelenlétében. (3. ábra) 37 °C-on kevésbé aktív a toxin, mivel ekkor stabilitása csökken. (3. ábra)

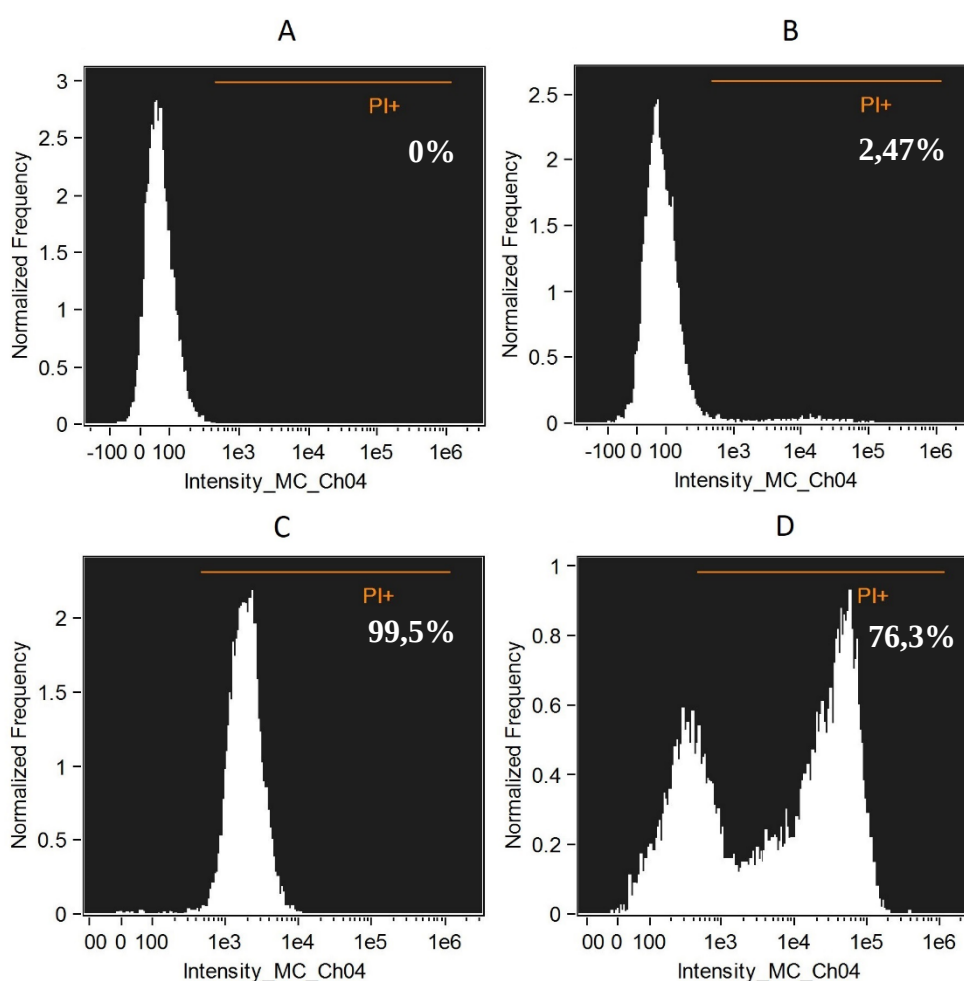


3. ábra. A *D. hansenii* toxin hatása *C. tropicalis* CBS 94 élő csíraszámára

A: 25 °C-on történt 24 órás inkubáció után, B: 37 °C-on történt 24 órás inkubáció
(CFU: colony forming unit, telepképző egységek száma, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$,
**** $p \leq 0,0001$, független mintás *t* próba)

A *D. hansenii* toxin tartalmú fermentlé hatása *C. tropicalis* CBS 94 sejtekre - áramlási citometria

Áramlási citometriával vizsgáltuk, hogy 24 órás 25 °C-on történő toxin tartalmú fermentlében történő inkubáció után a *C. tropicalis* sejtek hány százaléka pusztul el a kezelés hatására. Az elpusztult sejteket propidium-jodidos festéssel különítettük el az élő sejtektől. Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a toxin citikus hatású, az érzékeny *C. tropicalis* CBS 94 törzs sejtjeit elpusztítja, mert a toxin-kezelés után a sejtek 76,3% festődött propidium-jodiddal, tehát elpusztult, ezzel szemben a kontroll mintában a sejtek mindössze 2,47% mutatott propidium-jodid festődést, amely a természetes sejthalálozás következménye (4. ábra).



4. ábra *D. hansenii* killer toxinnal 24 órán át 25 °C-on kezelt *C. tropicalis* CBS 94 sejtek áramlási citometriai elemzése.

A festetlen kontroll minta, **B** festett kontroll minta, **C** etanolos kezelés utáni minta, **D** toxin tartalmú fermentlével kezelt minta. A vízszintes tengely a fényintenzitást, a függőleges tengely pedig az egyes intenzitások gyakoriságát jelzi. Az ábrákon lévő számok jelzik a populációban a festett sejtek arányát.

A toxin tisztítása

A toxin tartalmú fermentlevet különböző pórusméretű (10, 30, 50 és 100 kDa) fehérjeszűrőkön tisztítottuk. A frakciók killer aktivitását *C. tropicalis* CBS 94 pázsiton teszteltük. A minták közül csak a 30-50 kDa mérettartományú fehérje frakció rendelkezett killer aktivitással, a többi frakció esetén nem tudtunk aktivitást kimutatni.

A 30-50 kDa frakciót denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk tovább. A gélen több fehérjesáv is detektálható volt ebben a tartományban.

MALDI-TOF analízis

Annak eldöntésére, hogy a gélelektroforézissel detektált fehérjék közül melyik lehet maga a killer toxin, egy killer aktivitást nem mutató *D. hansenii* törzs (SZMC 27788) fermentlevének 30-50 kDa frakcióját is elkészítettük. Mindkét 30-50 kDa frakciót (toxin-tartalmú illetve toxint nem tartalmazó) elküldtük fehérjeanalízisre a Szegedi Biológiai Központ Proteomikai Kutatócsoportjához.

A toxin tartalmú fermentlében több olyan fehérjét azonosítottak, melyeknek a sejtfalbontásban van szerepük, így két kitináz enzimet, 1 exo- valamint 1 endoglükánázt (4. táblázat), melyek a toxikus aktivitást nem mutató fermentlében nem voltak kimutathatók.

4. táblázat. Toxin-tartalmú *D. hansenii* fermentlében MALDI-TOF analízissel kimutatott fehérjék, molekulásúlyuk, valamint az őket kódoló gének és a szekvenciahomológok (Az NCBI adatbázis BLAST szoftverének felhasználásával).

Gén	fehérje molsúly (Da)	Fehérje	szekvenciahomológia
DEHA2F25344g	25593.9	DEHA2F25344p	<i>C. albicans</i> RBT4 fehérje, élesztő-fonális átmenetkor expresszálódik
DEHA2D08426g	48620.4	DEHA2D08426p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EXG1 exo-1,3- β -glükánáz
DEHA2C05852g	17320.5	DEHA2C05852p	<i>S. cerevisiae</i> glükóz transzporter
DEHA2D00924g	57381.2	Kitináz	
DEHA2G05984g	46210.6	Kitináz	
DEHA2G18766g	33752.5	DEHA2G18766p	<i>S. cerevisiae</i> BGL2 endo-1,3- β -glükánáz
DEHA2A14366g	52741.6	DEHA2A14366p	<i>C. albicans</i> sejtfal fehérje, funkciója a sejtali glükán bemutatása az immunsejteknek

Kitináz aktivitás kimutatása

A MALDI_TOF analízis kitináz enzimek jelenlétét mutatta ki a toxikus aktivitást mutató fermentlében, ezért vizsgáltuk a törzs kitináz aktivitását kolloid kitint tartalmazó táptalajon. A telep körül megjelenő bontási zóna megjelenése azt bizonyította (5. ábra), hogy a törzs valóban rendelkezik kitináz aktivitással.

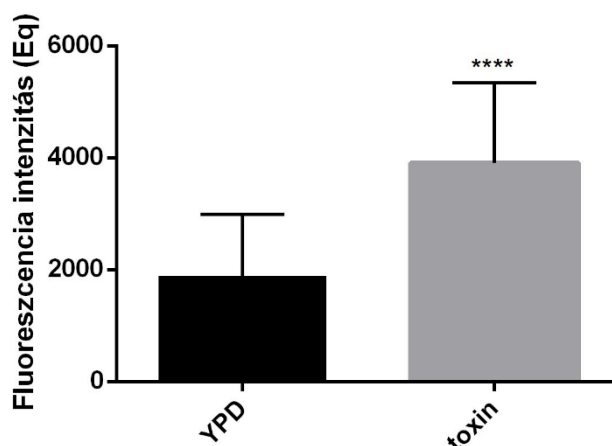


5. ábra Killer *D. hansenii* törzs kitináz aktivitása kitin tartalmú táptalajon.

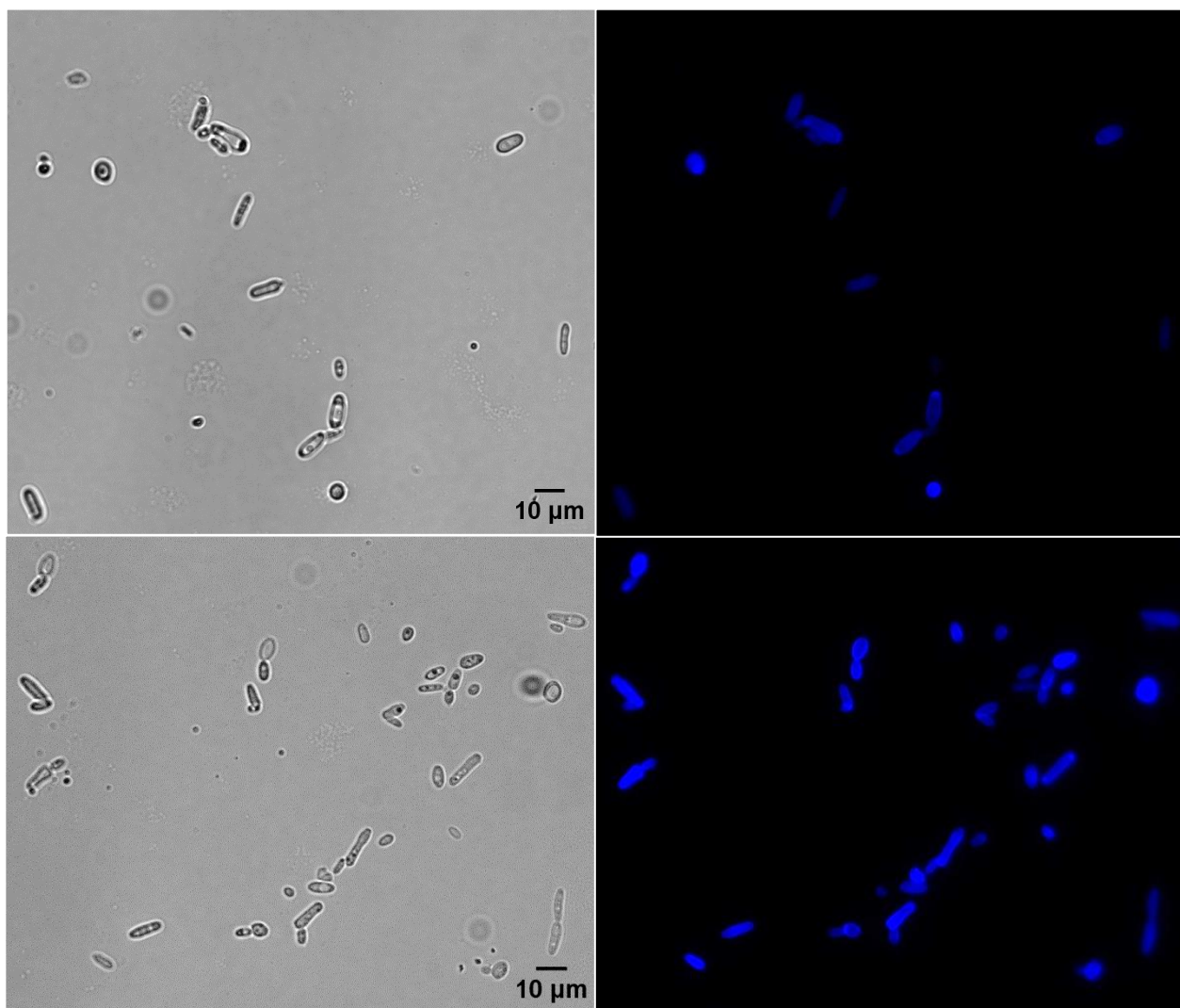
A nyíl a telep körüli bontási zónát mutatja.

C. tropicalis sejtek Kalkofluor fehér festése

A toxin-kezelt és nem kezelt *C. tropicalis* sejteket calcofluor white festékkel festettük, mely a sejtfalban lévő kitin molekulákhoz kapcsolódik. Azt tapasztaltuk, hogy a toxinnal kezelt sejtek szignifikánsan intenzívebb fluoreszcenciát mutattak a kontrollhoz képest (6. és 7. ábra), melynek az lehet az oka, hogy a toxikus aktivitású fermentlében található enzimek a sejtfal fellazulását okozták, amely miatt a festék molekulák könnyebben tudnak kötődni a mélyebb rétegekben található sejtfalkomponensekhez.



6. ábra Kontroll valamint toxinnal kezelt sejtek Kalkofluor Fehér festés utáni fluoreszcenciája (** $p \leq 0,0001$, független mintás t -próba)**



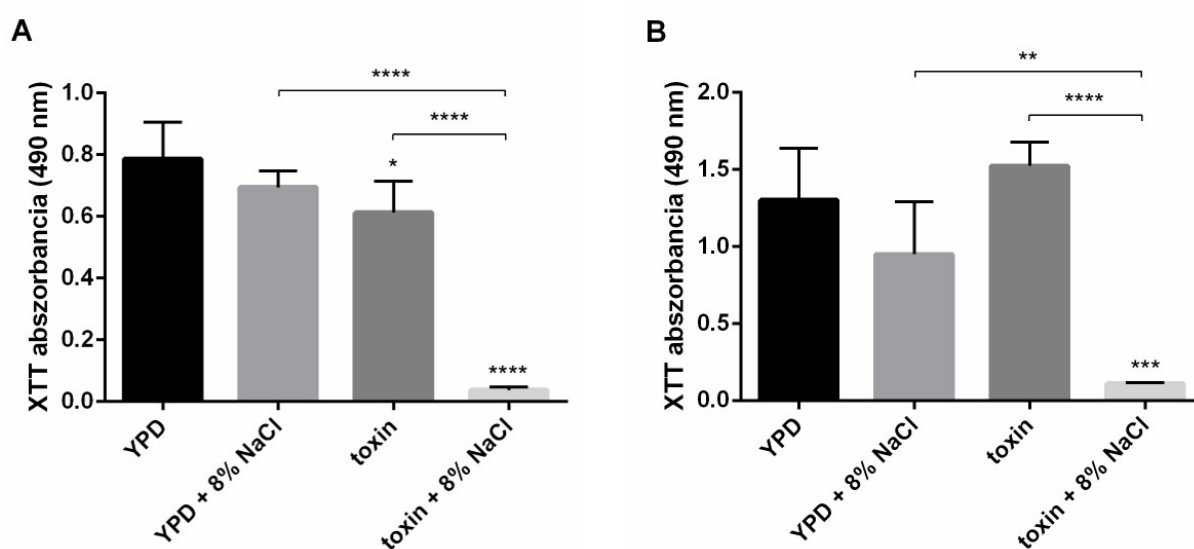
7. ábra Kontroll (felső sor) és toxinkezelt (alsó sor) *C. tropicalis* CBS 94 sejtek fluoreszcens mikroszkópos képe.

Látható fényben (A, C) valamint Kalkofluor Fehér festés után UV-fényben (B, D)
(A méretskála 10 µm hosszt reprezentál)

A toxin hatása *C. tropicalis* biofilm degradációjára

Az érzékeny törzsként használt *C. tropicalis* képes biofilm képzésre. A biofilmekben lévő sejtek igen ellenállóak gomba-ellenes szerekkel szemben, így elpusztításuk kihívás elé állítja a klinikusokat. Munkánk során vizsgáltuk, hogy a *D. hansenii* toxin-tartalmú fermentlé képes-e a már kialakult biofilm bontására. XTT kromogén szubsztrát alkalmazásával a biofilmet alkotó sejtek metabolikus aktivitása detektálható. A metabolikusan aktív biofilm élő sejtjei redukálják az XTT szubsztrátot, amelynek narancsszínű terméke színváltozást okoz, amit spektrofotométerrel detektálni tudunk. Az így a kapott abszorbanca-érték arányos a biofilmben lévő sejtek számával és metabolikus aktivitásával.

Eredményeink azt mutatták, hogy a 8% nátrium-kloriddal kiegészített toxint tartalmazó fermentlé szignifikánsan csökkentette a biofilmet alkotó sejtek életképességét a kontrollokhoz és a toxin tartalmú fermentléhez képest mindkét hőmérsékleten (8. ábra).



8. ábra Toxin-tartalmú fermentlé és 8% NaCl-dal kiegészített toxin-tartalmú fermentlé hatása *C. tropicalis* CBS 94 biofilmre 25 (B) és 37 °C-on (A). (* $p \leq 0,1$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$, független mintás t próba)

Összefoglalás

Mikroba közösségek kialakulásában döntő hatása van a mikrobák közt kialakuló kölcsönhatásoknak. A jó antagonista képességekkel rendelkező fajok válnak a közösség meghatározó tényezőivé, domináns képviselőivé. Élesztőgombák közt a versengés megnyilvánulhat nem-specifikus, illetve specifikus anyagok termelésével. Specifikus gátlóanyagok a killer toxinok. A killer toxinok fehérje természetű vegyületek (fehérjék vagy glikoproteinek), amelyek a környezetbe jutva gátolják a szenzitív törzsek növekedését vagy elpusztítják azokat.

Az ismert gombafajok közül elenyészően kevés képes humán megbetegedést okozni, ám ezek növekvő közegészségügyi problémát jelentenek. Ennek egyik oka, hogy a rendelkezésre álló antifungális hatóanyagok száma kevés, és egyre gyakoribb az ezen anyagokra rezisztens törzsek megjelenése. A természetes eredetű antifungális szerek iránt ezért egyre nagyobb érdeklődés irányul.

Munkánk során a *D. hansenii* SZMC 26738 törzs által termelt killer toxin vizsgálatát végeztük el. Megállapítottuk, hogy a toxin széles hatásspektrumú, a vizsgált 22 faj közül 7 bizonyult érzékenynek. Az egyik legmagasabb mortalitású mikózist okozó *C. tropicalis* több törzse is érzékenynek mutatkozott a toxinra, széles gátlási zónát adva a termelő törzs körül, ezért vizsgálataink során ennek a *C. tropicalis* CBS 94 törzsével dolgoztunk tovább. Megállapítottuk, hogy 8% nátrium-klorid fokozza a toxin hőstabilitását, jelenlétében a toxin 37 °C-on 24 óra múlva is megtartotta az aktivitását. A toxin cidikus hatású, az érzékeny sejtek pusztulását okozza, amit az áramlási citometriás mérés bizonyított, csökkentette továbbá az élő csíraszámot, amit a telepképző egységek toxin-kezelés utáni számának csökkenésével igazoltunk.

Az antifungális hatással rendelkező szerek képesek gátolni a biofilmek felépülését, ugyanakkor a már kialakult biofilmekre nincsenek hatással. A biofilmet alkotó sejtek is rezisztenciát mutatnak számos, a plaktonikus sejtek ellen hatékony vegyülettel szemben. Ugyanakkor a *D. hansenii* SZMC 26738 toxin képes a *C. tropicalis* CBS 94 törzs által kialakított biofilmet szignifikáns mértékben degradálni emberi maghőmérsékleten nátrium-klorid jelenlétében. A toxin tisztítása során megállapítottuk, hogy mérete a 30-50 kDa tartományba esik, ez a frakció azonban több fehérjesávot is tartalmazott. A toxin-tartalmú mintából MALDI-TOF komparatív analízissel kimutatott fehérjék között találtunk kitináz, valamint exo- és endoglukanáz aktivitású fehérjéket. Ezen enzimek képesek a sejtfal

fellazítására, ezt a feltevést támasztja alá, hogy a toxinnal kezelt sejtek Kalkofluor Fehér festés során intenzívebben festődtek a kontrollhoz képest. Elképzelhető, hogy a sejtfal fellazításának/bontásának következtében a toxinnal kezelt sejtek ozmótikusan érzékenyebbé válnak és megfelelő ozmótikus stabilizátor hiányában elpusztulnak. Így valószínűsíthető, hogy a *D. hansenii* SZMC 26738 törzs esetén a killer aktivitást nem egy specifikus toxin, hanem egy sejtfalbontó enzim okozza.

Ennek bizonyítására tervezzük a toxin fermentléből való tisztítását, valamint a MALDI-TOF analízissel azonosított, sejtfalbontásban szerepet játszó gének mutációját és vizsgálni ennek hatását a killer fenotípusra.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba professzor úrnak, hogy lehetőséget biztosított a SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékén a TDK dolgozatunk elkészítésére.

Sok köszönettel tartozunk témavezetőknek, Dr. Pfeiffer Ilonának, aki határtalan segítséget nyújtott a dolgozat tárgyát képező munkánk elvégzésében és instruálásában, valamint végtelen türelemmel segített nekünk a dolgozat háttérirodalmának megértésében és érdemi feldolgozásában.

Szeretnénk megköszönni Szerencsés Bettinának és Dr. Papp Csabának a munkánk során nyújtott segítségért és tanácsokért.

Továbbá mindenkinek köszönettel tartozunk, aki előre lendítette vagy lehetővé tette a dolgozatunk elkészülését.

Irodalomjegyzék

1. Gácsér, A., & Papp, T.: *Humánpatogén gombák biológiája*. Szeged, Magyarország. (2015).
2. Richardson, M. D. *Opportunistic and pathogenic fungi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28(suppl A), 1–11. (1991).
3. Janbon, G., Quintin, J., Lanternier, F., & Christophe d'Enfert. *Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches*. *Microbes and Infection*. (2019).
4. Seyedmousavi, S., Bosco, S. de M. G., de Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R.R., & Guillot, J. *Fungal infections in animals: a patchwork of different situations*. *Medical Mycology*, 56(suppl_1), S165–S187. (2018).
5. De Pauw, B.E. *WHAT ARE FUNGAL INFECTIONS?* *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 3(1), e2011001. (2011).
6. Lass-Flörl, C. *Current Challenges in the Diagnosis of Fungal Infections*. *Human Fungal Pathogen Identification*, 3–15. (2016).
7. Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G., & White, T.C. *Hidden Killers: Human Fungal Infections*. *Science Translational Medicine*, 4(165), 165rv13–165rv13. (2012).
8. Friedman, D.Z.P. & Schwartz, I.S.. *Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens*. *Journal of Fungi*, 5(3), 67. (2019).
9. Kumamoto, C.A., Gresnigt, M.S., & Hube, B. *The gut, the bad and the harmless: Candida albicans as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine*. *Current Opinion in Microbiology*, 56, 7–15. (2020).
10. Silva, S, Negri, M., Henriques, M, Oliveira, R.,Williams, D.W., & Azeredo, J. *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance*, *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288–305. (2012).
11. Chai, L.Y.A, Denning, D.W., & Warn, P. *Candida tropicalis in human disease*. *Crit Rev Microbiol.* , 36(4), 282–298. (2010).
12. Gonzalez-Lara, M. F., Sifuentes-Osornio, J., & Ostrosky-Zeichner, L. *Drugs in Clinical Development for Fungal Infections*. *Drugs*, 77(14), 1505–1518. (2017).
13. Golubev, W. I. (n.d.). *Antagonistic Interactions Among Yeasts*. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, (szerkesztette: Péter, G., Rosa, C.) 197–219. (2006).

14. El-Banna, A., Malak A. El-Sahn & Shehata, M. G. *Yeasts Producing Killer Toxins: An Overview. Alexandria Journal of Food Science and Technology*. 8(2), 41–53 (2011).
15. Bijender K. B., & Satbir S.. *Biology of Killer Yeast and Technological Implications. Yeast Diversity in Human Welfare*. Springer, Berlin, Heidelberg (szerkesztette: Satyanarayana, T., Kunze, G.) 163-190 (2017).
16. Schaffrath, R., Meinhardt, F., & Klassen, R. *Yeast Killer Toxins: Fundamentals and Applications. Physiology and Genetics*, 87–118. (2018).
17. Al-Qaysi, S. A. S., Al-Haideri, H., Thabit, Z. A. Al-Kubaisy, W. H. A. A., & Ibrahim, J. A. A. *Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of Mycocin Produced by Debaryomyces hansenii DSMZ70238. International Journal of Microbiology*. 30. Article ID 2605382 (2017).
18. Ramírez C., & Rhaisa. A. *Studies of Debaryomyces hansenii killer toxin and its effect on pathogenic bloodstream Candida isolates. University of NebraskaLincoln. Dissertations & Theses in Food Science and Technology*, 72. (2016).
19. Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Ciani, M. *Yeast killer toxins: from ecological significance to application. Critical Reviews in Biotechnology*, 1–15. (2019).
20. Polonelli, L., Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., & Bertolotti, D. *Yeast killer systems. Clinical Microbiology Reviews*. 10(3), 369–400 (1997).
21. Liu, G.-L., Chi, Z., Wang, G.-Y., Wang, Z.-P., Li, Y., & Chi, Z.-M. *Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2), 222–234. (2013).
22. Breuer, U., & Harms, H. *Debaryomyces hansenii — an extremophilic yeast with biotechnological potential. Science*. 23(6), 415–437. (2006).
23. Kumamoto, C. A., & Romo, J. A. *Debaryomyces, the Achilles heel of wound repair. Cell Host & Microbe*, 29(5), 740–741. (2021).
24. Strucko, T., Andersen, N. L., Mahler, M. R., Martínez, J. L., Mortensen, U. H. A *CRISPR/Cas9 method facilitates efficient oligo-mediated gene editing in Debaryomyces hansenii. Synthetic Biology*, Volume 6, Issue 1, (2021).
25. Sibirny, A. A., & Voronovsky, A. Y. *Candida famata (Debaryomyces hansenii). Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, 85–111. (2009).
26. Pérez-Través, L., de Llanos, R., Flockhart, A., García-Domingo, L., Groenewald, M., Pérez-Torrado, R., & Querol, A. *Virulence related traits in yeast species associated with*

- food; *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, and *Wickerhamomyces anomalus*. *Food Control*, 124, 107901. (2021).
27. Banjara, N., Nickerson, K. W., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. *Killer toxin from several food-derived Debaryomyces hansenii strains effective against pathogenic Candida yeasts. International Journal of Food Microbiology*. 222, 23– 29 (2016).
 28. Ochangco, H. S., Gamero, A., Smith, I. M., Christensen, J. E., Jespersen, L., & Arneborg, N. *In vitro investigation of Debaryomyces hansenii strains for potential probiotic properties. World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(9). (2016).
 29. Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J., & Loureiro-Dias, M. C. *Effects of salts on Debaryomyces hansenii and Saccharomyces cerevisiae under stress conditions. International Journal of Food Microbiology*, 56(2-3), 191–197. (2000).
 30. Ramos-Moreno, L., Ruiz-Pérez, F., Rodríguez-Castro, E., & Ramos, J. *Debaryomyces hansenii Is a Real Tool to Improve a Diversity of Characteristics in Sausages and Dry-Meat Products. Microorganisms*, 9(7), 1512. (2021).
 31. Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. *The halotolerant Debaryomyces hansenii, the Cinderella of non-conventional yeasts. Yeast*, 33(10), 523–533. (2016).
 32. Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Cepeda-Palacios, R., Tovar-Ramírez, D., Esteban, M. Á., & Angulo, C. *Probiotic effects of marine Debaryomyces hansenii CBS 8339 on innate immune and antioxidant parameters in newborn goats. Applied Microbiology and Biotechnology*. (2019).
 33. Bäumlisberger, M., Moelleken, U., König, H., & Claus, H. *The Potential of the Yeast Debaryomyces hansenii H525 to Degrade Biogenic Amines in Food. Microorganisms*, 3(4), 839–850. (2015).
 34. Czarnecka, M., Żarowska, B., Połomska, X., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. *Role of biocontrol yeasts Debaryomyces hansenii and Wickerhamomyces anomalus in plants' defence mechanisms against Monilinia fructicola in apple fruits. Food Microbiology*. (2019).
 35. Çorbacı, C., Uçar, F. B. *Production and Optimization of Killer Toxin in Debaryomyces hansenii Strains. Biological and Applied Sciences. Braz. arch. biol. technol.* 60. (2017).
 36. Morales-Menchén, A., Navarro-García, F., Guirao-Abad, J. P., Román, E., Prieto, D., Coman, I. V., Alonso-Monge, R. *Non-canonical Activities of Hog1 Control Sensitivity of Candida albicans to Killer Toxins From Debaryomyces hansenii. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. (2018).

37. Marquina, D., Barroso, J., Santos, A., & Peinado, J. M. *Production and characteristics of Debaryomyces hansenii killer toxin. Microbiological Research.* 156(4), 387–391. (2001).
38. Çorbacı, C., & Uçar, F. B. *Purification, characterization and in vivo biocontrol efficiency of killer toxins from Debaryomyces hansenii strains. International Journal of Biological Macromolecules,* 119, 1077–1082. (2018).
39. Czarnecka, M., Połomska, X., Restuccia, C., Żarowska, B. *The Role of Plasma Membrane Pleiotropic Drug Resistance Transporters in the Killer Activity of Debaryomyces hansenii and Wickerhamomyces anomalus Toxins. Toxins,* 14(3), 180. (2022).
40. Wasi, M., Khandelwal, N. K., Vishwakarma, P., Lynn, A. M., Mondal, A. K., & Prasad, R. *Inventory of ABC proteins and their putative role in salt and drug tolerance in Debaryomyces hansenii. Gene,* 676, 227–242. (2018).
41. Németh, N. *Debaryomyces hansenii törzsek killer toxinjainak jellemzése. Szakdolgozat, SZTE TTIK* (2020)

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Merber Richárd (MR) és Németh Nelli (NN) nyilatkozunk, hogy a 2022-es Biológia TDK tavaszi fordulójára benyújtott, „Egy újonnan izolált *Debaryomyces hansenii* törzs killer aktivitásának vizsgálata” című dolgozatunkban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettünk részt:

Rész/feladat	Felkészítés után önállóan végeztem a dolgozatomhoz szükséges mennyiségben (%)	Folyamatos segítséggel végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%)
Törzsek fenntartása ¹	70 (MR) 80 (NN)	0
Fermentlé termeltetése ²	50 (MR) 50 (NN)	0
Hatásspektrum vizsgálat ³	80 (NN)	20 (NN)
Hőstabilitási vizsgálat ⁴	80 (MR)	20 (MR)
Élő csíraszám meghatározás ⁴	90 (MR)	0
Áramlási citometria ⁵	70 (MR)	0
Gélelektroforézis ⁵	60 (NN)	40 (NN)
Méretmeghatározás szűrőkkel ⁶	30 (MR) 80 (NN)	0 (MR) 20 (NN)
Mikroszkópozás/sejtfal festés ⁵	80 (MR) 80 (NN)	0
biofilmképzés ⁵	60 (MR)	40 (NN)
Ábra készítés ⁵	50 (MR)	50 (MR)

1 A törzsek fenntartása során a tenyészeteket legnagyobb mennyiségben mi tartottuk fenn, esetenként a témavezetőnk végezte el az átoltásokat.

2 A fermentlevek termeltetését legtöbb esetben mi végeztük, viszont a liofilizálást teljes egészében témavezetőnk végezte.

3 A hatásspektrum vizsgálatot kizárólag Németh Nelli végezte témavezetői segítséggel.

4 A vizsgálatot főleg Merber Richárd végezte témavezetői segítséggel.

5 A feladatot Merber Richárd végezte témavezető, illetve munkatárs segítségével.

6 A munkát Németh Nelli és Merber Richárd végezte különböző mértékű munkatárs és témavezető segítségével.

Kelt: 2022. április 11.

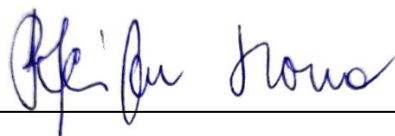


Merber Richárd pályamunkát benyújtó
hallgató



Németh Nelli társszerző

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Dr. Pfeiffer Ilona témavezető,
SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék