

**Baktérium-gomba kölcsönhatások elemzése laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) szubsztrát átszövése és termőtest képzése során**  
Zárójelentés

**Pályázat száma: OTKA K 83764**

**1 A pályázat kérdésfelvetése és célja**

A laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) a fehér korhasztó gombák egyik modell szervezete, amely tápanyagtartalmának és gyógyászati tulajdonságainak köszönhetően az egyik legnépszerűbb termesztett gomba. A laskagombát Európában részlegesen komposztált, pasztörizált és kondicionált búzaszalmán termesztik. Így a gomba növekedése közben találkozunk a termesztési alapanyagban (szubsztrátban) jelen lévő baktériumokkal.

A gombák és baktériumok között kialakuló kapcsolatrendszerek vizsgálata az elmúlt évtizedekben került a tudományos kutatások fókuszába. Munkánk ebbe a területbe kívánt bekapcsolódni, hiszen annak ellenére, hogy már legalább fél évszázada folyik a laskagomba nagyüzemi termesztése, kevés információval rendelkezünk arról, hogy az alapanyag belsejében milyen kapcsolat, kölcsönhatás alakul ki a laskagomba és a baktériumok között.

Munkánk céljai a következők voltak:

- Hogyan változik a laskagomba (*P. ostreatus* HK-35-ös törzse) hifák szerkezete és lignocellulóz-bontó enzimekészlete az alapanyag becsírázásától annak kolonizációján keresztül a termőtestképzésig. Milyen hatással vannak ezen folyamatokra a jelenlévő baktériumok?
- Milyen baktérium-közösségek fordulnak elő az alapanyagban? Milyen hatással van rájuk a laskagomba növekedése?
- Kialakul-e a hifán biofilm, és ha igen, hogyan változik a hifák öregedésével? Előfordulnak-e intrahifális baktériumok?
- A baktériumok kolonizálják-e a gomba primordium és termőtest belsejét, vagy csak az alapanyagban fordulnak elő?

**2 A laskagomba alapanyag-kolonizációjának és növekedésének jellemzése különböző körülmények között**

A laskagomba növekedése során az alapanyag lignocellulóz-tartalmából fedezi tápanyagszükségletét a jelenlévő bakteriális biomasza bontása mellett. Így a lignocellulóz-bontó enzimek aktivitásának mérésével jól lehet követni a gomba növekedését és termőtestképzését, ahogy erre már korábbi vizsgálatok is rámutattak.

A nagyüzemi termesztés során a gombahifákkal való átszövetés az egész szubsztrátban egyenletesen zajlik le. Ebben az alapanyagban természetesen jelen vannak a baktériumok is. A baktériumok hatását indirekt módon azok eltávolításával, sterilizált szubsztrát segítségével tudjuk vizsgálni. E célból, és hogy időben egyszerre tudjuk vizsgálni az átszövetés egyes fázisait laboratóriumi modellrendszer alakítottunk ki. A különbözőképpen kezelt alapanyagot csövekbe töltöttük és egyik végén laskagombacsírával oltottuk be. A csöveket növénynevelőben a nagyüzemi körülményeknek megfelelően inkubáltuk négy hétig, a majdnem teljes kolonizációig. Kísérleteink első szakaszában önmagát az átszövetést

vizsgáltuk, ezért a csöveket még a teljes kolonizáció előtt felnyitottuk, hogy el tudjuk különíteni az át nem szőtt régiót, a kolonizáció határát és a különböző időpontokban átszött régiókat. Későbbiekben már a termőtestképzésre is kíváncsiak voltuk, ezért a csöveket tovább inkubáltuk a teljes átszövetésig. Ezután a körülmények megváltoztatásával indukáltuk a termőtestképzést. Az így inkubált csöveket 8 hét után bontottuk fel, amikor már a nagy részükön több termőtest is megjelent, a csövek oldalán előre vágott lukakon keresztül.

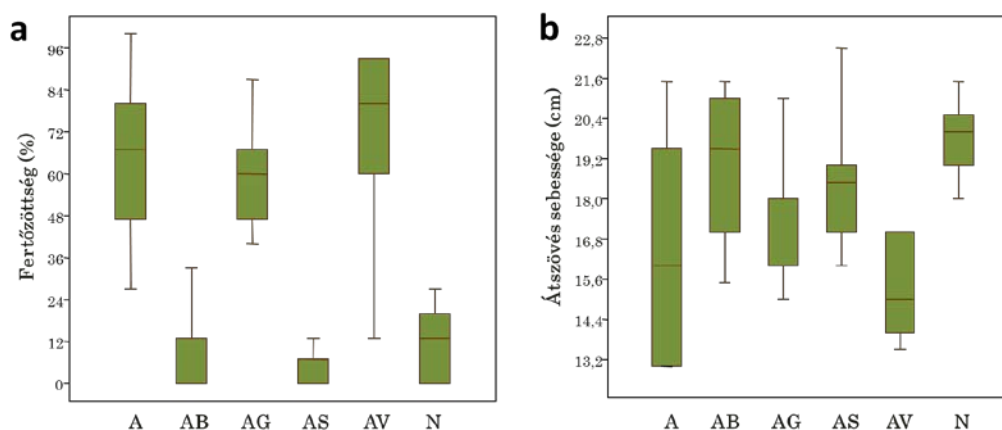
Modellrendszerünkben először a természetes (normál), autoklávban, illetve gamma-sugárzással sterilizált alapanyagon növekvő laskagomba aktivitását hasonlítottuk össze. A ligninbontásban résztvevő lakkáz aktivitása a fronthifák vonalában volt a legnagyobb, majd az aktivitás fokozatosan nagyjából a felére csökkent a régebben átszött régiókban. A ligninbontásban szintén szerepet játszó MnP (mangán peroxidáz) aktivitása az egész átszött régióban nagy volt. A cellulóz- (endocelluláz, cellobiohidroláz és  $\beta$ -glükozidáz) és xilánbontásban (endoxilanáz, xilozidáz) résztvevő enzimek aktivitása a már régebben átszött régiókban a volt legnagyobb, majd folyamatosan csökkent a hifafront felé. A kezelésektől függetlenül az átszövetés minőségében és az enzimaktivitások főbb trendjében nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket. Ezt megerősíti az exokitináz stabil, nagy aktivitása a kezelt és a nem kezelt csövekben is. Az át nem szőtt természetes, nem sterilizált alapanyag enzimaktivitása nagyon kicsi volt. Valószínűsíthető tehát, hogy az átszövetés során a baktériumok nem játszanak közvetlenül jelentős szerepet a lignocellulóz bontásában (Vajna és mtsai, 2012a).

Valószínűleg a különböző kezelések (autoklávozás és gamma-sterilizálás) során megváltozott a szubsztrát szerkezete és kémiai összetétele (pl.: makromolekulák darabolódása). Ezért a következő kísérletben megpróbáltuk kettéválasztani az autoklávval történő sterilizálás szubsztrát-roncsoló és baktérium-mentesítő hatását. A termesztési modellrendszerünkben kész laskagomba alapanyaggal töltöttünk meg csöveket, majd sterilizáltuk őket. Ezután a csövek egy részét visszaoltottuk a kész alapanyagból lerázott baktériumok szuszpenziójával (AB), második részüket ezen szuszpenzió sejtmentes szűrletével (AS), harmadik részüket egy – a laskagomba növekedését Petri csészében gátló (vö. 5.4 pont) – *Bacillus amiloliquefaciens* törzs szuszpenziójával (AG), negyedik részüket pedig – a beoltást ellenőrizendő – steril vízzel (AV). Az összes csövet ezután egyik végükön beoltottuk *P. ostreatus* HK-35 törzsével. Kontrollként normál, nem sterilizált (N) illetve sterilizálás után csak laskagombával beoltott csöveket (A) alkalmaztunk. A csövek első felét a majdnem teljes kolonizációig inkubáltuk, második felükön pedig indukáltuk a termőtestképzést, ahol a primordiumok a csövek oldalán szűrt apró lyukakon tudtak kinőni. A következőket figyeltük meg (Bánfi és mtsai, 2015b; Bánfi és mtsai, összeállítás alatt):

- A sterilizálás hatására a szubsztrát a normál alapanyaghoz képest sokkal érzékenyebb lett a csövek oldalsó lukain keresztül történő befertőződésre (**1/a ábra**), ami egybevág azzal a hagyományos nézettel, hogy az alapanyag mikrobáinak fontos védelmi szerepe van a külső mikroorganizmusokkal szemben. Akkor sem alakult ki újra a „védő” szerep, ha csak egy – amúgy a laskagomba növekedését Petri csészén gátló – baktériummal oltottuk vissza a sterilizált szubsztrátot. Azonban önmagában nem is gátolta ez a baktériumtörzs a gomba növekedését, ami jól jelzi, hogy egy Petri csészén végrehajtott konfrontációs teszt eredménye nem biztos, hogy egy az egyben átültethető egy komplex rendszerbe! Ha viszont a normál termesztőközegről származó baktérium-közösséggel oltottuk vissza a

sterilizált szubsztrátot ismét megfigyelhető volt a „védő” szerep. Ami viszont talán ennél is jelentősebb, hogy ha ezen baktériumok szűrletét alkalmaztuk, szintén csökkent a befertőződés aránya. Vagyis nem is kifejezetten a baktériumok jelenlétére, hanem az általuk termelt és az extracelluláris térbe kiválasztott anyagcseretermékekre volt szükség a „védő” hatás kialakulásához. Izoláltuk a fertőző mikrobákat és bázissorrend elemzés alapján a *Penicillium*, *Aspergillus*, *Podospóra* és *Fusarium* nemzetségbe voltak sorolhatóak, amik nem kifejezetten a laskagombára nézve patogén gombák, de hatással lehetnek rá.

- A befertőződéssel párhuzamosan az átszövetés sebességében (1/b. ábra) is megfigyelhetőek voltak különbségek, bár itt már nagyobb volt a szórás a párhuzamos csövek között. Legnyilvánvalóbb talán az volt, hogy az autoklávozott szubsztrátban a laskagomba kolonizációja lassabb volt és sokkal nagyobb szórást mutatott, mint a normál termesztőközegben.



1. ábra. (a) Az egyes csövek befertőződtettsége a befertőződött oldalsó lukak százalékos arányában kifejezve. (b) A hifafront előrehaladása a 4-hetes inkubáció során. A kezelések kódjai: A – autoklávban sterilizált kontroll; AB – a normál alapanyagból származó baktériumszuszpenzióval visszaoltott; AG – a gátló baktérium szuszpenziójával visszaoltott; AS – a normál alapanyagból származó baktériumszuszpenzió szűrletével visszaoltott; AV – visszaoltási kontroll steril vízzel; N – normál, nem sterilizált kontroll.

- A laskagomba enzimaktivitása a következőképpen alakult. A lakkáz és MnP aktivitására a kezelések nem voltak jelentősen hatással. Előbbi a fronthifák régióiban volt nagyon aktív, utóbbi a már régebben átszótt régiókban mutatott folyamatos nagy aktivitást. Az endoglukanáz, cellobiohidroláz és a  $\beta$ -glükozidáz aktivitása a teljesen átszótt illetve a termőtestképzésre indukált régiókban volt nagy a normál illetve az AB és AS kezelések során. Az A, AG és AV kezeléseknél is megnőtt aktivitásuk ezen régiókban de kisebb mértékben, mint az előző csoportokban. Vagyis utóbbi esetekben nem csak lassabb a gomba növekedése, de kevésbé hatékonyan bontja a rendelkezésére álló tápanyagokat.
- Termőtestet viszont valamennyi kezelés során képzett a laskagomba, vagyis ezen folyamathoz nem elengedhetetlen a baktériumok jelenléte.

A következőkben a laskagomba ligninbontó enzimeit kódoló gének expresszióját vizsgáltuk. Modellrendszerben normál és autoklávozott szubsztráton kvantitatív reverz transzkripció PCR (RT – qPCR) módszerrel a *lacc2*, *lacc3*, *lacc6*, *lacc10*, *lacc12* valamint az

*mnp3*, *mnp4* és *mnp9* gének expresszióját követtük nyomon. A lakkázok esetében a *lacc2* és a *lacc10* míg a mangán-peroxidáz gének közül az *mnp3* és *mnp9* bizonyult dominánsnak. A génexpressziós szinteket nagyon nagy szórás jellemezte a párhuzamos minták (különböző csövek azonos régiói) között. Csupán a kevésbé domináns *lacc3* és *mnp4* esetén volt megfigyelhető szignifikánsabban nagyobb érték a fronthifák régióiban. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a nagy eltérések elsősorban nem az egyes termesztő csövek azonos régióin belüli mikroheterogenitást, hanem a csövek közti makroheterogenitást tükrözik. Az autoklávozott minták esetében azonban a mikroheterogenitás szignifikánsan nagyobbak bizonyult a normál szubsztráthoz képest (Vajna és mtsai, 2013).

Végül összevetettük a modellrendszerben kapott eredményeket az eredeti nagyüzemi termesztéssel, ezért végigkövettünk 10 héten át egy teljes termesztési folyamatot. A termesztő a szubsztrátot laskagombával való beoltás után műanyag zsákokba, úgynevezett blokkokba töltötte, majd ezeket a blokkokat termesztő sátrakban inkubálta. A modellrendszerhez hasonlóan itt is az átszövetés, majd a termőre fordítás és a termőtestképzés következett. De ezután a körülmények megváltoztatásával egy második átszövetés, majd egy újabb termőre fordítás és termőtestképzés is történt, hogy az adott mennyiségű szubsztrátról minél több gombát lehessen leszedni. A ligninbontó enzimek a legnagyobb aktivitást a kezdeti kolonizáció során mutatták. Ezen belül is a lakkáz aktivitás az első héten, míg a mangán-peroxidáz aktivitás a harmadik héten érte el maximumát. Az endocelluláz,  $\beta$ -glükozidáz, endoxilanáz és exokitináz enzimek a legaktívabbak a negyedik héten voltak, amikor a termőtestképzés történt. A cellobiohidroláz és a xilozidáz enzim aktivitásának változása nem mutatott különösebb tendenciát. Az ötből négy megvizsgált termesztési blokk enzimaktivitása hasonló tendenciát mutatott az első hét hét során. Mindössze egy blokk értékei csúsztak el egy héttel, de ott a termőtestképzés is egy héttel később kezdődött (Bánfi és mtsai, 2015a).

### **3 A laskagomba kolonizációjának és primordium-képzésének mikroszkópos vizsgálata**

A modellrendszerben a steril alapanyag átszövetődésének három fázisát vizsgáltuk fény-és elektronmikroszkóppal.

A fronthifák régiójában a szubsztrát anyagai, főként a növényi sejtfaalak és a valamikor élő állapotú növényi anyag sejtmaradványai voltak megfigyelhetőek. Sejtorganelumok maradványai és számos egyéb komponens még kevésbé változott meg. Kevés *Pleurotus ostreatus* hifa volt látható, de néhány vastagabb falú gombafonal mellett a felszívásban fontos vékony falú hifák is megjelentek. A szubsztrátra oltott gombán felül baktériumok (a sterilizálás miatt elhalt, kevés élő állapotú, és számos spóra) is megfigyelhetőek voltak. A szubsztrát fő tömegét adó sejtfaalak többségében intakt állapotúak voltak, bár helyenként látható volt degradáció, ami az alapanyag-gyártás során lezajlott komposztálási fázis bakteriális aktivitására vezethető vissza.

A szubsztrát közepes átszövetésekor sejtfaalakban gyakran látható volt a gomba enzimaktivitásából származó üregesség. Ezeket a lyukakat részben a kis átmérőjű, a szubsztrát lebontását végző hifák alakították ki. A gyors kolonizációt biztosító, legtöbbször a növényi szövet sejtjeinek hossz tengelyével párhuzamosan növekvő vastag hifák elágazásokkal több irányba fejlődtek tovább, és a falak gyors átlépésével újabb sejtekbe jutottak. Ezeket a hifákat a gyakori elágazások, a közepes denzitású citoplazma, számos szemcsét tartalmazó vakuolum és viszonylag vékony sejtfaalak jellemezte. Az interszeptális részek hosszúak voltak, a

citoplazmatartalmukban számos esetben denzitás-grádiens volt megfigyelhető. Különösen az elágazási régiók plazmája volt sűrűbb.

A csaknem teljes átszövetési állapotnál a hifák gyakoriak voltak a növényi szubsztrátum minden részében, alig akadt olyan növényi sejt, amelyikbe ne ágazott volna le hifa. A kolonizáló hifák mellett nagy számban voltak láthatók vékony falú lebontó-felszívó hifák is. Noha a szubsztrát sterilizált volt, a gombafonalak közelében (is) gyakran előfordultak egyéb mikroorganizmusok a növényi eredetű sejttörmelék maradványaiban. A növényi részlet (pl. szalmaszál darab) felületén gyakran megfigyelhetők voltak rövid interszeptális részekből álló, változó ultrastruktúrájú gombafonalak, melyek egymással kapcsolódva mechanikai-kémiai kapcsolatban voltak. Ez a fajta strukturáltság alapvető a későbbi termőtest iniciumok létrejöttében.

Az is kiderült, hogy a laskagomba nem képez vastag, jól preparálható hifanyalábokat. Ezért munkánk során nem a hifa körüli egyes zónákat választottuk el, hanem a hifával különböző mértékben és ideje átszótt alapanyag régiókat.

A következőkben fénymikroszkópos és transzmissziós elektronmikroszkópos módszerrel vizsgáltuk a természetből, Petri-csészés steril környezetből (malátás táptalajon) és sterilizált szubsztráton nőtt termőtestkezdeményeket. A termőtestkezdeményeken belül sem fénymikroszkóppal, sem elektronmikroszkóppal nem sikerült baktériumokat kimutatni a steril közegekben. A természetből származó primordiumokon voltak baktériumok, de kizárólag felszíni helyzetben. Ez egybevág azzal a megfigyeléssel, hogy a termőtest belsejéből lerázott darabokon DAPI festés után nem láttunk baktérium alakú struktúrákat. Petri-csészés tenyészetekben a primordiumokban sok vékony, összeesett hifa volt látható, feltehetően a relatíve kis hozzáférhető vízmennyiség miatt. Szerkezeti szerepük azonban nem kizárható, mivel közöttük számos jó megtartású hifa is megfigyelhető volt. Ez utóbbiak „pozicionálása” lehet a szerepe a vékony hifáknak. A termőtest első fejlődési stádiumaiban az autofágia és glikogén felhalmozás jelentős volt. Az autofágia a vakuolum képzésben játszhat szerepet, de citoplazma részek lefűződésével a citoplazma megújulási folyamatában is részt vesz. Vizsgáltuk a kezdeményekben a hifaszövedék tömörségét és citológiai jellemzőit. Morfometriai mérésekkel igazoltuk, hogy a hifák denzitása nem változik jelentősen az inicium - primordium átmenet során (70 és 78,7% egységnyi területre), míg a hifák vakuolizáltságának mértéke jelentősen, csaknem kétszeresére nőtt (10,8 és 19,2%). Ez korai differenciációs folyamatokra utal az iniciumból kialakuló primordium strukturális tulajdonságainak jelentősebb megváltozása nélkül. Az iniciumban rövidebb, dúsabb citoplazmájú hifák voltak láthatóak, amelyek a vakuolizáltság növekedésével kissé megnyúltabbaká váltak. A kalap kezdeményének kialakulásakor a termőtestkezdemény felső felszíne kevésbé volt kompakt, míg a tönk felső harmadában orientált hifák tömött rétege fedte a primordiumot.

Végül laskagomba steril tenyészetében vizsgáltuk az autofágia szerepét az éhezési stressz során. Három, különböző tápanyag-ellátottságot biztosító tenyészetben jellemeztük morfológiailag az indukált autofágiát a kialakuló micéliumban. A maláta agaron kifejlődő, normál növekedést mutató micélium fiatal hifaiban bőséges, denz citoplazma és kevésbé fejlett vakuoláris kompartment volt jellemző. Makroautofágiára jellemző endoszómák kis számban fordultak elő, amik meglétét a hifán belüli átépítő folyamatok indokolják. Az idősebb hifatagok kiürülése volt megfigyelhető, a csökkent denzitású citoplazmában nagyobb

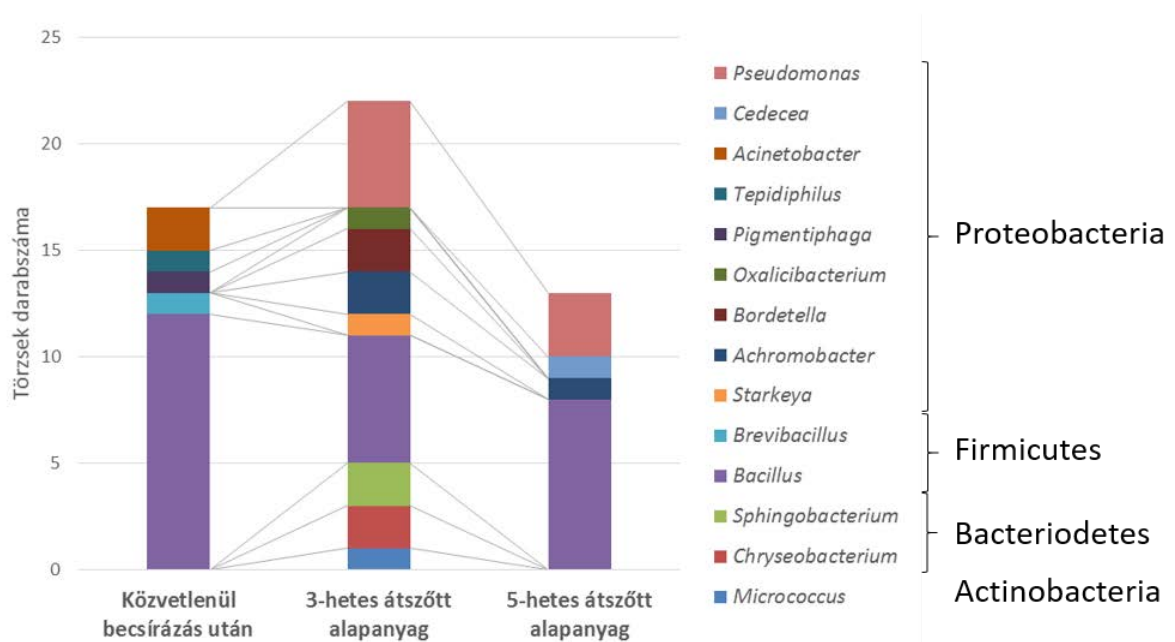
vakuolumok alakultak ki a hifa teljes elhalása előtt. Gyakori volt a glikogén, mint tartalék tápanyag jelenléte. Ezután a maláta táptalajt tízszeresére hígítottuk, ekkor a kifejlődő micélium mennyisége jelentősen csökkent, de számottevő és ezzel kapcsolatosan észlelt fokozott autofágiás aktivitás viszont ultrastrukturálisan nem volt detektálható. Az autofágiával összefüggésbe hozható endoszomális képletek száma nem nőtt meg jelentősen, a hifák szerkezetében nem volt lényeges változás a kontrollhoz képest. Vízagaron a növekvő micélium tápanyagellátása csak a leoltási inokulumból származhatott egy ideig, de csak a tenyészet indulásának korai szakaszában. Ebből következhetett a tapasztalt gyenge növekedés. Főleg a léghifák szinte teljes hiánya volt feltűnő. Ultrastrukturálisan az autofágiára jellemző késői endoszomák és multivezikuláris testek nagy száma jellemezte az így nőtt micéliumot, a vakuolumokba jutó és ott lebomló citoplazma részletek, lipidcseppek gyakran voltak láthatóak. Mielintestek, degradálódó sejtmagok és az alacsony denzitású citoplazma általánosan előfordult. Normál denzitású, várhatóan normális szintű metabolizmust folytató, kis vakuolumtartalmú hifatagok csak a legfiatalabb hifavégeken fordultak elő. A glikogén csak ilyen hifákban, és csak kis mennyiségben volt jelen.

Ahogy fentebb írtuk a terméshullám és termőtest leszedésének időszakában a cellulózbontó enzimek aktivitása emelkedett meg. Azonban nem volt kifejezett különbség a normál szubsztrátmicélium és egy termőtest alatti micélium aktivitása és a környezetében lévő baktériumközösség összetétele között. Így valószínűsíthető, hogy a primordium- és termőtestképzés során lejátszódó folyamatok, nem csupán a termőtest szűk környezetét érintik, hanem a teljes szubsztrátblokkban hasonló események zajlanak. Vagyis a teljes hifarendszer a termőtestképzést segíti elő elsősorban az intenzív cellulóz- és hemicellulózbontással illetve a cukrok termőtest felé való szállítással.

#### **4 A baktériumközösség szerepe és átalakulása a laskagomba növekedése során**

A termesztés különböző fázisaiból törzsgyűjteményeket hoztunk létre. A legelső, becsírázás előtti alapanyagból származó törzs-kollekció kialakításakor szem előtt tartottuk a táptagok összehasonlításával az alapanyagban élő baktérium közösség tápanyag felhasználási lehetőségeit (R2A, KingB-, zab-, szukcinát-, cellulóz-ammóniumnitrát-, savanyú maláta-, oldható keményítő agar), illetve a gyengén növekvő szervezetek növekedésének elősegítését (kristályibolya agar). Kipróbáltunk a tenyésztéshez egy általunk készített táptalajt is, amelyben a természetes, komposztált alapanyag szűrletét használtuk fel, egyéb kiegészítő anyagok nélkül (komposzt agar). Összesen 79 törzset izoláltunk a különböző táptalajokon. A legnagyobb telepszámokat az oldható keményítő, KingB-, cellulóz-ammóniumnitrát táptagokon találtuk. Az izolátumokból 64 törzset sikerült a 16S rRNS gén parciális szekvenciája alapján azonosítani. A törzsek 90,4 %-a a Firmicutes (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Solibacillus*, *Brevibacillus* spp.), 1,6 %-a a Deinococcus-Thermus (*Deinococcus* spp.), 3,2 %-a az Actinobacteria (*Kocuria* spp.) és 4,8 %-a a Proteobacteria (*Chelatococcus*, *Pseudoxanthomonas* spp.) baktérium taxonba tartozott. Figyelembe véve, hogy a különböző táptalajokon, milyen szervezeteket sikerült izolálni, a további törzsgyűjtemények létrehozásához csak a tápanyagban dús KingB, a tápanyagokban szegényebb R2A és a Gram-negatív baktériumokat pozitívan szelektáló kristályibolya táptalajokat használtuk.

A következőkben a kiválogatott táptalajokon a kész, közvetlenül becsírázás utáni, majd a 3 és 5-hetes átszótt alapanyagokból hoztunk létre törzsgyűjteményeket. A legutolsó időpont a termőtestek kialakulásának idejére esett. A törzseket ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) módszerrel csoportosítottuk, majd meghatároztuk a csoportreprezentánsok 16S rRNS génjének parciális szekvenciáját (**2. ábra**). Minden fázisban a *Bacillus* fajok voltak dominánsak, bár a 3-hetes alapanyagból számos Proteobacteria és Bacterioidetes törzsbe tartozó baktériumot is sikerült izolálni. Fontos, hogy a tenyésztés szelektivitása miatt nem szabad a taxonómiai összetételből túl messzire menő következtetéseket levonni. Tudományra nézve új baktériumfajokat nem találtunk az izolált törzsek között.



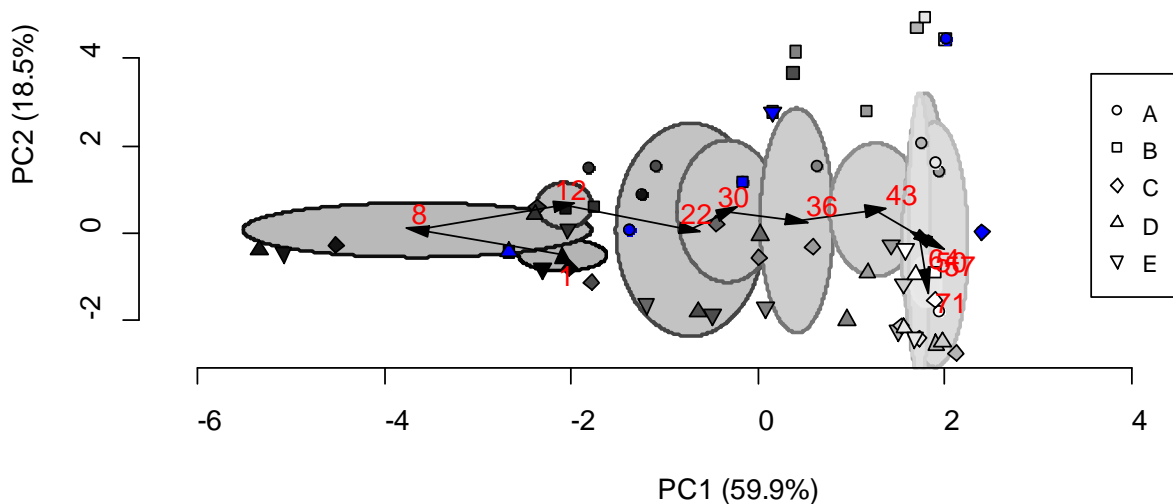
2. ábra. A törzsgyűjtemények azonosított tagjainak nemzetség szerinti eloszlása.

A törzsgyűjtemény viszont lehetővé tette, hogy a kész alapanyagból származó tagjaival konfrontációs tesztek végeztünk a laskagombával szemben malátakivonatos táptalajon. A laskagomba az esetek döntő többségében átnőtt a baktérium-telepeken. Kivétel például néhány *Bacillus amiloliquefaciens* törzs volt, amelyek akadályozták a gomba növekedését (Bánfi és mtsai, 2012). Ezek közül az egyiket használtuk fel a visszaoltásos kísérletünkben (vö. 5.2 pont).

A reprezentatívabb felmérés érdekében a következőkben molekuláris módszereket alkalmaztunk. Először a kész alapanyag baktérium-közösségét vizsgáltuk meg, hiszen velük találkozunk a laskagomba növekedése során. A domináns klónok nagy része az aktinobaktériumok (*Thermobifida*, *Thermomonospora*, *Thermopolyspora* és *Thermobispora* nemzetségek), a *Thermus* nemzetség és a Firmicutes taxon (*Bacillus*, *Geobacillus*, *Ureibacillus* és *Thermobacillus* nemzetségek) tagjai közé volt sorolható. Emellett számos klón még tenyésztésbe nem vont és így le nem írt nemzetségekbe tartozott (Vajna és mtsai, 2012b).

Ezután a baktériumközösség átalakulását vizsgáltuk a kész alapanyag laskagombával való átszövése majd a termőtestképzés során a modellrendszerünkben a normál alapanyag

alkalmazása esetén, illetve a nagyüzemi termesztésben a 16S rRNS gén első harmadán alapuló T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) segítségével. Mindkét esetben egy határozott átalakulást lehetett megfigyelni a baktériumközösség összetételében (Luzics, és mtsai, 2013; Vajna és mtsai, 2015; Vajna és mtsai, összeállítás alatt) (3. ábra). Miközben a laskagomba az első 2-3 hét során gyorsan átszította a szubsztrátot, annak bakteriális közössége még nem tendenciózusan alakult át. Csak a 3-4. héttől lehetett megfigyelni egy jól követhető bakteriális közösségátrendeződést. Bár a párhuzamos minták elég nagy szórást mutattak, a közösségek hasonló irányban alakultak át. CCDA (Combined Cluster and Discriminant Analysis) elemzés szerint a minták a következő szignifikánsan elkülönülő csoportokat alkották: külön-külön csoportosultak az első három hét mintái (1., 8. és 12. nap), majd a következő csoportba tartoztak a 22-43. nap mintái, végül szintén elkülönültek az 50-71. nap mintái (Vajna és mtsai, összeállítás alatt).



3. ábra. A baktériumközösség átalakulása (16S rDNS T-RFLP alapján) a nagyüzemi laskagomba-termesztés során főkomponens elemzés segítségével ábrázolva. A-tól E-ig szerepel az 5 darab párhuzamosan vizsgált blokk, ahol a kicsi piktogramok jelölik az egyedi mintákat egyre világosabb színkitöltéssel az idő előrehaladtával. Az ellipszisek a hetenkénti (1-71 napig számozva) 5 minta átlaga körüli egységnyi szórású területet jelölik, ahol a nyilak az egymás utáni átlagok felé mutatnak. A kék színnel megjelölt 6 minta összetételét vizsgáltuk meg NGS módszerrel.

A közösségi átalakulás pontosabb feltárására NGS (next generation sequencing) technika alkalmazásával (Roche, GS Junior készülék) azonosítottuk a főbb baktériumcsoportokat két blokk kiindulási (1. nap), illetve a két termőtestképzési fázis (30. és 57. nap) mintáiból (1. táblázat). Jól látható, hogy az aktinobaktériumok és a *Thermus* nemzetség tagjai szinte teljesen eltűntek a termesztés végére. Utóbbi oka elsősorban a csökkenő hőmérséklet. A Proteobacteria törzsön belül a sókedvelő *Halomonas* nemzetség vált dominánssá, ill. egy csak család szintjén azonosított *Hyphomicrobiaceae* szekvencia (8-10%-os abundanciával), melynek legközelebbi rokonai komposztálási rendszerekből leírt környezeti klónok. A termesztés során a Firmicutes törzs tagjai váltak abszolút dominánssá az *Lysinibacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus* nemzetség tagjaival és egy a Paenibacillaceae családba tartozó



szekvenciával (5-10%-os abundanciával) (Vajna és mtsai, összeállítás alatt). Fontos megjegyezni, hogy ez az NGS technológiával megfigyelt közösség-átalakulás nagyon hasonlóan alakult a modellrendszerünkben is, mind a Firmicutes, mind a *Halomonas* taxonok mennyiségi viszonyait illetően (Luzics és mtsai, 2013).

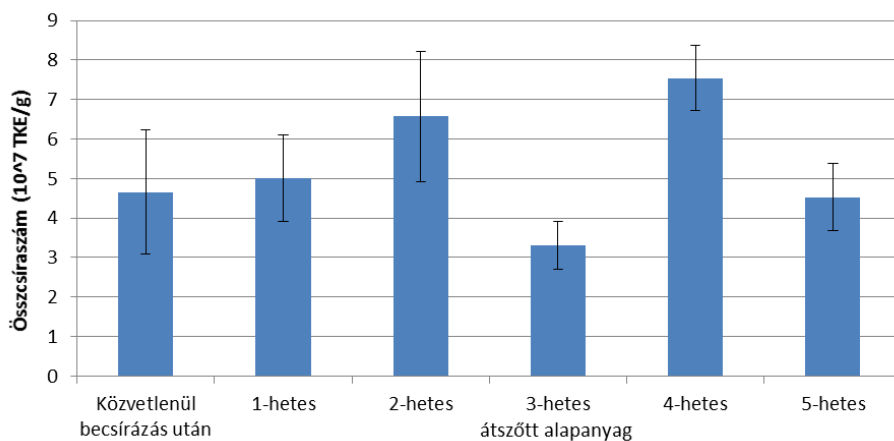
1. táblázat. Az egyes taxonok százalékos előfordulása (16S rDNS NGS alapján) a nagyüzemi laskagomba-termesztés során. Az egyes phylumokon belül azon nemzetségek szerepelnek, amelyek legalább egy mintában 0,5%-os abundanciával rendelkeznek.

|                                   | 1. nap         |           | 30. nap   |           | 57. nap   |           |
|-----------------------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                   | A <sup>1</sup> | B         | A         | B         | A         | B         |
| <b>Actinobacteria<sup>2</sup></b> | <b>15</b>      | <b>8</b>  | <b>7</b>  | <b>4</b>  | <b>1</b>  | <b>1</b>  |
| <i>Mycobacterium</i>              | 2              | 1         | 2         | 1         | 0         | 0         |
| <i>Streptomyces</i>               | 0              | 0         | 1         | 0         | 0         | 0         |
| <i>Thermobifida<sup>3</sup></i>   | <b>5</b>       | <b>2</b>  | <b>1</b>  | <b>1</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <i>Thermopolyspora</i>            | 1              | 1         | 1         | 1         | 1         | 1         |
| <i>Thermobispora</i>              | 1              | 1         | 0         | 1         | 0         | 0         |
| <b>Bacteroidetes</b>              | <b>0</b>       | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <b>Chloroflexi</b>                | <b>4</b>       | <b>1</b>  | <b>2</b>  | <b>4</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <i>Roseiflexus</i>                | 1              | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         |
| <i>Sphaerobacter</i>              | 1              | 0         | 2         | 3         | 0         | 0         |
| <b>Cyanobacteria</b>              | <b>2</b>       | <b>0</b>  | <b>1</b>  | <b>1</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <b>Deinococcus-Thermus</b>        | <b>17</b>      | <b>16</b> | <b>2</b>  | <b>2</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <i>Thermus</i>                    | <b>16</b>      | <b>16</b> | <b>2</b>  | <b>2</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <b>Firmicutes</b>                 | <b>41</b>      | <b>44</b> | <b>66</b> | <b>58</b> | <b>84</b> | <b>62</b> |
| <i>Tumebacillus</i>               | 0              | 0         | 0         | 0         | 2         | 0         |
| <i>Bacillus</i>                   | 2              | 2         | 2         | 1         | 2         | 4         |
| <i>Caldibacillus</i>              | 2              | 2         | 0         | 0         | 0         | 0         |
| <i>Geobacillus</i>                | 0              | 0         | 4         | 3         | 6         | 3         |
| <i>Ureibacillus</i>               | 1              | 2         | <b>17</b> | <b>12</b> | <b>17</b> | <b>11</b> |
| <i>Brevibacillus</i>              | 0              | 0         | 1         | 0         | 0         | 0         |
| <i>Paenibacillus</i>              | 1              | 1         | 1         | 2         | 2         | 1         |
| <i>Thermobacillus</i>             | <b>15</b>      | <b>14</b> | <b>18</b> | <b>16</b> | <b>25</b> | <b>16</b> |
| <i>Lysinibacillus</i>             | <b>7</b>       | <b>9</b>  | <b>6</b>  | <b>6</b>  | <b>8</b>  | <b>9</b>  |
| <i>Rummeliibacillus</i>           | 0              | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         |
| <i>Solibacillus</i>               | 3              | 4         | 0         | 0         | 1         | 1         |
| <i>Clostridium</i>                | 0              | 0         | 0         | 1         | 2         | 1         |
| <i>Defluviitalea</i>              | 0              | 0         | 1         | 0         | 1         | 0         |
| <i>Mobilitalea</i>                | 0              | 0         | 0         | 1         | 1         | 0         |
| <b>Gemmatimonadetes</b>           | <b>1</b>       | <b>1</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <b>Planctomycetes</b>             | <b>0</b>       | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <b>Proteobacteria</b>             | <b>19</b>      | <b>22</b> | <b>21</b> | <b>30</b> | <b>14</b> | <b>36</b> |
| <i>Camelimonas</i>                | 0              | 0         | 0         | 1         | 0         | 0         |
| <i>Chelatococcus</i>              | 1              | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         |
| <i>Microvirga</i>                 | 1              | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         |
| <i>Thermovum</i>                  | 3              | 3         | 0         | 0         | 0         | 0         |
| <i>Bdellovibrio</i>               | 0              | 0         | 0         | 1         | 2         | 1         |
| <i>Vulgatibacter</i>              | 1              | 1         | 1         | 1         | 0         | 0         |
| <i>Halomonas</i>                  | 1              | 2         | <b>9</b>  | <b>15</b> | <b>10</b> | <b>28</b> |
| <i>Acinetobacter</i>              | 0              | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         |
| <b>Saccharibacteria</b>           | <b>0</b>       | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <b>Tenericutes</b>                | <b>0</b>       | <b>1</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <b>Verrucomicrobia</b>            | <b>1</b>       | <b>1</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |
| <b>Azonosíthatlan<sup>4</sup></b> | <b>1</b>       | <b>6</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  |

<sup>1</sup>„A” és „B” két párhuzamosan vizsgált blokk; <sup>2</sup>Vastagon szedve adtuk meg a phylumokat; <sup>3</sup>Az 5%-nál nagyobb arányban előforduló nemzetségek számértéke vastagon szedett; <sup>4</sup>Phylum szinten nem beazonosítható szekvenciák arány

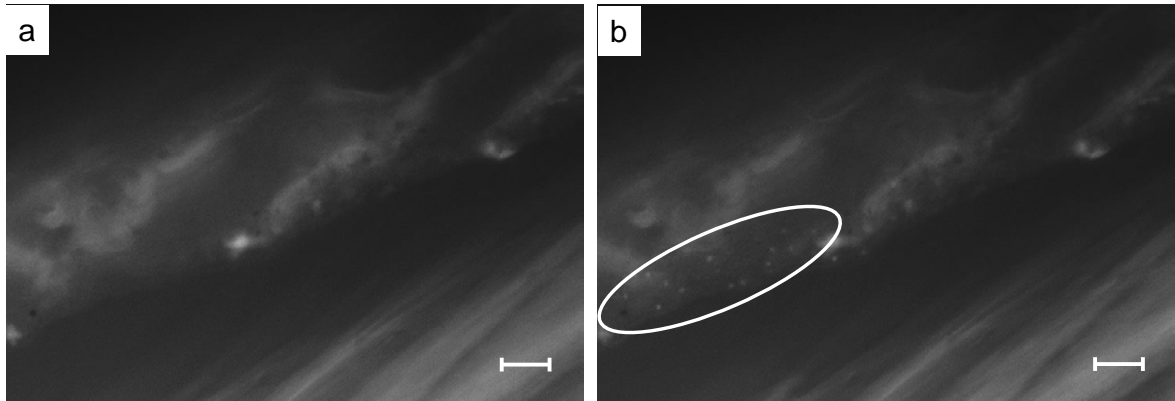
A megfigyelt közösség-átalakulás fontos kérdése, hogy mögötte a baktériumok (Firmicutes taxon, egyes Proteobacteria csoportok) aktív szaporodása vagy csak a közösség más tagjainak (pl.: aktinobaktériumok és a *Thermus* nemzetség képviselői) eltűnése áll. Valószínűsíthető ugyanis, hogy a laskagomba a jelenlévő baktériumokat tápforrásként is felhasználja, de az endospórát is kialakítani képes Firmicutes taxon tagjait nehezebben lizálja. Tehát fontos kérdésként fogalmazódott meg, hogy a fentebb megfigyelt közösségátalakulás során hogyan változik a baktériumok abszolút mennyisége.

A baktérium mennyiségét először klasszikus, csíraszámbebecsléses eljárással vizsgáltuk a nagyüzemi termesztés első 5 hete során 7-es pH-jú R2A táptalajon (**4. ábra**). (Használtunk a környezethez jobban hasonlító 5-ös pH-jú R2A táptalajt is, de azon sajnos semmilyen baktérium nem nőtt ki.) A baktériumok mennyisége nagyságrendileg nem változott, ANOVA elemzés alapján csak a 3. heti csíraszámok szignifikánsan kisebbek a 2. és a 4. hetieknél. A harmadik heti csökkenés hátterében húzódhat, hogy ekkor történt a termőtestindukcióhoz szükséges hőmérséklet-csökkentés. Az utána történő növekedés talán a baktériumközösség alacsonyabb hőmérsékletre való alkalmazkodásával magyarázható. De mindezen adatok csak a tenyésztésbe vonható baktériumok mennyiségéről adnak számot.

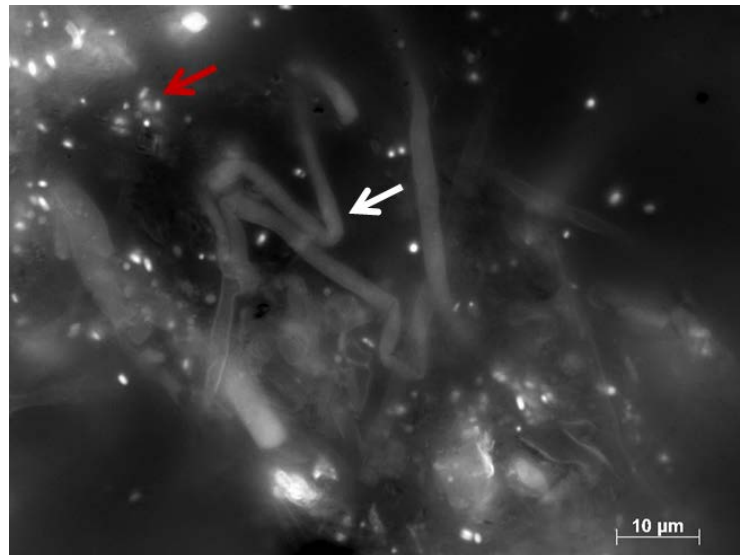


4. ábra. Összcíraszám értékek változása a nagyüzemi termesztés első 5 hete során.

A következő lépésben ezért fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) segítségével kívántuk megvizsgálni a baktériumok számát és térbeli elhelyezkedését. Először a modellrendszerünk laskagombával különböző mértékben átszótt mintáival dolgoztunk. Azért hogy egyes baktériumcsoportok térbeli elhelyezkedését is meg tudjuk figyelni, az egyes mintákat agarózba ágyasztuk. Így igyekeztünk elkerülni és csökkenteni a sejtek kimosódását, térbeli helyzetük megváltozását a preparálás során. Ezután a mintákat 3%-os paraformaldehidben vagy abszolút etanolban fixáltuk. Majd a mintákból vékony szeleteket vágunk, amiket lizozimmal és proteináz-K-val kezeltünk, hogy a Gram-pozitív sejtekbe is bejuthassanak a FISH próbák. Sajnos számos próbálkozás után is csak nagyon gyér, nehezen reprodukálható fluoreszcens jelet kaptunk (**5. ábra**), annak ellenére, hogy a sejtek akridin-narancssal illetve DAPI-val jól láthatóan festődtek (**6. ábra**). A jelenségnek több oka is lehet. Az akridin-narancs minden nukleinsavhoz kötődik, így az inaktív, kis rRNS-tartalommal rendelkező sejteket is képes megfesteni, míg az rRNS-hez kötődő FISH-próbák csak az aktívabb sejteket festik meg jól láthatóan.

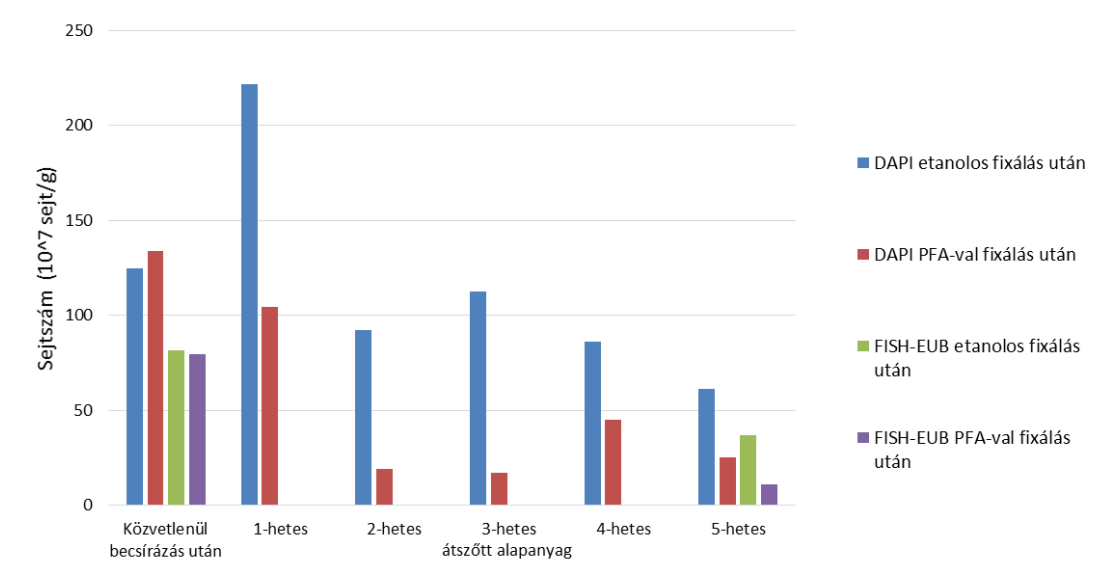


5. ábra. Jól átszótt alapanyag mikroszkópos képe Cy3 jelölt Firmicutes taxonra specifikus próbával hibridizáltatva. (a) GFP csatorna: csak a háttér fluoreszcencia látható. (b) Cy3 csatorna: apró pontokként látható baktériumsejtek az ellipszisen belül. A méretvonal 10  $\mu$ m-nek felel meg.



6. ábra. Jól átszótt alapanyag mikroszkópos képe (GFP csatorna) akridin-narancssal és kalkofluorral festve. Jól láthatóak hifarészletek (fehér nyíl) és körülöttük nagy számú baktérium (piros nyíl).

Ez az eredmény azt a hipotézisünket erősítette, hogy az átszövetés során a laskagomba mellett a bakteriális sejtek aktivitása csökkent, ezért nehezebb őket FISH-próbákkal megjelölni. Azt is megtapasztaltuk, hogy a szalma erős autofluoreszcenciája gátolja az amúgy is halvány jel detektálását. Ezért le kellett mondanunk eredeti tervünkről, hogy a baktériumok térbeli elhelyezkedését is megvizsgáljuk, és a továbbiakban a mintákról lerázott baktérium-szuspenzióval dolgoztunk. Ahogy az a **7. ábrán** látható a mikroszkopikus sejtszámok legalább egy nagyságrenddel magasabbak, mint a fentebb bemutatott összecsíraszámok. A fixálás módja (etanol vagy paraformaldehid) jelentős hatással van a kapott eredményekre, de két trend azért világosan látszik. Egyrészt a sejtszám értékek az 5 hét alatt nagyjából a felére csökkentek. Másrészt a DAPI festékekkel jelölt sejteknek nagyjából csak a fele-kétharmada jelölődött az általános Bacteria-specifikus (EUB) próbával.



7. ábra. Baktériumok mikroszkopikus sejtszámának változása a nagyüzemi termesztés első 5 hete során.

Összességében tehát elmondható, hogy a baktériumoknak nemcsak a közösség szerkezete rendeződik át a termesztés során, hanem mennyiségük és össz-aktivitásuk is legalább a felére csökken.

## 5 Következtetések

A laskagomba és a baktériumok között tehát nagy valószínűséggel nem egyfajta közvetlen kapcsolat alakul ki. A baktériumok szerepe elsősorban az alapanyag-gyártás során jelentős, ahol részt vesznek az alapanyag előkészítésében és a betöltik azokat az üres niche-eket, amik az alapanyag-gyártás során elpusztított – részben a laskagombára nézve patogén – mikroorganizmusok révén keletkeznek. Ezenfelül a baktériumok olyan metabolitokat termelnek, amik a későbbiekben – az átszövetés során – csökkentik az alapanyag kívülről történő befertőződésének esélyét. Így a gomba hatékonyabban és gyorsabban kolonizálja az alapanyagot, és az ott lévő baktériumokat tápanyagként is hasznosíthatja.

## 6 A zárójelentésben hivatkozott publikációk

- Bánfi, R., Pohner, Zs., Kovács, J., Luzics, Sz., Nagy, A., Dudás, M., Tanos, P., Márialigeti, K., Vajna, B. 2015a. 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, 1354-1363. [doi:10.1016/j.funbio.2015.10.003](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.003) (IF\*: 2,244)
- Bánfi, R., Pohner, Zs., Kovács, M.G., Nagy, A., Márialigeti, K., Vajna, B. Bacterial-fungal interactions in an oyster mushroom model. Kézirat összeállítás alatt. 2017 első félévében tervezzük benyújtani a FEMS Microbial Ecology folyóirathoz (IF: 3,6).
- Bánfi, R., Pohner, Zs., Luzics, Sz., Nagy, A., Geösel, A., Márialigeti, K., Vajna, B. 2015b. Bacterium-fungus interactions in an oyster mushroom cultivation model system. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62, 4. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése, Keszthely, 2014. Október 15-17. (előadás)

- Bánfi, R., Vajna, B., Márialigeti, K. 2012. Exploring the role of bacteria during colonization of oyster mushroom substrate. 14<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, ISME14, 19-24 August 2012, Copenhagen, Denmark, Book of Poster Abstracts 184. (poszter)
- Luzics, Sz., Pohner, Zs., Bánfi, R., Felföldi, T., Szabó, A., Vajna, B., Márialigeti, K. 2013. The effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) substrate colonization on the bacterial community structure investigated in a model system. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 60, 181-182. 4<sup>th</sup> Central European Forum for Microbiology - Keszthely, Hungary, October 16 - 18, 2013 (poszter)
- Vajna, B., Bánfi, R., Márialigeti, K. 2012a. Laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) micélium lignocellulózbontó enzimaktivitásának változása a termesztő szubsztrát átszövése során. Magyar Mikológiai Közlemények – Clusiana 51, 160-161. V. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest 2012. május 23-25. (poszter)
- Vajna, B., Bánfi, R., Pohner, Zs., Kovács, M.G., Nagy, A., Márialigeti, K. Spatiotemporal heterogeneity of bacterial communities during large-scale oyster mushroom production. Kézirat összeállítás alatt. 2017 első félévében tervezzük benyújtani a Microbial Ecology folyóirathoz (IF: 2,9).
- Vajna, B., Bánfi, R., Pohner, Zs., Luzics, Sz., Szabó, A., Nagy, A., Márialigeti, K. 2015. Bacterial community structure changes during colonization and fruiting body production of oyster mushroom using a composted natural substrate. 14-18 June 2015 Milan, Italy. 13<sup>th</sup> Symposium on Bacterial Genetics and Ecology. Book of Abstracts, 84-85. (poszter)
- Vajna, B., Frey-Klett, P., Deveau, A. 2013. Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccases and manganese peroxidases during mushroom cultivation. Bacterial-fungal interactions: a federative field for fundamental and applied microbiology. December 7-11, 2013, Roscoff (Brittany), France. Book of Abstracts, 59. (poszter)
- Vajna, B., Szili, D., Nagy, A., Márialigeti, K. 2012b. An improved sequence aided T-RFLP analysis of bacterial succession during oyster mushroom substrate preparation. Microbial Ecology, 64, 702–713. (IF: 3,277)