

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Surányi Botond Bendegúz

Budapest

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**Zöldségfélék termesztésénél használt öntözővizek mikrobiótájának
jellemzése MALDI-TOF MS alkalmazásával**

DOI: 10.54598/003490

Surányi Botond Bendegúz

Budapest

2023

Doktori Iskola/ Program

Megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Tudományága: Élelmiszertudomány

Vezetője: **Simonné Dr. Sarkadi Livia, DSc**

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Táplálkozástudományi Tanszék,
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Témavezetők:

Mohácsiné Dr. Farkas Csilla, PhD

Élelmiszer-mikrobiológiai, -higiéniai és -biztonsági Tanszék, Élelmiszertudományi és
Technológiai Intézet,
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Dr. Engelhardt Tekla, PhD

Digitális Élelmiszerlánc Oktatási, Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Intézet,
Állatorvostudományi Egyetem

A jelölt a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....

A doktori iskola vezetője

.....

Témavezető

.....

Témavezető

TARTALOMJEGYZÉK

1 BEVEZETÉS.....	4
2 CÉLKITŰZÉS.....	6
3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7
3.1 Felhasznált mikroorganizmusok.....	7
3.1.1 A táptalaj tömegspektrumra gyakorolt hatásának tesztelésére használt baktériumtörzsek	7
3.1.2 Mintavétel és baktériumizolálás	7
3.2 Táptalajok és izolátumok tenyésztése.....	8
3.2.1 Baktériumok tenyésztéséhez használt táptalajok.....	8
3.3 Módszerek	8
3.3.1 A környezeti izolátumok MALDI-TOF MS-rel történő azonosítása.....	8
3.4.2 DNS-extrakció és a vízből izolált baktériumok Sanger szekvenálása.....	8
3.4.3 DNS-extrakció és az öntözővízminták újgenerációs szekvenálása	9
3.5 Adatok elemzése.....	9
3.5.1 MALDI-TOF MS azonosítási eredmények elemzése.....	9
3.5.2 Biomarker kimutatási kísérletekből nyert adatok elemzése	9
3.5.3 A táptalajokat vizsgáló kísérletekből nyert adatok elemzése.....	10
3.5.4 A MALDI-TOF MS és a 16S rRNS génszekvenálás összehasonlításának adatelemzése	10
3.5.5 Alkalmazott bioinformatika és szekvencia analízis az újgenerációs szekvenálás során	10
4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	11
4.1 Baktériumok azonosítása környezeti mintákból MALDI-TOF MS alkalmazásával.....	11
4.2 A MALDI-TOF MS minta-előkészítési technikáinak összehasonlítása	11
4.3 A táptalajok hatásának vizsgálata a MALDI-TOF MS azonosítására a vízből származó izolátumok esetében	12
4.4 Baktériumtörzsek elkülönítése és a táptalajok hatásának tesztelése a törzsek tömegspektrumain MALDI-TOF MS segítségével.....	13
4.4.1 Baktériumtörzsek elkülönítése többváltozós statisztikai módszerekkel.....	13
4.4.2 A táptalaj baktériumtörzsek tömegspektrumaira gyakorolt hatásának elemzése.....	13
4.5 A MALDI-TOF MS és a 16S rRNS génszekvenálás összehasonlítása a vízben terjedő baktériumok esetében.....	14
4.6 16S rRNS ampikon szekvenálás a Jász-Nagykun-Szolnok megyei öntözővizek mikrobiotájának jellemzésére.....	15
5 KÖVETKEZETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	17
6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	19
7 FONTOSABB REFERENCIÁK.....	21
8 PUBLIKÁCIÓK.....	23

1 BEVEZETÉS

A mezőgazdaság termelékenységének fokozása, illetve biztosítása és egyúttal a világ rohamosan növekvő népességének élelmezése érdekében előtérbe került a jó minőségű öntözővizek használatára való törekvés. Azonban a korlátozott vízkészletek és a csapadék kiszámíthatatlansága a mikrobiológiai szempontból nem megfelelő vízforrások fokozódó felhasználásához vezet, ami hozzájárul az élelmiszer-eredetű betegségek magasabb előfordulásához. Továbbá az újrahasznosított és mikrobiológiai szempontból nem vizsgált vizeket egyre gyakrabban alkalmazzák öntözővízként a mezőgazdaságban, hogy megbirkózzanak a klímaváltozásból adódó vízhiánnyal. A növények az élelmiszer-termelési lánc több lépésében, az elsődleges termelés során, a feldolgozási szakaszban és az előkészítés során szennyeződhetnek meg leggyakrabban a potenciálisan káros mikroorganizmusokkal, mivel a víz minden lépésben hatalmas jelentőséggel bír.

A mezőgazdasági termelést folytató gazdaságoknál az élelmiszer-eredetű kórokozók egyik fő forrása a nem megfelelő minőségű öntözővíz, amely szennyeződhet a szennyvíz befolyásával, szennyezett vihar- és mezőgazdasági lefolyásokkal vagy akár a vadon élő állatok fekális kontaminációja által (Uyttendaele et al. 2015). Emellett, az olyan súlyos bakteriális kórokozók, mint a *Listeria monocytogenes*, a verotoxin termelő *Escherichia coli*, a *Salmonella* spp., az *Escherichia coli* O157:H7, nemcsak túlélni képesek, hanem szaporodni is a szennyezett öntözővízben (Falardeau et al. 2017). Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) szerint az egyre több élelmiszer-és víz eredetű járvány hatására a kórházi kezelések és halálesetek szintén növekvő tendenciát mutattak (EFSA 2019). A szennyezett vízzel öntözött leveles zöldségeket a mikrobiális kórokozók jelenléte miatt az emberi gyomor-bélhurut gyakori okozójának tekintik. Az Egyesült Államokban az 1998-2008 közötti időszakban az élelmiszer eredetű megbetegedések 22,8–46%-a volt összefüggésben a friss termékekkel, például gyümölcsökkel, gombákkal, leveles zöldségekkel vagy csíráztatott zöldségekkel (Uyttendaele et al. 2015). Továbbá Turner és munkatársai (2019) az 1996-2016 közötti időszakot elemezve az Egyesült Államokban 46 olyan járványt figyeltek meg, amelynél az érintett élelmiszer táplálékmatrix levélzöldség, római saláta és spenót volt. Ezenkívül az EFSA 31 zöldségekkel és gyümölcslevekkel kapcsolatos járványt írt le 2019-ben, amelyek 626 esetet okoztak (EFSA 2019, 2021). Ugyanakkor a friss termékek fogyasztása iránti érdeklődés ugrásszerűen nőtt az egészséges táplálkozás térnyerésének köszönhetően, amely napi 5-7 adag zöldség, gyümölcs fogyasztásával is járhat (Betts 2014). Ezért az élelmiszer-előállításához használt öntözővízben és környezetében jelenlévő mikroorganizmusok vagy teljes baktériumközösségek azonosítása

és jellemzése segítséget nyújthat az élelmiszer-eredetű fertőzések megelőzésében és az esetek számának mérséklésében. Ezen törekvésekhez elengedhetetlen az élelmiszer- és vízeredetű baktériumok gyors és megbízható kimutatása és azonosítása. A Mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs idő repülési tömegspektrometria (MALDI-TOF MS) amelyet gyors, pontos és költséghatékony mivolta miatt egyre szélesebb körben alkalmaznak a mikrobiológia területein. Alkalmazása elsődlegesen a klinikai bakteriológián belül, a mikrobiológiai diagnosztikára összpontosul, de egyre inkább alkalmazzák a környezeti bakteriológiában is az élelmiszer- és vízeredetű baktériumok azonosítására. Emellett a módszer lehetőséget nyújt baktériumok antibiotikum-rezisztenciájának kimutatására és baktériumtörzsek tipizálására is. A baktériumok azonosítása főként a 16S rRNS gén szekvenálással történik, mely eljárás képzett személyzetet és hosszadalmas folyamatokat igényel, nem beszélve a magas költségekről, ezáltal a gyors azonosítást tekintve limitált az alkalmazhatósága. Ezáltal a MALDI-TOF MS egy ígéretes alternatíva lehet az élelmiszertermeléshez használt öntözővizek és környezetük monitorozására.

2 CÉLKITŰZÉS

Doktori disszertációm során célom volt, hogy átfogó képet kapjak a magyarországi öntözővizek és környezetük bakteriális minőségéről. Ennek érdekében a MALDI-TOF MS-t használtam a különböző környezeti mintákból izolált baktériumok azonosítására. Emellett a MALDI-TOF MS néhány technikai jellemzőjét és az ezen technikával vízből származó baktériumok azonosítására felhasználható táptalajokat is vizsgáltam. Munkám során teszteltem a MALDI-TOF MS azonosítási hatékonyságát a Sanger szekvenálással szemben vízből izolált mikrobák esetében. Emellett vizsgáltam az öntözővizekből kitenyészhető baktérium nemzetségek relatív abundanciáját is.

A felsorolt célok elérése érdekében a következő feladatokat tűztem ki:

- baktériumok izolálása és azonosítása MALDI-TOF MS segítségével az élelmiszerláncban előforduló mintákból (kút, öntözéshez használt folyó- és állóvíz, zöldségek és trágya);
- MALDI-TOF MS mintaelőkészítési eljárások tesztelése környezetből származó baktériumoknál;
- táptalajok hatásának vizsgálata a tömegspektrumokon többváltozós statisztikai módszer segítségével;
- baktériumtörzsek elkülönítése többváltozós statisztikai módszer és MALDI-TOF MS alkalmazásával;
- különböző táptalajok vizsgálata vízből származó izolátumok MALDI-TOF MS-rel történő azonosításához;
- MALDI-TOF MS hatékonyságának tesztelése Sanger szekvenálással szemben vízből származó baktériumok esetében;
- öntözővizek teljes bakteriális mikrobiomjának vizsgálata MALDI-TOF MS-rel és újgenerációs szekvenálással.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Kísérletekhez felhasznált baktériumtörzsek

3.1.1 A táptalaj tömegspektrumra gyakorolt hatásának tesztelésére használt baktériumtörzsek

Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok tömegspektrumain vizsgáltam a különböző táptalajok hatását. A vizsgált Gram-negatív baktériumtörzsek az *E. coli* DSM 11250 és az *E. coli* ATCC 13706 voltak. Mindkét *E. coli* törzs a University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria Élelmiszertudomány és Technológia Tanszékéről származott. Az előbbi egy humán székletmintából izolált, míg az utóbbi vízvizsgálatra használt baktériumtörzs. Ezenkívül Gram-pozitív baktériumok esetében is vizsgáltam a táptalajok hatását a tömegspektrumokon *S. aureus* ATCC 25923 és *S. aureus* ATCC 43300 törzsek alkalmazásával. Az előbbi egy azonosításra és táptalajok vizsgálatára használt referenciatörzs, míg az utóbbi egy methicillin- és oxacillin-rezisztens törzs. A *S. aureus* törzsek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származtak.

3.1.2 Mintavétel és baktériumizolálás

A mintavételi helyek kiválasztásának célja volt, hogy a munka során lehetőleg többféle öntözővíz mintát vizsgálva egy diverzebb képet lehessen nyújtani a környezeti minták mikrobiotájáról. A dolgozatban 21 minta került feldolgozásra, melyből 2 állóvízből, 5 folyóvízből, 8 kútvízből származott. Olyan régiókban is történt mintavétel, ahol az öntözővíz szennyeződése előfordulhatott (pl. trágyával), vagy ahol az öntözővíz vihette át a mikrobákat az öntözött növényekre (pl. kukorica, saláta, hagyma, sóska, spenót és paradicsom). Minden helyszínről egy minta vétele történt. A dolgozatban 4 trágya minta került feldolgozásra. A karcagi, kengyeli, rákóczipfalvai és szolnoki öntözővízminták feldolgozása 2021 őszén a University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU) Élelmiszertudományi Intézetében történtek. Az összes többi mintát feldolgozó kísérletek kivitelezése a 2019-2022 közötti időszakban, a MATE Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet Élelmiszer-mikrobiológiai, Higiéniai és Biztonsági Tanszékén történtek.

A vízminták begyűjtése steril palackokban történtek, a mikrobiális szennyeződés elkerülése érdekében, míg a zöldségminták steril műanyag zacskókban lettek begyűjtve. A minták hűtve kerültek szállításra. A zöldségek a mintavételi helyek szerinti származásuk alapján, két csoportba lettek osztva. Ennek megfelelően a Zöldség1 csoport Soroksárról, míg a Zöldség2

csoport a Debrecenből származó mintákat tartalmazott. A Zöldségek1 csoportba a hagyma, a kukorica, a saláta, a spenót, míg a Zöldségek2 csoportba a paradicsom, a spenót és a sóska tartozik.

3.2 Táptalajok és izolátumok tenyésztése

3.2.1 Baktériumok tenyésztéséhez használt táptalajok

A minták pufferolt peptonvízben (BPW) (Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid Ltd., Basingstoke, Egyesült Királyság) lettek hígítva. Legalább 3 tizedelő hígítást követően a minták, a karcagi, kengyeli, rákóczipfalvai, szolnoki öntözővízminták kivételével 3 tápagon lettek szélesztve: Trypticase Soy Agar (TSA) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország), Reasoner's 2A agar (R2A agar) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország), Élesztőkivonat agar (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) és Violet Red Bile Dextrose agar (VRBD) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A lemezek inkubációja 24-48 órán át 30 °C-on történt. Minden szélesztésből 2 ismétlést készítve. A trágyaminták esetében 8 hígítási tag volt szükséges, hogy a lemezekről jól elkülöníthető telepeket lehessen izolálni.

3.3 Módszerek

3.3.1 A környezeti izolátumok MALDI-TOF MS-rel történő azonosítása

Az izolátumok azonosítása a kiterjesztett közvetlen átviteli eljárással történt, azaz minden izolátum a Bruker által biztosított acél tárgylemezekekre került felvitelre steril fogvájó felhasználásával, majd a mintákhoz 1 µl 70%-os hangyasav lett hozzáadva. Ezt követően levegőn szárítás után a mintához 1 µl alfa-ciano-4-hidroxi-fahéjsav (α -cyano-4 hydroxycinnamic acid, HCCA) mátrix oldat lett hozzáadva. Minden izolátum két ismétlésben került lemérésre. Az azonosítás a MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH & Co, Billerica, Massachusetts, USA) programmal történt. A MALDI-TOF MS nemzetség vagy faj szintű azonosítási eredményeinek meghatározása a Bruker által leírtak szerint történt.

3.4.2 DNS-extrakció és a vízből izolált baktériumok Sanger szekvenálása

A korábban kitenyésztett izolátumok DNS-extrakciója a Chelex módszerrel történt. Az izolátumok DNS-ének kinyerése után a 16S rRNS génspecifikus PCR futtatása következett. A PCR-termékek kiértékelése 1%-os agaróz gélelektroforézissel történt. A minták tisztítása a peqGOLD Cycle-Pure Kit-tel (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) történt, a gyártó utasításait követve. 12 µl mennyiségű tisztított DNS-hez 3 µl 27F gén primer került

hozzáadásra, a Sanger szekvenálást a Microsynth AG (Balgach, Svájc) végezte. A szekvenciák azonosítása az NCBI BLAST funkciójával, az NCBI RefSeq RNA szekvencia-adatbázisával történt. A baktériumfajok meghatározására korábbi eredményeknek megfelelően 98,65%-os szekvenciahasonlósági került elfogadásra (Strejcek és mtsai 2018).

3.4.3 DNS-extrakció és az öntözővízminták újgenerációs szekvenálása

Az öntözővíz mintákból származó mikrobiális genomiális DNS izolálása a DNeasy PowerSoil Pro Kit-tel (QIAGEN, Hilden, Németország) történt. Az eljárás a gyártó leírása alapján történt. Az amplikon-könyvtár létrehozása, minőség-ellenőrzése és a szekvenálás a Vienna Biocenter Core Facilities NGS-egységében (www.vbcf.ac.at) került végrehajtásra. A 16S rRNS gén V3–V5 hipervariábilis régiójának amplifikálása és szekvenálása 300 bp-os páros végű olvasási protokollal, Illumina MiSeq platformon történt (Illumina, Inc., San Diego, California, USAA nyers szekvenciaadatok a PRJEB56665 azonosítóval elérhetőek a European Nucleotide Archive weboldalán.

3.5 Adatok elemzése

3.5.1 MALDI-TOF MS azonosítási eredmények elemzése

Az azonosítási folyamat MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH & Co, Billerica, Massachusetts, USA) alkalmazásával történt. A FlexControl és FlexAnalysis (Bruker Daltonics GmbH & Co, Bremen, Németország) programok felhasználásával történt az adatgyűjtés, illetve az adatfeldolgozás.

3.5.2 Biomarker kimutatási kísérletekből nyert adatok elemzése

A MALDI-TOF MS készülék beállításai megegyeztek a 3.4.1-es fejezetben ismertetett beállításokkal. A FlexAnalysis (Bruker Daltonics GmbH & Co, Bremen, Germany) szoftver minden nyers spektrumokból létrehozta az intenzitások listáját a megfelelő m/z adatokkal. A két-két *E. coli* és *S. aureus* izolátumok differenciálásához a főkomponens analízissel (PCA), Mass-Up program alkalmazásával végeztem (López-Fernández et al. 2015).

A különböző táptalajokon tenyésztett két *E. coli* törzs (DSM 11250, ATCC 13706) és *S. aureus* törzsek (ATCC 25923, ATCC 43300) tömegspektrumának differenciálása diszkriminancia analízissel (DA) történt (IBM SPSS Statistics 27) történt. A korábban mért 60, illetve 80 tömegspektrum került elemzésre a DA-sel. A különböző táptalajokon tenyésztett izolátumok

azonosítási pontszámait egytényezős ANOVA alkalmazásával kerültek összehasonlításra (IBM SPSS Statistics 27, IBM Corp. 2020).

3.5.3 A táptalajokat vizsgáló kísérletekből nyert adatok elemzése

A MALDI-TOF MS készülék beállításai és az azonosítási folyamat megegyezett a 3.4.1-es fejezetben ismertetett beállításokkal. A négy táptalajon tenyésztett *S. aureus* izolátum azonosítási pontszámának összehasonlítása egytényezős ANOVA alkalmazásával történt (IBM SPSS Statistics 27, Armonk, New York, USA). A Ferdeség és Csúcsosság értékei alapján a reziduumok normális eloszlásúak voltak. A Levene-teszt alapján a szóráshomogenitás sérült ($p < 0,001$), ezért a Games-Howell tesztet (Post hoc) volt alkalmazva (IBM Corp. 2020).

Az *E. coli* tápközeg-kísérleteknél a Kolmogorov–Smirnov teszt ($p > 0,05$) bebizonyította, hogy a reziduumok normális eloszlásúak, a variancia homogenitása pedig Levene tesztel ($p > 0,05$) került ellenőrzésre (IBM Corp. 2020).

3.5.4 A MALDI-TOF MS és a 16S rRNS génszekvenálás összehasonlításának adatelemzése

A MALDI-TOF MS és 16S rRNS gén szekvenálás azonosításának hatékonyságának tesztelése páros t-teszt alkalmazásával történt (IBM SPSS Statistics 27, Armonk, New York, USA) (IBM Corp 2020).

3.5.5 Alkalmazott bioinformatika és szekvencia analízis az újgenerációs szekvenálás során

A primerek eltávolítása a nyers szekvenciákból a cutadapt v2.1 használatával történt (Martin 2011). A nyers szekvenciák további feldolgozása a dada2 v1.14.1 pipeline segítségével az R v3.6.3 verziójával történt (Callahan et al. 2016; R Core Team 2021). A szekvenciák taxonómiai hozzárendelése a SILVA rRNA SSU 138 adatbázissal, az „assign Taxonomy” paranccsal történt (Quast et al. 2013).

Az újgenerációs szekvenálásból származó adatok tovább elemzése a MicrobiomeAnalyst programmal történt (Dhariwal és mtsai. 2017). Összesen 33 alacsony abundanciájú ASV került eltávolításra, melyek prevalenciája $< 20\%$ és előfordulása < 4 volt. Az adatszűrést követően 730 ASV további elemzése történt és kerültek beépítésre az eredmények fejezetbe.

4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Baktériumok azonosítása környezeti mintákból MALDI-TOF MS alkalmazásával

Doktori munkám során a MALDI-TOF MS-t a különböző típusú környezeti mintákból származó baktériumok azonosítására használtam. Összesen 21 mintából 311 baktérium került izolálásra. A minták több Gram-negatív izolátumot (225) tartalmaztak, amelyekből 178-at (79,1%) nemzetségszinten, 92-t (40,9%) fajszenen sikerült azonosítani, az azonosítatlan kategóriába mindössze 47 (22,3%) izolátum került. Ezenkívül a 86 Gram-pozitív baktériumból 62-t (72,1%) nemzetségszinten, 22-t (25,6%) pedig fajszenen azonosított a Biotyper. Emellett 24 (27,9%) Gram-pozitív izolátumot nem sikerült azonosítani. Elmondható, hogy figyelembe véve mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív környezeti izolátumok eredményeit, a Biotyper összesítve 77,2%-os nemzetségszintű és 36,6%-os fajszenen azonosítási eredményt ért el.

Mindazonáltal az itt bemutatott mérésekből nyert adatok arra utalnak, hogy a MALDI-TOF MS Biotyper megbízható és gyors eszköz lehet a környezetből származó baktériumok nemzetségszintű azonosítására. Azonban, amint az a dolgozatban bemutatott eredményekből is látható ahhoz, hogy ugyanazt az eredményt fajszenen is elérjük, az adatbázis további fejlesztésre szorul a környezetből származó fajok hozzáadásával.

4.2 A MALDI-TOF MS minta-előkészítési technikáinak összehasonlítása

Ebben a fejezetben két mintaelőkészítés eljárás, kiterjesztett közvetlen átviteli (hangyasavas extrakció) eljárás és a közvetlen átviteli eljárás került összehasonlításra. A hangyasav-extrakcióval azonosított 62 izolátum közül mindössze kettő esetében nem volt elérhető a nemzetségszintű azonosítás, míg a hangyasavas extrakció nélkül 16 izolátum esetében volt nem megbízható az azonosítási eredmény. Ezen 16 izolátumból 14-et legalább nemzetségszinten, kettőt pedig fajszenen sikerült azonosítani hangyasav hozzáadásával. A hangyasavas extrakció esetében 96,8%-os nemzetségszintű, míg hangyasav alkalmazása nélkül mindössze 73%-os nemzetségszintű azonosítási eredményt sikerült elérni. Továbbá szintén kiemelendő, hogy a 62 izolátumból 31 (50%) került azonosításra hangyasavval fajszenen, míg annak hiányában csak 22 (34,9%).

A kiterjesztett közvetlen átviteli eljárás alkalmazásának előnye az eredményekből szembetűnő. Emellett, a kiterjesztett közvetlen átviteli eljárás átlagos log pontszáma 2 felett volt, így elérte a fajszenen azonosítási küszöbértéket, míg a közvetlen átviteli eljárás átlagos log pontszáma

csak 1,85 volt. Páros t-próba ($t=16,09$, $p<0,001$) is bizonyította, hogy a két mintaelőkészítési módszer átlagos logaritmikus pontszámai között szignifikáns különbség volt, tehát a kiterjesztett közvetlen átviteli eljárás hatékonyabbnak bizonyult környezeti mikrobák MALDI-TOF MS-rel történő azonosításához, mint a közvetlen átviteli eljárás.

4.3 A táptalajok hatásának vizsgálata a MALDI-TOF MS azonosítására a vízből származó izolátumok esetében

Ebben a fejezetben a TSA, a validált táptalaj, eredményei kerültek összehasonlításra az R2A és az Élesztőkivonat agar (YEA) eredményeivel. A mérésekhez kiválasztott 23 izolátumot korábban különböző vizekből (tavak, folyók) izoláltam. A vizsgálatban szereplő izolátumok többnyire Gram-negatív baktériumok az *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella*.

A TSA agar, a MALDI-TOF MS azonosítási technikához validált tápközeg, eredményei azt mutatják, hogy a 23 vízben található izolátumból 11 (47,8%) fajsztinten, 19 (82,6%) nemzetségsztinten került azonosításra. Négy izolátum (17,4%) nem került azonosításra. R2A agaron a 23 izolátumból 12 (52,2%) került azonosításra fajsztinten, amely érték magasabb, mint a TSA agaron elért eredmény. Azonban az azonosítatlan izolátumok száma is magasabb, mint a TSA agaron, mivel a 23 izolátumból ötöt (21,8%) nem sikerült azonosítani nemzetségsztinten sem, szemben a TSA-n felvett négy azonosítatlan izolátummal. R2A agaron nemzetségsztinten 18 (78,3%) izolátumot sikerült azonosítani. Az Élesztőkivonat agar (YEA) eredményei hasonlóak voltak a TSA-n és az R2A-n kapott eredményekhez, mivel a 23 izolátumból 11-et (47,8%) fajsztinten sikerült azonosítani. Ez a táptalaj bizonyult a legjobbnak, hiszen a legkisebb számú, mindössze három (13%), azonosítatlan izolátumot is ezen táptalajon sikerült elérni.

Az eredmények alapján az R2A és az Élesztőkivonat agar is alkalmas vízből származó baktériumok MALDI-TOF MS azonosítására, mivel a log pontszámok átlagai között nem volt szignifikáns különbség, amelyet az ANOVA-val ($F=0,10$, $p=0,90$, $F_{crit}=3,13$) igazoltam. Az átlagos log pontszámok azonban minden esetben a 2, azaz a fajsztintű azonosítási küszöbérték alatt voltak (TSA, 1,97; R2A, 1,95; YEA, 1,97). Így ezen eredmények is rávilágítanak a MALDI-TOF MS Biotyper korlátaira a környezeti baktériumok fajsztintű azonosítását tekintve, továbbá az adatbázis környezeti izolátumokkal történő bővítésének szükségességére újfent felhívják a figyelmet. Az eredmények alapján a vízből származó izolátumok TSA-n történő azonosítása mellett javasolható az Élesztőkivonat agaron történő párhuzamos azonosítás a jobb fajsztintű azonosítási eredmények érdekében.

4.4 Baktériumtörzsek elkülönítése és a táptalajok hatásának tesztelése a törzsek tömegspektrumain MALDI-TOF MS segítségével

4.4.1 Baktériumtörzsek elkülönítése többváltozós statisztikai módszerekkel

Ebben az alfejezetben a MALDI-TOF MS baktériumtörzsek differenciálására került felhasználásra, emellett a táptalajok hatása az egyes baktériumtörzsek PMF-ére (protein mass fingerprint) is tesztelésre került. Két Gram-pozitív törzs, a *S. aureus* ATCC 25923, egy referencia törzs és a *S. aureus* ATCC 43300, egy methicillin-rezisztens törzs került tesztelésre négy különböző táptalajon (TSA, YEA, R2A, Baird-Parker agar). A törzsek megkülönböztetése főkomponens analízis (PCA) alkalmazásával történt. A PCA-val nyolc egymástól jól elkülönített csoport keletkezett, amelyek tartalmazták az egyes táptalajokon felvett törzsek külön-külön kapott tömegspektrumait. A PCA alkalmazása a tömegspektrumokon lehetővé tette a *S. aureus* törzsek differenciálását, mivel mindegyik csoport jól elkülönült egymástól. Emellett, a *S. aureus* ATCC 43300 tömegspektrumában mind a négy táptalajon egy specifikus csúcs volt megfigyelhető m/z 5868-nál, amely csúcs ezen törzs specifikus biomarkerének tekinthető, mivel csak a fent említett törzs tömegspektrumában volt csak jelen.

Az *E. coli* ATCC 13706 és *E. coli* DSM 11250 törzsek megkülönböztetése is főkomponens analízissel (PCA) történt. A TSA mellett R2A és Élesztőkivonat agar került felhasználásra. Ezen kísérleteknél a hat csoport egyértelműen elkülönült. Ezenkívül sikerült két törzsspecifikus csúcs kimutatása az m/z 6640 és m/z 8912 értéknél az *E. coli* ATCC 13706 tömegspektrumában. Ezek a csúcsok lehetővé tették a tanulmányban használt két *E. coli* törzs megkülönböztetését, mivel ezek csak az *E. coli* ATCC 13706 tömegspektrumában voltak jelen mindhárom táptalajon. Ezen csúcsok jelenléte a MALDI-TOF MS által azonosított *E. coli* izolátumok tömegspektrumában az *E. coli* ATCC 13706 gyors azonosításához vezethet, így ezek fontos biomarkereknek tekinthetők e faj esetében.

4.4.2 A táptalaj baktériumtörzsek tömegspektrumaira gyakorolt hatásának elemzése

A táptalajok baktériumtörzsek tömegspektrumára gyakorolt hatásának elemzése diszkriminancia analízissel (DA), *S. aureus* törzsek alkalmazásával történt. A *S. aureus* ATCC 25923 tekintetében a DA egyértelműen elválasztotta a Baird-Parker agaron felvett tömegspektrumokat a többi csoporttól, ami az azonosítási eredményeken is látható volt, mivel a legalacsonyabb pontszám ezen a táptalajon jelent meg. Ezenkívül mind a négy táptalaj csoportja elkülönült egymástól. A TSA, R2A és YEA csoportjai közelebb kerültek egymáshoz, mivel ezek a spektrumok hasonlóbba voltak egymáshoz, és az azonosítási pontszámaik is

közelebb álltak egymáshoz. A *S. aureus* ATCC 43300-at illetően a DA kimutatta, hogy a két tápanyagban gazdag táptalajon, a TSA-n és a YEA-n felvett spektrumok hasonlóak voltak egymáshoz. Azonban nem csak a Baird-Parker Agar csoportja állt távolabb a két magas tápanyagtartalmú táptalaj csoporttól, hanem az R2A, egy alacsony tápanyagtartalmú táptalaj csoportja is. A legjobb tápközeg mindkét *S. aureus* törzs esetében a TSA volt, mivel a legmagasabb azonosítási pontszámot ezen a táptalajon volt elérhető. A *S. aureus* ATCC 25923 azonosítási pontszáma magasabb volt a Baird-Parker Agar és Élesztőkivonat agar esetében, de az R2A agaron a *S. aureus* ATCC 43300 jobb eredményeket ért el. A négy táptalajon tenyésztett *S. aureus* izolátumok azonosítási pontszámának összehasonlítása egytényezős ANOVA-val történt. A statisztikai elemzés szignifikánsnak bizonyult ($F=22,164$; $p<0,001$), ezért Games-Howell (Post hoc) teszt, azt mutatta, hogy a Baird-Parker agaron kapott spektrumok átlagai szignifikánsan eltértek a TSA agartól ($p<0,001$). Az R2A és Yeast Extract Agar spektrumainak átlagai nem tértek el szignifikánsan a TSA agar átlagától. Így az R2A és Élesztőkivonat (YEA) agarok alkalmasak a *S. aureus* MALDI-TOF MS-rel történő azonosítására.

A két *E. coli* törzs (ATCC 13706, DSM 11250) esetében a DA eredményei alapján három csoport alakult ki az egyes táptalajokon felvett spektrumok függvényében. Az 1. csoportban az R2A agaron, a 2. csoportban az Élesztőkivonat agaron és a 3. csoportban TSA-n felvett tömegspektrumok kerültek. A DA alkalmazásával mindkét törzs esetében egyértelműen elkülöníthetővé váltak a különböző táptalajokon generált bakteriális tömegspektrumok. Az alkalmazott táptalajok által generált spektrumok különbségeit a DA úgy jelenítette meg, hogy a két magas tápanyagtartalmú tápközeg (YEA, TSA) csoportjai közelebb helyezkedtek, míg az alacsony tápanyagtartalmú R2A agar csoportja távolabb helyezkedtek egymáshoz. Azonban a MALDI-TOF MS képes volt mindkét *E. coli* törzset fajszinten azonosítani mindhárom vizsgált tápközegen. A legjobb táptalajnak az Élesztőkivonat agar bizonyult, mivel ennek alkalmazása eredményezte a legmagasabb azonosítási pontszámot. Az egytényezős ANOVA kimutatta, hogy az azonosítási pontszámok között nincs szignifikáns különbség, így az *E. coli* izolátumok azonosításának megbízhatósága nem különbözött ($p>0,05$).

4.5 A MALDI-TOF MS és a 16S rRNS génszekvenálás összehasonlítása a vízben terjedő baktériumok esetében

A dolgozat ezen fejezetében a MALDI-TOF MS azonosítási hatékonyságát teszteltem a Sanger szekvenálással szemben 42 vízből származó baktériumon, melyeket öt öntözővíz mintából (Kengyel, Karcag, Rákóczipfalva, Szolnok1, Szolnok2) izoláltam. A MALDI-TOF MS és 16S rRNS génszekvenálás a 42 izolátum közül 11-et eltérő eredménnyel azonosított. Az ezen

kísérletekben leggyakrabban előforduló 20 *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó izolátumból kettő esetében különböző eredményt tapasztaltam. A MALDI-TOF MS azonosítás mindkét esetben *Acinetobacter junii* eredményt hozott, míg a Sanger szekvenálás ezeket az izolátumokat *Acinetobacter schindleri* fajként azonosította. Egy *Rhodococcus* nemzetséghez tartozó izolátumot egyik technika sem tudott fajsztinten azonosítani. Az *Enterobacter* és *Pseudomonas* izolátumok között is megfigyelhetőek voltak eltérések. A MALDI-TOF MS a dolgozatban #6-tal és #9-cel jelölt izolátumokat *E. hormaechei* és *E. cloacae* fajokként azonosította, a Sanger szekvenálás viszont nem tudta megkülönböztetni az előbbit, mivel az *E. cloacae* és az *E. hormaechei* szekvenciái is 99,9%-os hasonlóságot mutattak. Habár a #9-es izolátumot *E. cloacae* fajként azonosította a MALDI-TOF MS, a Sanger szekvenálás eredménye 99,48%-os hasonlóságot mutatott egy *E. hormaechei* szekvenciájával. A #10 és #11 jelölésű izolátumokat a MALDI-TOF MS fajsztinten *Pseudomonas veronii* izolátumokként azonosította, míg az előbbi esetében a Sanger szekvenálás 100%-os hasonlóságot mutatott *Pseudomonas veronii*/*Pseudomonas extremaustralis* fajok esetében is. Az utóbbi izolátum esetében a legjobb találat pedig egy nem jellemzett *Pseudomonas* faj volt.

Az alkalmazott módszerek hasonló azonosítási eredményeket eredményeztek, mivel mind a Sanger szekvenálás, mind a MALDI-TOF MS a 42 vízből izolált baktérium több, mint 60%-át azonosította fajsztinten. MALDI-TOF MS alkalmazásával 95,2%-os nemzetségszintű és 66,7%-os fajsztintű azonosítást, még Sanger szekvenálással 90,5%-os nemzetségszintű azonosítás mellett 64,3%-os fajsztintű eredményt sikerült elérni. A páros t-próba azonban azt mutatta, hogy a két módszer azonosítási eredményei között nincs szignifikáns különbség ($t(41)=2,02$; $p=0,57$).

4.6 16S rRNS amplikon szekvenálás a Jász-Nagykun-Szolnok megyei öntözővizek mikrobiotájának jellemzésére

A MALDI-TOF MS és a 16S rRNS génszekvenálás összehasonlításához használt öt öntözővíz mintát (Kengyel, Karcag, Rákóczi falva, Szolnok1, Szolnok2) felhasználva, az újgenerációs szekvenálás alkalmazásával meghatároztam az öntözővizekből kitenyészhető és ki nem tenyészhető baktériumnemzetségek relatív abundanciáját.

A vízminták mikrobiális közössége a nemzetségeket tekintve diverz volt, mivel az öt leggyakrabban előforduló nemzetség minden mintában eltérő volt. Az 1. mintában a legelterjedtebb nemzetség a *Tepidimonas* volt, amelyet a *Flavobacterium*, a *Methylococcus*, a *Methylophilaceae* UBA6140 és a *Nocardioides* követett. A 2. mintában a legelterjedtebb nemzetség a *Sideroxydans* volt, amelyet a *Brevundimonas*, *Terrimonas*, *Mycobacterium* és a

Candidatus Omnitrophus nemzetség követett. A 3. mintában a legelterjedtebb nemzetség a *Nitrosomonas* nemzetség volt, amelyet a *Candidatus Nitrotoga* és a *Permianibacter* követett. Gyakoriak voltak a *Hydrogenophaga* és a *Pseudohongiella* nemzetségek is. A 4. mintában megfigyelt nemzetségek abundanciája összehasonlítható volt a 3. mintával, mivel a nitrifikáló baktérium nemzetségek, mint a *Nitrosomonas* és a *Candidatus Nitrotoga* voltak a második és a negyedik leggyakoribb nemzetségek. A legelterjedtebb nemzetség azonban a *Gordonia*, a harmadik leggyakrabban előforduló nemzetség a *Sphingobium*, míg az ötödik a *Rhodococcus* nemzetségek voltak. Az 5. mintában a Comamonadaceae család dominanciája volt megfigyelhető, mivel az öt leggyakrabban előforduló nemzetségből négy ebbe a családba tartozott. A legelterjedtebb nemzetség a *Rhodoferax*, majd az *Acidovorax*, a *Hydrogenophaga*, az *Aquabacterium* és a *Dechloromonas* voltak.

Bár a *Nitrosomonas* nemzetség volt a legdominánsabb nemzetség a relatív abundancia (11,04%) tekintetében, egyetlen egy izolátumot sem sikerült kitenyészteni. Ezzel szemben az *Acinetobacter*, a legdominánsabb kitenyészett nemzetség, relatív abundanciát (0,64%) tekintve csak a 31. volt a teljes baktériumközösségben. Hasonlóképpen, annak ellenére, hogy öt izolátumot sikerült kitenyészteni a *Pseudomonas* és *Enterobacter* nemzetségekből, a hozzájuk tartozó relatív abundancia értékek csak 0,24% és 0,04% voltak. Bár a *Brevundimonas* nemzetség rendelkezett a legnagyobb relatív abundancia értékkel (2,18%) a kitenyészett nemzetségek között, mégis csak három izolátuma volt kitenyészthető. Továbbá a *Rhodococcus* nemzetségből, amely a második legmagasabb relatív abundancia értékkel (0,81%) bírt a kitenyészett nemzetségek között, csak két izolátumát sikerült kitenyészteni. Bár a *Chryseobacterium* nemzetség relatív abundanciája (0,35%) a negyedik legmagasabb volt a kitenyészett nemzetségek között, mégis csak egy hozzátartozó izolátumot sikerült kitenyészteni és beazonosítani.

5 KÖVETKEZETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A disszertáció első részében a mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/repülési idő-ionizációs tömegspektrometriát (MALDI-TOF MS) alkalmaztam élelmiszer- és vízeredetű baktériumok azonosítása érdekében különféle mátrixokból, mint az öntözővíz, folyóvíz, zöldségek és trágya. A doktori dolgozatban beazonosított 311 környezeti izolátum vizsgálatával átfogó képet tudtam nyújtani a MALDI-TOF MS (Biotyper) azonosítási teljesítményéről, környezeti mikrobiológia tekintetében. Az eredmények azt mutatják, hogy a Gram-pozitív baktériumokat nehezebb azonosítani a MALDI-TOF MS (Biotyper) segítségével, mivel alacsonyabb (25,5%) fajszintű azonosítási eredményt értek el a Gram-negatív izolátumokhoz képest (40,9%). A mérésekből nyert adatok alapján a MALDI-TOF MS (Biotyper) megbízható technika lehet a mezőgazdasági környezetből származó baktériumok nemzetség szintű azonosítására, de ahhoz, hogy fajszinten is hasonló eredményeket lehessen elérni, elkerülhetetlen az adatbázis környezeti izolátumokkal való bővítése.

Kétféle MALDI-TOF MS minta-előkészítési technikát, a hangyasavas extrakciót magába foglaló, kiterjesztett közvetlen átviteli eljárást és a közvetlen átviteli eljárást hasonlítottam össze, hogy meghatározzam, melyik a hatékonyabb módszer környezeti izolátumok azonosításához. A hangyasavas extrakcióval elért átlagos log pontszám 2 felett volt, így elérte a fajszintű azonosítási határt, míg a hangyasav felhasználása nélkül elért átlagos log pontszám mindössze 1,85 volt. Emellett a páros t-próba bebizonyította, hogy a kiterjesztett közvetlen átviteli eljárás szignifikánsan hatékonyabb környezeti izolátumok esetében, mint a közvetlen átviteli eljárás.

A doktori disszertáció következő részében diszkriminancia analízis alkalmazásával vizsgáltam a különböző táptalajok MALDI-TOF MS azonosítási technikára való hatását. Így diszkriminancia analízis segítségével kimutattam, hogy a MALDI-TOF MS tömegspektrumai elkülöníthetők az alapján, hogy melyik táptalajon volt tenyésztve az adott mikroba. Emellett megállapítottam azt, hogy törzsgyűjteményekből származó izolátumok esetében alkalmazható az Élesztőkivonat agar és R2A agar a MALDI-TOF MS azonosítási folyamathoz.

A táptalajok MALDI-TOF MS azonosításra gyakorolt hatását teszteltem vizekből izolált baktériumok esetében a TSA, R2A és Élesztőkivonat táptalajok alkalmazásával. ANOVA-val igazoltam, hogy mindhárom táptalaj alkalmas vízből izolált baktériumok azonosítására, mivel a log pontszámok átlagai között nem volt szignifikáns különbség. A fajszintű azonosítási küszöbérték azonban egyik táptalaj használatával sem volt elérhető (TSA, 1,97; R2A, 1,95;

YEA, 1,97). Ezekben a mérésekben még magasabb azonosítási pontszámokat lehetett volna elérni, ha a 2-nél alacsonyabb, $\geq 1,9$ terjedő határérték kerül alkalmazásra, azonban ez több kísérletet szükségeltetik.

Ezen túlmenően lehetőség nyílt az *E. coli* baktériumok törzsszintű differenciálásához főkomponens analízis alkalmazásával. Emellett ugyanezzel a módszerrel a meticillin-rezisztens *S. aureus* törzs elkülönítése is megvalósítható volt a nem rezisztens *S. aureus* törzstől. Ezzel bizonyítva, hogy a MALDI-TOF MS technika képes különböző típusú vízből származó és antibiotikum-rezisztens baktériumok törzsszintű differenciálására. A jövőben egy további, az antibiotikum-rezisztens baktériumok törzsekre koncentráló kibővített vizsgálat lenne szükséges.

A következő részben a MALDI-TOF MS azonosítási hatékonyságát tesztelem a 16S rRNS génszekvenálással szemben, vízből izolált baktérium esetében. Mindkét módszerrel sikerült magasabb, mint 60%-os fajsztintű azonosítási eredményt elérni. A MALDI-TOF MS azonosítási technika alkalmazása több izolátum azonosítását tette lehetővé mind faj, mind nemzetség szintjén, de a páros t-teszt azt mutatta, hogy a két módszer azonosítási eredményei között nincs szignifikáns különbség. A 42 vizsgált izolátum közül 11 (26,2%) esetében eltérő eredményt adott a két azonosítási technika, azonban 10 izolátum esetében fajsztinten volt megfigyelhető az eltérés. Ezen eredményekkel sikeresen bebizonyítottam, hogy a MALDI-TOF MS (Biotyper) a 16S rRNS génszekvenálásának alternatívjaként alkalmazható vízből származó baktérium azonosításához.

A doktori disszertáció utolsó részében a MALDI-TOF MS technikát újgenerációs szekvenálással kapcsoltam össze az öntözővíz minőségének monitorozására. Mivel a baktériumok 99%-a nem tenyésztethető, előfordulhat, hogy a mikrobiális kórokozók alacsonyabb előfordulásuk nem izolálhatóak, ami akadályozza ezen kórokozók meghatározását. Érdekes módon a legnagyobb mennyiségben izolált baktérium nemzetségek (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Brevundimonas*) alacsony relatív abundancia értékekkel rendelkeztek az újgenerációs szekvencia adatállományban. Ez rávilágít arra a tényre, hogy a környezeti baktériumok többsége nem tenyésztethető, és hogy a természetes vizek átfogó feltérképezéséhez tenyésztéstől független módszerek alkalmazására is szükség van. Ezen eredmények alapján több hazai öntözővizet is érdemes lenne ezekkel a módszerekkel vizsgálni.

6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Először alkalmaztam a MALDI-TOF MS (Biotyper) módszert és adatbázisát magyar mezőgazdasági környezetből (öntözővíz, folyóvíz, tó, trágya és zöldség minták) származó baktériumok azonosítására. Így az azonosított 311 izolátum eredményeivel átfogó képet kaptam a MALDI-TOF MS (Biotyper) azonosítási hatékonyságáról. környezeti mikrobiológiát tekintve. Emellett az azonosítások eredményei arra is rávilágítanak, hogy a Gram-pozitív baktériumok környezeti izolátumait nehezebb azonosítani, mivel alacsonyabb (25,6%) fajszintű azonosítási eredmény volt elérhető a Gram-negatív izolátumokhoz képest (40,9%).

2. Kimutattam, hogy környezetből izolált baktériumok esetében a hangyasavas extrakcióval járó kiterjesztett közvetlen átviteli eljárás hatékonyabb mintaelőkészítési mód, mint a közvetlen átviteli eljárás. A páros t-teszt ($t=16,09$, $p<0,001$) bebizonyította, hogy a kiterjesztett közvetlen átviteli eljárás alkalmazásával szignifikánsan jobb eredmények érhetőek el környezeti izolátumok esetében, mivel az eredményeinek átlaga elérte a fajszintű azonosítási küszöböt.

3. Diszkriminancia analízis segítségével kimutattam, hogy a MALDI-TOF MS tömegspektrumai elkülöníthetők az alapján, hogy melyik táptalajon volt tenyésztve az adott mikroba. Emellett megállapítottam azt, hogy törzsgyűjteményekből származó izolátumok esetében közel azonos hatékonysággal alkalmazható az R2A és Élesztőkivonat agar is a MALDI-TOF MS azonosítási folyamathoz, mint a referencia TSA agar.

4. Elsőként került kimutatásra, hogy a környezeti vízmintákból izolált baktériumok MALDI-TOF MS azonosítása nem különbözött szignifikánsan attól függően, hogy a minták a validált TSA táptalajon vagy az R2A és Élesztőkivonat agaron voltak inkubálva. Az azonosítási pontszámok átlagai között nem volt szignifikáns eltérés. A fajszintű azonosítási küszöb azonban egyik táptalaj használatával sem volt elérhető (TSA, 1,97; R2A, 1,95; YEA, 1,97).

5. Főkomponens analízissel olyan csúcsoakat sikerült azonosítani, amelyekkel elkülöníthetők egymástól az *E. coli* ATCC 13706 (m/z 6640, 8912) és *E. coli* DSM 11250 baktérium törzsek. A methicillin-rezisztens *S. aureus* ATCC 43300 tömegspektrumában m/z 5868-nál megjelent specifikus csúcs detektálásával, lehetőség nyílt az antibiotikum-rezisztens törzs elkülönítésére a nem rezisztens *S. aureus* törzstől. Így az eredmények alapján a MALDI-TOF főkomponens analízissel alkalmazható baktérium törzsek differenciálására.

6. Első alkalommal került tesztelésre a MALDI-TOF MS azonosítási teljesítménye Sanger szekvenálással szemben magyar vízmintákból izolált baktériumok felhasználásával. A Sanger

szekvenálás és a MALDI-TOF MS alkalmazásával közel azonos eredmények születtek, mivel az izolátumok 64,3%-a és 66,7%-a került azonosításra fajszinten. MALDI-TOF alkalmazásával azonban több izolátumot sikerült azonosítani mind faj, mind nemzetség szinten, azonban páros t-teszt igazolta, hogy a két módszer azonosítási eredményei között nem volt szignifikáns különbség ($t(41)=2,02$; $p=0,57$). Ezáltal kimutattam, hogy a MALDI-TOF MS (Biotyper) gyors és pontos alternatívája lehet a 16S rRNS gén szekvenálásnak a vízből származó baktériumok azonosítása során.

7. Elsőként alkalmaztam a MALDI-TOF MS-t és az újgenerációs szekvenálást kelet-magyarországi öntözővizek mikrobiális monitorozására. Az eredmények azt mutatták, hogy a legnagyobb mennyiségben kitenyészített nemzetségek (*Acinetobacter*, 0,64%; *Pseudomonas*, 0,24%; *Enterobacter*, 0,04%; *Brevundimonas*, 2,18%) alacsony relatív abundancia értékekkel bírtak a szekvencia adatsorban. Ezáltal kimutattam azt, hogy az öntözővizekből kitenyészíthető baktériumnemzetségek alacsony relatív abundancia értékkel bírnak, míg a magasabb relatív abundanciával rendelkező nemzetségek (*Nitrosomonas*, 11,04%, *Tepidimonas*, 6,7%, *Gordonia*, 4,89%) nem voltak kitenyészíthetők.

7 FONTOSABB REFERENCIÁK

Betts, R. (2014): 'Microbial update: fruit and salad', *International Food Hygiene*, 25(3); 9–12. doi: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/International-Food-Hygiene-Vol25-No3-Fruit-and-Fresh-Produce.pdf>

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., & Holmes, S.P. (2016): 'DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data', *Nature Methods*, 13(7), pp. 581–583. doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I., Agellon, L.B., & Xia, J. (2017): 'MicrobiomeAnalyst – a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data', *Nucleic Acids Research*, 45(1), pp. 80-188. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2019): 'The European Union One Health 2018 Zoonoses Report', *EFSA Journal*, 17(12), e05926. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2021): 'The European Union One Health 2019 Zoonoses Report', *EFSA Journal*, 19(2), e06406. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>

Falardeau, J., Johnson, R.P., Pagotto, F., & Wang, S. (2017): 'Occurrence, characterization, and potential predictors of verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in surface water used for produce irrigation in the Lower Mainland of British Columbia, Canada', *PloS One*, 12(9), e0185437. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185437>

IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp. <https://ibm.com>

López-Fernández, H., Santos, H.M., Capelo, J.L., Fdez-Riverola, F., Glez-Peña, D., & Reboiro-Jato, M. (2015): 'Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery', *BMC Bioinformatics*, 5(16), 318. doi: <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0752-4>

Martin, M. (2011): 'Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads', *EMBnet. journal*, 17(1), 10 doi: <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F.O. (2013): 'The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools', *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp. 590-596. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

R Core Team. (2021): R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2021. <https://www.r-project.org>.

Strejcek, M., Smrhova, T., Junkova P., & Uhlik, O. (2018): 'Whole-Cell MALDI-TOF MS Versus 16S rRNA Gene Analysis for Identification and Dereplication of Recurrent Bacterial Isolates', *Frontiers in Microbiology*, 9, 1294. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01294>

Turner, K., Moua, C.N., Hajmeer, M., Barnes, A., & Needham, M. (2019): 'Overview of Leafy Greens–Related Food Safety Incidents with a California Link: 1996 to 2016', *Journal of Food Protection*, 82(3), pp. 405–414. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-316>

Uyttendaele, M., Jaykus, L-A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., Holvoet, K., Korsten, L., Lau, M., McClure, P., Medema, G., Sampers, I., & Jasti, P.R. (2015): 'Microbial Hazards in Irrigation Water: Standards, Norms, and Testing to Manage Use of Water in Fresh Produce Primary Production', *Comprehensive Reviews in Food Science*, 14(4), pp. 336-356. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12133>

8 PUBLIKÁCIÓK

Botond Bendegúz Surányi, Benjamin Zwirzitz, Csilla Mohácsi-Farkas 1, Tekla Engelhardt 3 and Konrad J. Domig (2023) Comparing the efficacy of MALDI-TOF MS and sequencing-Based identification techniques (Sanger and NGS) to monitor the microbial community of irrigation water. *Microorganisms*, 11(2), 287. **Q2, IF: 4.926.** doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020287>

Anna Jánosity, József Baranyi, **Botond Bendegúz Surányi**, Sonja Smole Možina, Andrea Taczman-Brückner, Gabriella Kiskó, Anja Klančnik. (2023) Estimating the optimal efflux inhibitor concentration of carvacrol as a function of the bacterial physiological state. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1073798. **Q1, IF: 6.064.** doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1073798>

Botond Bendegúz Surányi, Andrea Taczman-Brückner, Csilla Mohácsi-Farkas, Tekla Engelhardt. (2023) Rapid identification of bacteria from agricultural environment using MALDI-TOF MS. *Acta Alimentaria: An International Journal of Food Science*, 52, 1. **Q3, IF: 1.000.** doi: <https://doi.org/10.1556/066.2022.00202>

KONFERENCIA ELŐADÁSOK

Botond Surányi, Tekla Engelhardt, Csilla Mohácsi-Farkas. (2022) Analyzing the effect of culture media composition on Gram-positive bacteria's peptide mass fingerprint. 4th FoodConf - International Conference on Food Science and Technology. Book of Abstracts, p. 79. Budapest, Magyarország. ISBN: 9786150154220.

Andrea Taczman Brückner, Ivett Juhász, Vivien Dancs, Hajnalka Erdős, **Botond Surányi**, Tamás Kocsis, Gabriella Kiskó. (2022) Removal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in plastic bottles filled with different beverages. 4th FoodConf - International Conference on Food Science and Technology. Book of Abstracts, p. 29. 1 p. ISBN: 9786150154220.

Botond Surányi, Csilla Mohácsi-Farkas, Tekla Engelhardt. (2022) Comparing a rapid- and a molecular biology identification method using environmental samples. MTA Kémiai Tudományok Osztálya, Élelmiszer-tudományi Bizottság, Élelmiszer-mikrobiológiai és Élelmiszer-biztonsági kollokvium.

Botond Surányi, Tekla Engelhardt, Csilla Mohácsi-Farkas. (2021) Mass spectrometry-based rapid identification of food- and waterborne microorganisms. MiCent 2021: Integrative

Biology Symposium: Microbiology, Enteric Nervous System, Central Nervous System (szóbeli prezentáció)

Botond Surányi, Engelhardt Tekla, Mohácsiné Farkas Csilla. **(2021)** Víz- és élelmiszer-eredetű mikroorganizmusok gyors módszeres azonosítása. MTA Élelmiszertudományi Tudományos Bizottság 382. Tudományos Kollokviuma (Online konferencia)

Taczmanné Brückner Andrea, Juhász Ivett, Dancs Vivien, Erdős Hajnalka, **Surányi Botond**, Kocsis Tamás, Kiskó Gabriella. **(2021)** Biofilm kialakulása és háztartási módszerekkel történő eltávolításának hatékonysága többször használatos műanyag ivópalackban. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly (LOV) Tudományos Ülésszak : Összefoglalók, Budapest, Magyarország, pp 129-129. ISBN: 9786150137384

Botond Surányi, Christoph Schönher, Philipp Proksch, Marija Zunabovic-Pichler, Ivett Juhász, Andrea Taczmann-Brückner, Engelhardt Tekla. **(2021)** Analysis of water- and foodborne bacterial mass spectra. FoodMicro2022 (absztrakt)

Botond Surányi, Tamás Kocsis, Tekla Engelhardt, Csilla Mohácsiné Farkas. **(2019)** Identification of microorganisms of irrigation water samples with MALDI-TOF MS. BiosysFoodEng 2019 - Proceedings : 3rd International Conference on Biosystems and Food Engineering. Budapest, Magyarország (Poszter)

Botond Surányi, Tamás Kocsis, Tekla Engelhardt, Csilla Mohácsiné Farkas. **(2019)** Detecting microbes with MALDI-TOF MS from irrigation water samples. SZIENTific meeting for young researchers - Ifjú Tehetségek Találkozója (ITT), Budapest (Poszter)