



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**Élelmiszerekkel terjedő patogén baktériumok gátlása antagonista  
baktériumokkal**

DOI: 10.54598/004070

Baráti-Deák Bernadett

Budapest  
2023

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** Simonné Dr. Sarkadi Livia  
egyetemi tanár, DSc  
MATE, ÉTTI  
Táplálkozástudományi Tanszék

**Témavezető:** Dr. Belák Ágnes  
egyetemi docens, PhD  
MATE, ÉTTI  
Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## Tartalomjegyzék

<b>TARTALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>3</b>
<b>JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>6</b>
<b>1. BEVEZETÉS.....</b>	<b>8</b>
<b>2. CÉLKITŰZÉS.....</b>	<b>10</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 AZ ÉLELMISZER-BIZTONSÁG HELYZETE NAPJAINKBAN.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 ÉLELMISZER OKOZTA MEGBETEGEDÉSEK AZ EURÓPAI UNIÓBAN.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 ÉLELMISZER EREDETŰ PATOGÉN BAKTÉRIUMOK.....</b>	<b>13</b>
3.3.1 <i>Salmonella enterica</i> .....	14
3.3.2 <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.3.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	17
3.3.4 <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	18
<b>3.4 ÉLELMISZER TARTÓSÍTÁS .....</b>	<b>18</b>
<b>3.5 BIOLÓGIAI KONTROLL .....</b>	<b>20</b>
3.5.1 <i>Biológiai kontroll mechanizmusok.....</i>	22
3.5.2 <i>Biokontroll az élelmiszeriparban.....</i>	24
3.5.2.1 Biokontroll használata zöldségek és gyümölcsök esetében .....	25
3.5.2.2 Biokontroll használata húsknál és húskészítményeknél.....	27
3.5.2.3 Tejtermékek.....	28
3.5.3 <i>Biokontroll mikroorganizmusok.....</i>	28
3.5.4 <i>Biokontroll baktériumok .....</i>	29
3.5.4.1 <i>Pseudomonas nemzetség .....</i>	30
3.5.4.2 <i>A Pseudomonas-ok által termelt antimikrobiális anyagok.....</i>	31
3.5.4.3 <i>Pseudomonas lundensis.....</i>	32
3.5.4.4 <i>Serratia marcescens .....</i>	33
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 FELHASZNÁLT ANYAGOK.....</b>	<b>36</b>
4.1.1 <i>Alkalmazott tápközegek.....</i>	36
4.1.2 <i>Egyéb felhasznált vegyületek és anyagok .....</i>	39
4.1.3 <i>Eszközök.....</i>	41
4.1.4 <i>Patogén baktériumok .....</i>	41
<b>4.2 MÓDSZEREK .....</b>	<b>42</b>
4.2.1 <i>Baktériumok izolálása és fenntartása .....</i>	42
4.2.2 <i>Az izolátumok csoportosítása morfológia alapján.....</i>	43
4.2.3 <i>Kontakt inhibíció vizsgálata agar spot módszerrel .....</i>	43
4.2.4 <i>Kontakt inhibíció vizsgálata agar spot módszerrel, különböző pH értékű táptalajokon.....</i>	44
4.2.5 <i>Biokémiai és fiziológiai tesztek .....</i>	44
4.2.6 <i>A gátló hatású izolátumok genomiális DNS-ének kivonása.....</i>	45
4.2.7 <i>Molekuláris tipizálás RAPD-PCR módszerrel.....</i>	45
4.2.8 <i>Antagonista hatású izolátumok azonosítása .....</i>	46
4.2.8.1 <i>Miniaturizált identifikációs tesztek .....</i>	46
4.2.8.2 <i>Szekvenálás 16S rDNS alapján .....</i>	46
4.2.9 <i>Gátló hatás vizsgálata együtt tenyésztéssel módszerrel táplevesben és tejben.....</i>	47
4.2.10 <i>Sejtmentes felülűszó gátló hatásának vizsgálata .....</i>	48
4.2.10.1 <i>Sejtmentes felülűszó gátló hatásának vizsgálata különböző tenyésztési körülmények mellett .....</i>	49
4.2.10.2 <i>Különböző kezelések hatásának vizsgálata a sejtmentes felülűszó gátló hatására.....</i>	49
4.2.10.3 <i>Liofilizálással koncentrált sejtmentes felülűszó vizsgálata.....</i>	50
4.2.11 <i>Celofános vizsgálat .....</i>	50
4.2.11.1 <i>UV spektrumok felvétele celofánon történő tenyésztés után .....</i>	51
4.2.12 <i>Antibiotikum rezisztencia vizsgálat.....</i>	51
4.2.13 <i>Proteáz aktivitás vizsgálata .....</i>	52
4.2.14 <i>Sziderofór termelés vizsgálata .....</i>	52

4.2.15 Kitináz termelés vizsgálata .....	52
4.2.15.1 Kitináz termelés vizsgálata tenyésztéses módszerrel .....	52
4.2.15.2 Kitináz kódoló gén kimutatása PCR-rel .....	53
4.2.16 Prodigiozin termelés vizsgálata .....	54
4.2.16.1 Előzetes szinteszt.....	54
4.2.16.2 Prodigiozin termelő gének PCR analízise .....	54
4.2.17 Fluoreszcencia vizsgálata <i>Pseudomonas</i> törzsek esetén .....	55
4.2.18 Kromatográfiás vizsgálatok .....	55
4.2.18.1 HPTLC vizsgálat .....	56
4.2.18.2 Frakcionált felülűzők gátló hatásának vizsgálata .....	56
4.2.18.2 Felülűzők elválasztása .....	56
<b>5. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1 A MUNKA SORÁN GYŰJTÖTT IZOLÁTUMOK .....</b>	<b>60</b>
<b>5.2 AZ ÉLELMISZER EREDETŰ PATOGÉN BAKTÉRIUMOK SZAPORODÁSÁT GÁTLÓ IZOLÁTUMOK     SZELEKTÁLÁSA.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3 A GÁTLÓ HATÁSSAL RENDELKEZŐ IZOLÁTUMOK JELLEMZÉSE, TÍPIZÁLÁSA ÉS AZONOSÍTÁSA .....</b>	<b>67</b>
<b>5.4 EGYÜTT TENYÉSZTÉSESI VIZSGÁLATOK .....</b>	<b>73</b>
5.4.1 <i>A Ps. lundensis</i> CP-P-5 törzs hatása <i>S. Hartford</i> szaporodására együtt tenyésztéses vizsgálat során.....	73
5.4.2 <i>A S. marcescens</i> CSM-RMT-1 törzs hatása <i>Salmonella enterica</i> szaporodására együtt tenyésztés során .....	74
<b>5.5 SEJTMENTES FELÜLŰZŐK GÁTLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA.....</b>	<b>75</b>
<b>5.6 KONCENTRÁLT SEJTMENTES FELÜLŰZŐK GÁTLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA.....</b>	<b>80</b>
<b>5.7 ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLAT .....</b>	<b>83</b>
<b>5.8 A KIVÁLASZTOTT ANTAGONISTA TÖRZSEK GÁTLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA TOJÁSPORBÓLBÓL     IZOLÁLT <i>SALMONELLA ENTERICA</i>-K ELLEN.....</b>	<b>85</b>
<b>5.9 CELOFÁNOS MÓDSZERREL MEGHATÁROZOTT GÁTLÓ HATÁS EREDMÉNYEI .....</b>	<b>88</b>
<b>5.10 A GÁTLÓ HATÁSÚ KOMPONENS JELLEMZÉSE ÉS MEGHATÁROZÁSA ÉRDEKÉBEN VÉGZETT     VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....</b>	<b>90</b>
5.10.1 UV spektrumok analízise a celofános vizsgálatból kinyert agar darabok esetén .....	90
5.10.2 Proteáz aktivitás vizsgálatának eredményei .....	91
5.10.3 Gátló hatás vizsgálata különböző pH értékek mellett.....	92
5.10.4 A sejtmentes felülűzők gátló hatása különböző kezelések után .....	95
5.10.5 Az antagonista <i>S. marcescens</i> törzsekkel végzett vizsgálatok eredményei .....	97
5.10.5.1 A kitináz termelés vizsgálat eredményei.....	97
5.10.5.2 A prodigiozin termelés vizsgálat eredményei .....	98
5.10.6 <i>A Pseudomonas</i> törzsekkel végzett vizsgálatok eredményei .....	100
5.10.6.1 Sziderofór termelés eredményei.....	100
5.10.6.2 Fluoreszcens pigmenttermelés vizsgálatának eredményei .....	101
5.10.7 <i>A felülűzők kromatográfiás vizsgálatának és frakcionálásának eredményei .....</i>	<i>102</i>
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....</b>	<b>107</b>
<b>7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>110</b>
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>111</b>
SUMMARY .....	114
MELLÉKLETEK.....	117
M1. IRODALOMJEGYZÉK .....	117
M2. AZ IZOLÁLT BAKTÉRIUMOK MORFOLÓGIAI JELLEMZÉSE WL NUTRIENT AGARON..	140
M3. PÉLDÁK GÁTLÓ HATÁS ESETÉN MEGJELENŐ FELTISZTULÁSI ZÓNÁKRA AZ AGARLEMEZEK FELÜLETÉN .....	142
M4. FIZIOLÓGIAI TESZTEK EREDMÉNYEI AZ INKUBÁCIÓS IDŐ VÉGÉN A 20 VIZSGÁLT ANTAGONISTA BAKTÉRIUM ESETÉBEN .....	144
M5. SEJTMENTES FELÜLŰZŐK GÁTLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SORÁN KAPOTT NÖVEKEDÉSI GÖRBÉK <i>S. HARTFORD</i> (I.), <i>E. COLI</i> (II), <i>L. MONOCYTOGENES</i> (III.) ÉS <i>Y. ENTEROCOITICA</i> (IV.) SZAPORODÁSÁT VIZSGÁLVA. AZ ELSŐ (A) ÉS MÁSODIK (B) KÖRBE GYŰJTÖTT IZOLÁTUMOK KÜLÖN MÉRÉSEKKEL, KÜLÖN KONTROLLOKKAL KÉSZÜLTEK .....	145

<b>M6. GÁTLÓ HATÁSSAL RENDELKEZŐ IZOLÁTUMOK PROTEÁZ AKTIVITÁS VIZSGÁLATA SORÁN MÉRT FELTISZTULÁSI ZÓNÁK MM-BEN 24, 48 ÉS 120 ÓRÁS INKUBÁLÁST KÖVETŐEN</b> .....	<b>149</b>
<b>M7. <i>PS. LUNDENSIS</i> (CP-P-5) ÉS <i>S. MARCESCENS</i> (CSM-RMT-1) ÁSVÁNYI ÉS MINIMÁL TÁPLEVESBEN KÉSZÍTETT FELÜLÚSZÓINAK FRAKCIÓIBÓL (A), SPE-BŐL (B) ÉS SPE VIZES FÁZISÁBÓL (C) MÉRT GÁTLÓ HATÁSA <i>S. HARTFORD</i> (I), <i>E. COLI</i> (II), <i>L. MONOCYTOGENES</i> (III) ÉS <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> (IV) ELLEN</b> .....	<b>150</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>154</b>

## **Jelölések, rövidítések jegyzéke**

AIEC: enteroadhezív *E. coli*

CAS: Chrome Azurol S

CCM: Cseh Mikroorganizmus Gyűjtemény, Cseh Köztársaság, Brno

CDC: Centers for Disease Control and Prevention (Amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ)

CHI: Svájc

BCM: Basic Chitin Medium (Kitin agar)

DAEC: diffúzan tapadó *E. coli*

DEN: Dánia

dNTP: deoxiribonukleotid trifoszfát.

DTT: dihidroteriol

EAEC: enteroaggregatív *E. coli*

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control (Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ)

*E. coli*: *Escherichia coli*

EFSA: European Food Safety Authority (Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság)

EHEC: enterohemorrágiás *E. coli*, vagy Shiga-toxin termelő *E. coli*

EIEC: enteroinvazív *E. coli*

EPEC: enteropatogén *E. coli*

ETEC: enterotoxigén *E. coli*

Et-OH: etil alkohol

Et-Ac: etil acetát

EU: Európai Unió

FDA: Food and Drug Administration (Élelmiszer és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal)

FR: Franciaország

GB: Nagy-Britannia

GER: Németország

GRAS: Generally Recognized As Safe (Általában biztonságosnak ítélt)

HNCMB: Orvosi Baktériumok Magyar Nemzeti Gyűjteménye, Magyarország, Budapest

HDTMA: hexadecil-trimetil-ammónium-bromid

HPTLC: high-performance thin-layer chromatography (Nagy teljesítményű vékonyréteg-kromatográfia)

HU: Magyarország

HUS: hemolitikus urémiás szindróma

*L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*

LV: Litvánia

MP: minimally processed (minimálisan feldolgozott)

NCAIM: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Gyűjteménye, Magyarország, Budapest

PCR: Polymerase chain reaction (Polimeráz láncreakció)

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA (random amplifikálódott polimorfikus DNS)

RTE: ready-to-eat (fogyasztásra kész)

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

*S. marcescens*: *Serratia marcescens*

SPE: solid phase extraction (szilárd fázisú extrakció)

STEC: Shiga-toxin termelő *E. coli*

TGE: Tryptone-glucose extract agar (Trypton-glükóz kivonat agar)

TSA: Tryptic Soy Agar (Kazein pepton szója pepton agar)

TSB: Tryptic Soy Broth (Kazein pepton szója pepton leves)

TW: Tajvan

USA: Amerikai Egyesült Államok

WHO: World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

WL agar: Wallerstein Laboratory Nutrient Agar

*Y. enterocolitica*: *Yersinia enterocolitica*

YOPI: young, old, pregnant, immunocompromised (fiatal, idős, várandós, immunhiányos)

## 1. Bevezetés

Az élelmiszerekkel terjedő patogén mikroorganizmusok számos humán megbetegedést okoznak a mai napig. A WHO becslései szerint évente mintegy 600 millió élelmiszer által okozott megbetegedés történik, amelyek mind megelőzhetőek lennének (WHO, 2020).

Az élelmiszerek előállítása során törekedni kell minden szempontból megfelelő minőségű, biztonságos termékek létrehozására. Az élelmiszerbiztonsági szempontok mellett a fogyasztók igénye is meghatározó, amely visszahat az iparra. Ennek eredményeként az elmúlt évtizedben egyre több olyan termék jelent meg a boltok polcain, amelyek ezt az irányt is igyekeznek kielégíteni. Az alapvető elvárás az, hogy ne jelentsen veszélyt az élelmiszer a fogyasztókra, azonban emellett megjelentek olyan szempontok is a vásárlói oldalról, mint például hogy minél szélesebb körben legyen elérhető a könnyen elkészíthető, vagy fogyasztásra kész élelmiszer, minél egészségesebb és frissebb legyen az adott termék, illetve lehetőleg mentes legyen kémiai tartósítószerektől. Ezen feltételek mellett a hagyományos tartósítási eljárások helyett, mint a hőkezelés és tartósítószer alkalmazása, egyéb kíméletes tartósító eljárások felé irányult a figyelem, valamint a kutatások is intenzívebbé váltak ebben az irányban, így egyre szélesebb körben kezdtek vizsgálatokat végezni az olyan módszerek alkalmazhatóságának megállapítására, amelyek megfelelő minőségű és kellően biztonságos termékek előállítására alkalmasak.

Az élelmiszerekben, valamint az élelmiszer-előállító és -feldolgozó létesítményekben számos mikroorganizmus van jelen. Ezek bizonyos hányada az adott termék részét képezi, azaz a természetes mikrobióta tagja, közöttük azonban számos kontamináns, esetenként patogén mikroorganizmus is előfordulhat. Ezen mikrobák eliminálása, növekedésük visszaszorítása kulcsfontosságú élelmiszerbiztonsági szempont. A mikrobiológiailag biztonságos élelmiszerek előállításához a feldolgozás szigorú higiéniai szabályainak betartása mellett ezért szükség van különböző tartósító eljárások alkalmazására is.

A biológiai kontroll (röviden biokontroll) alkalmazása alternatívát jelenthet a már jól bevált tartósító eljárások, mint a hőkezelés, hőelvonás, vízaktivitás csökkentés mellett, különösen olyan élelmiszerek esetében, ahol cél megőrizni annak friss jellegét.

A biokontroll stratégiában fontos szerepet betöltő antagonisták egyik legjobb forrása maga az élelmiszer vagy annak feldolgozó környezete lehet. Az élelmiszerek alapanyagául szolgáló nyersanyagokban vagy nyersanyagokon, illetve az azokkal érintkező felületeken nagy eséllyel lehetnek jelen potenciális biokontroll mikroorganizmusok, amelyek közvetlen vagy



közvetett felhasználása az élelmiszeriparban új lehetőséget teremthet a fogyasztók igényeinek kielégítése mellett biztonságos és megfelelő ideig eltartható élelmiszerek előállítására.

Munkám során így célul tűztem ki olyan baktérium törzsek izolálását különböző élelmiszerfeldolgozó létesítményekből, valamint az ott felhasznált alapanyagokból, amelyek képesek lehetnek meggátolni az élelmiszerekben előforduló patogén baktériumok szaporodását. Az izolátumok hatásának teszteléséhez felhasznált patogének kiválasztásakor a legnagyobb esetszámot és a legsúlyosabb megbetegedést okozó baktériumokat vettem figyelembe, így esett a választás a *Salmonella enterica*, az *Escherichia coli*, a *Yersinia enterocolitica*, és a *Listeria monocytogenes* fajokra.

## 2. Célkitűzés

Az élelmiszerfeldolgozás és az élelmiszerelőállítás biztonságának, valamint a fogyasztók egészségének védelme érdekében doktori munkám célkitűzése az volt, hogy élelmiszeripari környezetből és az ott felhasznált nyersanyagokból olyan baktériumokat izoláljak, amelyek gátló hatással bírnak különböző, élelmiszer eredetű patogén baktériumokra, majd ezt követően az izolált baktériumok biokontroll tulajdonságainak vizsgálatával a későbbi, akár ipari alkalmazhatóságának megalapozása a gátló hatásmechanizmus minél pontosabb meghatározásával.

Céljaim elérésének érdekében munkám során az alábbi lépéseket valósítottam meg:

- baktériumok izolálása élelmiszerfeldolgozó környezetből és élelmiszer nyersanyagokból;
- az izolátumok jellemzése biokémiai tesztekkel,
  - az izolált baktériumok közül a gátló hatással rendelkezők kiszűrése kontakt inhibíciós teszttel négy, élelmiszerbiztonsági szempontból jelentős patogén baktérium (*Salmonella* Hartford, *E. coli*, *L. monocytogenes*, és *Y. enterocolitica*) ellen.
  - A gátló hatással bíró izolátumok azonosítása gyors tesztekkel és molekuláris biológiai vizsgálatokkal, valamint a törzsek tipizálása DNS-alapú eljárással;
- a gátlás hátterében álló mechanizmusok felderítése
  - proteáz aktivitás vizsgálattal;
  - sziderofór termelés teszteléssel;
  - prodigiozin termelés vizsgálattal;
  - kitináz termelés vizsgálattal.
- a legerősebb gátló hatást mutató törzsek további vizsgálata:
  - sejtmentes felülúszók vizsgálatával különböző kezelések mellett,
  - együtt tenyésztéses vizsgálatokkal.
- Gátló hatás vizsgálata élelmiszer eredetű *Salmonella enterocolitica* ellen;
- a gátló hatás kimutatásához egyéb módszerekkel történtő vizsgálatok elvégzése:
  - celofános vizsgálat;
  - liofolizálással koncentrált felülúszó hatásának meghatározása.
- a gátló komponens(ek) vizsgálata kromatográfiás módszerek segítségével.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1 Az élelmiszer-biztonság helyzete napjainkban

Az élelmiszerek biztonságosságának folyamatos megléte az egyik legfontosabb tényező az élelmiszerek előállítása során, ennek ellenére számos élelmiszer okozta megbetegedést regisztrálnak évről évre. A társadalom számára okozott veszteségek mellett az élelmiszerek által okozott megbetegedések gazdasági károkat is jelentenek mind az orvosi költségek, mind a munkából való kiesés a negatív piaci reakciók és az esetleges jogi következmények miatt (Hussain és Dawson, 2013).

Az elfogyasztott élelmiszerekkel szemben támasztott alapvető követelmény, hogy azok ne veszélyeztessék a fogyasztók egészségét. Éppen ezért megfelelően szabályozott területről van szó az élelmiszer előállítás minden szegmensében. Az elmúlt évtizedekben átalakult fogyasztási szokások új előállítási és tartósítási technológiák megjelenéséhez vezettek, ám ezek mellett az élelmiszerekkel összefüggésbe hozható megbetegedések száma is nőtt (Deák et al., 2006).

Az élelmiszer-biztonsággal kapcsolatban a veszély kifejezést az alábbiakra használhatjuk: az élelmiszerben előforduló biológiai, kémiai vagy fizikai-hatású anyag, vagy az élelmiszer olyan állapota, amelynek káros egészségügyi hatása lehet (Magyar Élelmiszerkönyv, 2003). Számos, az élelmiszerekkel összefüggésben jelenlévő mikrobiológiai veszély is megjelenhet az ellátási lánc során, amelyek károsak lehetnek az emberi egészségre. Évente több millió mikrobiológiai eredetű élelmiszer okozta megbetegedés történik. A mikrobiológiai veszélyek megjelenésére több tényező is hatással lehet, az étkezési szokásoktól kezdve az egyéni érzékenyséig, vagy akár a különböző mikroorganizmus fajok közötti genetikai anyagok átadása (Bonham et al., 2017; Brown és Stringer, 2002).

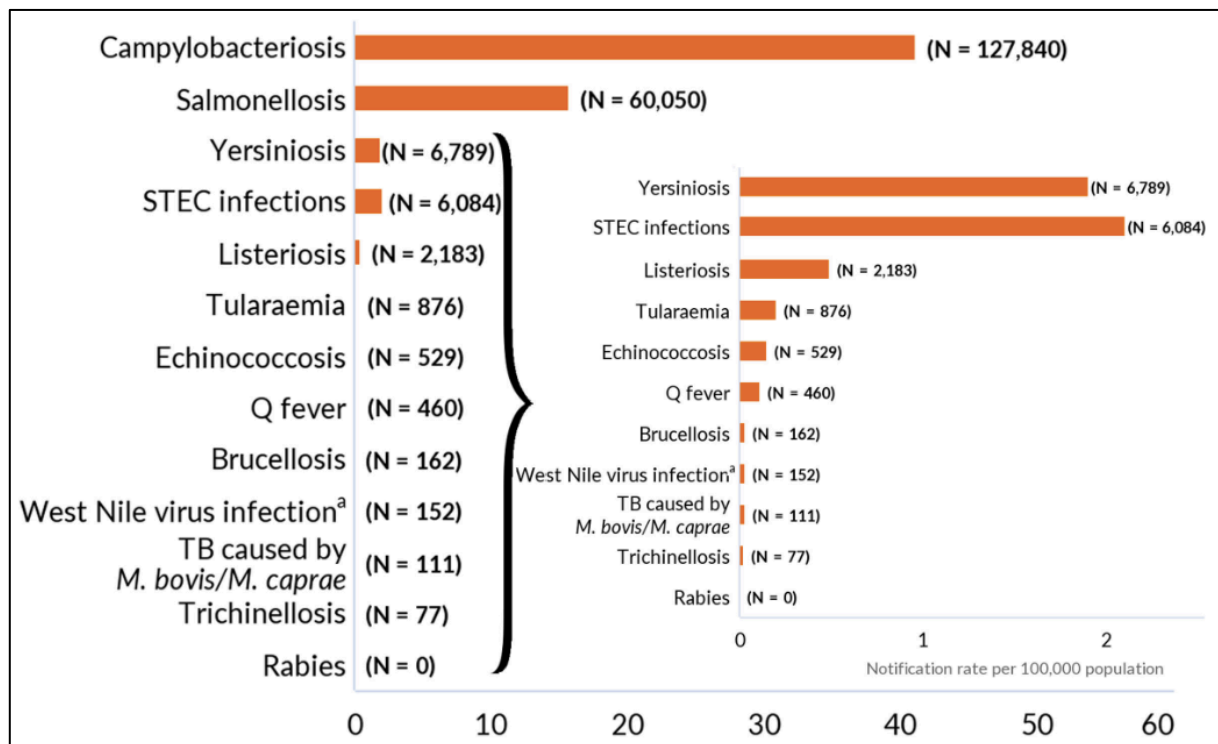
A WHO szerint (WHO, 2020) körülbelül évi 600 millió megbetegedést okoz a szennyezett élelmiszerek elfogyasztása, amiből 420.000 halálos kimenetelű. A halálozások közel 30%-a az 5 év alatti gyermekek csoportjában történik, mintegy 125.000 fővel. Ezek az élelmiszerek által okozott megbetegedések lehetnek élelmiszer-fertőzések vagy élelmiszer-mérgezések. Mind a két esetben leggyakrabban hasmenéses tünetekkel járnak a megbetegedések.

Az élelmiszerbiztonsági veszélyek előfordulhatnak az alapanyagoknál, a feldolgozó helyeken, megjelenhetnek a szállítás és tárolás, és akár az értékesítés során is. Ezért is van szükség megfelelő szabályozásra a teljes élelmiszerlánc mentén (Fellows, 2017).

A Magyarországon forgalomba hozható élelmiszereknek meg kell felelniük az Európai Unió és a hazai szabályozásnak egyaránt. Az Európai Parlament és a Tanács által kiadott rendeletek kötelezően vonatkoznak minden tagállamra, köztük hazánkra is. A 178/2002/EK rendelet tartalmazza az élelmiszerjog általános elveit és követelményeit, valamint előírja az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság létrehozását és az élelmiszerbiztonságra vonatkozó eljárások megállapítását. A jelenleg érvényben lévő, az élelmiszerbiztonsági kockázatok minimalizálását célzó jogszabályok közül a legfontosabb az Európai Parlament és a Tanács 852/2004/EK rendelete (2004. április 29.) az élelmiszer-higiénéről. A mikrobiológiailag biztonságos élelmiszerekkel szemben támasztott követelményeket az EU 2073/2005/EK rendelete tartalmazza, továbbá az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről a 4/1998. (XI. 11.) sz. EüM hazai rendelet ad leírást.

### **3.2 Élelmiszer okozta megbetegedések az Európai Unióban**

Nyolc, zoonózist okozó, a nemzeti hivatalokhoz kötelezően bejelentendő ágenszt tart számon az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság, amelyek mindegyike élelmiszerrel vagy ivóvízzel is terjed. Ezek a következők: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, Shiga-toxin termelő *Escherichia coli*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella*, *Trichinella* és *Echinococcus*. A 2021-es évről készült zoonózis beszámoló (EFSA és ECDC, 2022) szerint az Európai Unió 27 tagállamából 1099 élelmiszer okozta járványt és 198.377 esetet jelentettek. A 2020-as adatokhoz viszonyítva majdnem minden esetben nőtt a bejelentett megbetegedések száma, ez által az összes esetszám is. Az eredmények korábbi évekhez való viszonyítását megnehezíti a 2019 óta tartó koronavírus világjárvány és az Egyesült Királyság kilépése az EU-ból. Még a 2016-os évről közzétett összefoglalóban a bejelentett megbetegedések száma 360.354 volt, ebből 485 halálos kimenetelű, addig a 2020-as összefoglalóban mindössze 187.857 alkalommal jelentettek élelmiszer eredetű megbetegedést, 16.918 kórházi ellátásra szoruló esettel és 330 halálos kimenetelű megbetegedéssel. A legfrissebb, 2021-es évről szóló összefoglalóban található bejelentett zoonózis esetek száma az 1. ábrán látható.



1. ábra. A 2021-ben bejelentett zoonózis esetek száma az Európai Unióban 100.000 főre vetítve (EFSA és ECDC, 2022)

A bejelentett esetek közül a legtöbb - több, mint az összes eset 60%-a - kampilobakteriózis volt; 2005 óta mindig ez szerepel az első helyen. Ezt követték egyéb bakteriális megbetegedések, mint a szalmonellózis, yersiniózis és a STEC által előidézett esetek. A betegségek súlyosságát tekintve a liszteriózis és a Nyugat Nílusi vírusfertőzések voltak kiemelkedőek, szinte az összes kórházi ápolást igénylő megbetegedést e két fertőzés okozta. A megbetegedések súlyosságát tekintve a liszteriózis állt az élen, 13,7%-os halálozási aránnyal (EFSA és ECDC, 2022).

### 3.3 Élelmiszer eredetű patogén baktériumok

Az élelmiszerek közvetítésével okozott megbetegedések lehetnek mérgezések (toxikózis, intoxikáció) vagy fertőzések (infekció). Kialakulásukért baktériumok, vírusok, paraziták vagy kémiai anyagok tehetők felelőssé, amik a szervezetbe szennyezett élelmiszer vagy ivóvíz által kerülnek be. Élelmiszer-fertőzések során az élelmiszerrel bekerülő mikroorganizmusok a bélrendszerbe kerülve a bélhámsejtek felületén megtapadva kolonizálják azokat, és felszaporodva megtámadják a bélnyálkahártyát. Élelmiszer-mérgezés esetén a szervezeten kívül, az élelmiszerben szaporodik el a kórokozó, és toxint vagy más anyagcsereterméket termel, ami elfogyasztás után a szervezetbe bekerülve okoz megbetegedést. Toxoinfekció során

az élelmiszerrel elfogyasztott kórokozó a bélszatornában elszaporodva toxint termel, és ez okoz megbetegedést (Deák et al., 2006, WHO, 2020).

Az élelmiszer eredetű megbetegedések leggyakoribb okozói a baktériumok (Bintsis, 2017). A baktériumok patogenitása több tényezőtől függ. Ilyenek a fertőző képesség, a szaporodóképesség, az inváziós képesség, vagy a toxintermelés (extracelluláris vagy intracelluláris). A patogenitás mértékét a virulencia mutatja (Wilson et al., 2002).

A megbetegedést okozó baktériumok rendelkeznek valamilyen virulenciafaktorral, amely segíti őket abban, hogy behatoljanak a gazdaszervezetbe, betegséget okozzanak, és elhárítsák a gazdaszervezet védekezését (Peterson, 1996). A patogén baktériumok virulencia faktorai általában csak adott fajra jellemzőek, mint például az enterotoxin termelés bizonyos *E. coli* fajoknál (Cobo, 2022).

A WHO (2020) adatai alapján a megbetegedést okozó baktériumok közül a *Salmonella*, a *Campylobacter* és az enterohemorragiás *E. coli* bírnak a legnagyobb jelentőséggel, ezek okozzák a bakteriális megbetegedések túlnyomó többségét. Évente több millió embert érintenek az általuk okozott betegségek, amik általában gasztrointesztinális tünetekkel járnak, de súlyosabb esetben halálos kimenetelűek is lehetnek. Emellett a *L. monocytogenes* által okozott megbetegedések is nagyobb figyelmet kapnak, mert bár az esetszámuk nem túl nagy, de az okozott megbetegedés gyakran súlyos vagy halálos kimenetelű, különösen a veszélyezett csoportok (YOPI) körében (WHO, 2020).

### 3.3.1 *Salmonella enterica*

Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó szalmonellák nemzetségébe három faj tartozik, a *S. enterica* a *S. bongori* és a *S. subterranea*. A szalmonella típusfajként számon tartott *Salmonella enterica* faj az egyik leggyakoribb élelmiszer-fertőzést okozó baktérium (Bintsis, 2017; Crump és Wain, 2017; Shelobolina et al., 2004). A szalmonellák Gram-negatív pálcák alakú enterális kórokozók, amelyek 5-47 °C között képesek szaporodni, optimumuk 32-35 °C-on van. Vízkaktivitás igényük 0,94-0,99, pH optimumuk a semlegeshez (pH 6,5-7,5) közeli, de pH 4-9 között is képesek a túlélésre (Jajere, 2019).

A *Salmonella* ubiquiter baktérium, így számos állatban, köztük vágóállatokban is megtelepedhet. Egyes szerotípusai általánosak, némelyek azonban meghatározott

gazdaszervezetekre korlátozódnak. A *Salmonella* nemzetség több mint 2600 különböző szerotípust tartalmaz (Jajere, 2019).

Az élelmiszerek szennyeződhetnek ürülékből származó szalmonellákkal, aminek közvetítője lehet víz, talaj és a növényzet is. A húsok a vágás és feldolgozás során kerülhetnek kapcsolatba az állat bélsarából származó kórokozóval. Mivel a szalmonella nem képes szaporodni 4-5 °C alatt, ezért fontos a kész élelmiszerek megfelelő hűtése. Az élelmiszerek közvetítésével előidézett megbetegedésekkor több mint  $10^3$ - $10^5$  sejt szükséges, hogy bejusson a szervezetbe. Leggyakrabban állati eredetű élelmiszerek okoznak megbetegedést, főleg a töltelékes húskészítmények és a tojással készült hidegkonyhai ételek, de bármilyen élelmiszer szennyeződhet, ha nem megfelelőek a higiénias körülmények (Deák et al., 2006; Ehuwa et al., 2021).

Sok megbetegedésért felelős a *Salmonella enterica* subsp. *enteric* serovar Typhimurium, de az EU-ban megelőzi esetszámban az Enteritidis szerovariáns (Hernandez et al., 2012; Popa és Papa, 2021). Néhány esetben azonban előfordul más szerovariáns általi megbetegedés is.

2021-ben az EU-ban történt zoonózis okozta megbetegedések 14,6%-áért *Salmonella* volt felelős, ezzel ez a második leggyakrabban bejelentett kórokozó a legfrissebb adatok alapján, emellett a bejelentett esetek számában növekedés volt megfigyelhető a 2020-as évhez képest (EFSA és ECDC, 2022). Jelenleg is folyamatban van az EU-ban egy 2017 óta tartó *S. Virchow* ST16 által közvetített megbetegedés sorozat, ami feltételezeten fertőzött brojlercsirkékből készült kebab fogyasztásra vezethető vissza, azonban még további megbetegedések várhatóak, amíg a kórokozó pontos forrása tisztázásra nem kerül (ECDC és EFSA, 2023).

A munkám során használt szerovariáns, a *Salmonella* Hartford által 1998-ban pasztörizálatlan narancslé okozott járványt (Cook et al., 1998), 2010-ben egy mexikói étteremláncnál történt járványos megbetegedés (CDC, 2010), még 2014-ben szennyezett organikus csíráztatott chia por miatt történtek megbetegedések (Harvey et al., 2017). Ezeken felül a közelmúltban is ezt a szerovariánst azonosították mint járványért felelős ágenszt az USA-ban, de ennek a részletesebb vizsgálatáról még nem érhetőek el eredmények (FDA, 2023).

### 3.3.2 Escherichia coli

Az *E. coli* faj az *Enterobacteriaceae* család tagja. Nem spóráképző Gram-negatív pálcá alakú baktérium, amely képes lehet mozgásra is. Számos törzse flagellumokkal is rendelkezik. Mezofil, fakultatív anaerob mikroorganizmus, az egyszerű cukrokat képes fermentálni. pH optimuma 6-8 között van, de pH 4,4-9 között is életben maradhat (Bintsis, 2017; WHO, 2018). Szaporodásához korábbi megfigyelések alapján 37 °C az ideális hőmérséklet, ám a Gonthier és munkatársai (2001) által publikált eredmények ezt nem támasztották alá, megfigyeléseik alapján ugyanis a 40-41 °C volt ideális az általuk vizsgált 32 *E. coli* törzs számára.

Nagy számú *E. coli* baktérium van jelen körülöttünk. Ezek közül a legtöbb veszélytelen, van azonban köztük néhány humán patogén, amelyek különböző tulajdonságaik révén - mint például a toxintermelés - képesek megbetegedéseket okozni. A kólibaktériumként is ismert *E. coli* az ember, a melegvérű állatok és kétélűek bélsatornájának is természetes tagja ( $10^9$  sejt/g), így a fekáliás szennyezettség kimutatására, mint indikátor mikroorganizmust is használják. Patogenitásuk alapján kilenc különböző csoportba sorolhatóak a humánpatogén *E. coli* baktériumok, melyek közül az alábbi hét okoz enterális megbetegedést: EPEC (enteropatogén *E. coli*), EHEC (enterohemorragiás *E. coli*, vagy Shiga-toxin termelő *E. coli*), ETEC (enterotoxigén *E. coli*), EIEC (enteroinvazív *E. coli*), EAEC (enteroaggregatív *E. coli*), AIEC (enteroadhezív *E. coli*) és DAEC (diffúzívan tapadó *E. coli*). A leggyakrabban megbetegedést okozó *E. coli* a Shiga-toxin termelő (STEC) O157:H7 törzs. Hasmenéssel, véres hasmenéssel járó tüneteket vált ki, súlyosabb esetben úgynevezett hemolitikus urémiás szindróma (HUS) is kialakulhat. Nem kellően hőkezelt húsok, tejtermékek, számos esetben zöldségek vagy ivóvíz is lehet a fertőzés forrása (Bintsis, 2017; Pakbin et al., 2021).

Az EU zoonózisokról készült riportja alapján az látszik, hogy a 2020-as évhez viszonyítva jelentős mértékben nőtt a bejelentett STEC esetek száma: 36,9%-kal több fertőzést regisztráltak 2021-ben, és ez volt a negyedik leggyakoribb zoonózisos megbetegedést okozó élelmiszer eredetű kórokozó (ECDC és EFSA, 2023).

Európa utolsó súlyos *E. coli* járványa 2011-ben volt, amelynek kórokozója a Shiga-toxin termelő EHEC, az *E. coli* O104:H4 törzs volt. Ebben a járványban szennyezett görögszéna csíra volt a megbetegedés elsődleges terjesztője. A járvány során sok esetben alakult ki HUS és a halálozások száma is magas (53) volt, aminek következtében az emberek bizalmatlanná váltak a saláta félék iránt, ezáltal a piacon is érezhetően visszaesett ezen termékek iránt a kereslet (Burger, 2012).



### 3.3.3 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria* fajok közül a *Listeria monocytogenes* rendelkezik a legnagyobb élelmiszerbiztonsági kockázattal, azonban az elmúlt évtizedekben tett megfigyeléseket követően a *L. ivanovii* is opportunista humánpatogén kórokozóként van számontartva (Guillet et al., 2010).

A *L. monocytogenes* egy Gram-pozitív, pálcá alakú, a természetben általánosan előforduló baktérium. Széles hőmérséklet tartományban (1-45 °C) életképes, és sótűrőképessége is magas (akár 10% NaCl jelenlétében is életben marad) (Liu et al., 2005). Hűtött körülmények között is képes a szaporodásra, a szárítást és a fagyasztást is túléli, azonban hőkezeléssel, pasztörözéssel elpusztítható. Ezen tulajdonságai miatt a *L. monocytogenes* által okozott liszteriózisos megbetegedések egyik fő forrásai az úgynevezett RTE - ready to eat, azaz fogyasztásra kész - élelmiszerek lehetnek, ezek ugyanis nem igényelnek hőkezelést fogyasztás előtt. Az ilyen termékek, elkészítésük után, a csomagolás előtt szennyeződhetnek a baktériummal ami a hűtött tárolás alatt képes a szaporodásra, így okozva megbetegedést. Emellett a pasztörizálatlan tej és tejtermékek, hústermékek, mosatlan zöldségek és gyümölcsök lehetnek még a fertőzés forrásai (Chlebicz és Śliżewska, 2018; Bintsis, 2017).

A liszteriózis kialakulása enterális úton történik, de nem minden esetben gastrointesztinális tüneteket okoz. Előfordulása bár ritkább, lefolyása súlyosabb, 25-30%-os mortalitással rendelkezik. Különösen a veszélyeztetett YOPI csoportra jelent nagy kockázatot (Chlebicz és Śliżewska, 2018; Bintsis, 2017).

Az EU-ban a liszteriózis volt az ötödik leggyakoribb zoonózisos megbetegedés 2021-ben, a halálozási rátát tekintve azonban az első helyen áll a megbetegedések között. *Listeria*-val leggyakrabban RTE termékek – hal hús és tejtermékek- voltak szennyezettek, ezek sok esetben még forgalomba hozatal előtt kiszűrhetőek voltak. A *Listeria* által okozott megbetegedések nagyobb veszélyt jelentenek az idősekre és a krónikus betegségekben szenvedőkre, ami Európa öregedő népességére nézve évről évre fokozódó kockázatot jelent. (ECDC és EFSA, 2023).

### 3.3.4 *Yersinia enterocolitica*

A bélbaktériumok (*Enterobacteriaceae*) családjába tartozó *Yersinia* nemzetség 26 ismert fajából (LPSN, 2023) a *Y. enterocolitica* az, amely élelmiszer-fertőzéseket okozhat. Kokkoid vagy rövid pálca alakú Gram-negatív aerob, vagy fakultatív anaerob baktérium. Pszichrotróf (0 -45 °C), a fagyasztva tárolást is képes hosszú ideig túlélni, és 4 °C-on is képes a szaporodásra. 22-25 °C-on peritrich csillós, 37 °C-on azonban csillótlan. A környezetben előfordul szabad vizekben, emlősállatok béltraktusában, kecsketejben, sok esetben tejtermékek, fagylaltok és húsok okoznak enterális megbetegedéseket (Bintsis, 2017; Chlebicz és Śliżewska, 2018; Deák et al., 2006).

A *Y. enterocolitica* a harmadik leggyakoribb humán megbetegedést okozó zoonótikus kórokozó az EU-ban (ECDC és EFSA, 2023), állatokból, leggyakrabban sertésekből kerül izolálásra (Aziz és Yelamanchili, 2023). 2019-ben *Y. enterocolitica* O3-ként azonosított kórokozó okozott megbetegedéseket Dániában és Svédországban. A fertőzött élelmiszer friss spenót volt, ami felhívta a figyelmet arra, hogy nemcsak állati eredetű élelmiszerek okozhatnak yersiniosist (Espenhain et al., 2019).

### **3.4 Élelmiszer tartósítás**

Az élelmiszerekben különböző mikrobák vannak jelen, amelyek természetes részei azoknak, adott esetben még technológiai funkcióval is bírnak, mint például a joghurtokban, kolbászokban vagy egyéb fermentált készítményekben. Mindazonáltal nem minden mikroorganizmus jelenléte kívánatos az élelmiszerekben: van, amelyik romlást okoz, és van olyan, amely az elfogyasztását követően, vagy az általa termelt toxin révén megbetegedést idéz elő. Az élelmiszer feldolgozási lánc során számos ponton lehetnek jelen mikrobiológiai veszélyek (Sancho-Madriz, 2003). A jó higiéniai gyakorlatok csökkenthetik a szennyezettség mértékét, de a patogének elpusztítását vagy gátlását a megfelelő nyersanyag kezelés mellett a tartósító eljárások használata biztosíthatja. Számos jól bevált hagyományos tartósító eljárás létezik. Közülük is a legelterjedtebb a hőkezelés, amivel magasfokú mikrobiológiai biztonságot is el lehet érni, de hatására megváltozhat vagy bizonyos esetekben csökkenhet a kezelt élelmiszer minősége. Az élelmiszerek fagyasztása és a hűtve tárolása szintén jelentős tartósító technológia, ami az így kezelt élelmiszerek táplálkozásélettani minőségét kevésbé befolyásolja, azonban a fagyasztás során keletkező jégkristályok az élelmiszer fizikai struktúráját

megváltoztathatják, emellett a hőkezeléshez hasonlóan szintén nagy energiaigényű eljárásról van szó (Amit et al., 2017; Farkas, 2001; Allan-Wojtas et al., 1999).

A fizikai eljárások mellett kémiai tartósítással is növelhető az élelmiszerek eltarthatósága és biztonsága. A kémiai tartósítószer olyan anyagok, amelyek kis mennyiségben kerülnek az élelmiszerekbe, így nem, vagy legfeljebb nagyon kis mértékben változtatják meg annak érzékszervi és fiziko-kémiai tulajdonságait. Csupán néhány engedélyezett felhasználható kémiai tartósítószer létezik, és ezeknek a felhasználási módját is szigorúan szabályozzák (Dauthy, 1995, EFSA, 2023). A fogyasztói elvárások az utóbbi időben azonban a minél kevesebb tartósítószeret tartalmazó termékek elterjedésének kedveznek, ezzel a kémiai tartósítást hátrébb szorítva újabb, természetesebbnek ítélt technológiák bevezetését elősegítve (Mesías et al., 2021; McIntyre et al., 2007).

A folyamatosan változó fogyasztói igények egyre inkább olyan kényelmi élelmiszerek megjelenését szorgalmazzák, amelyek minél magasabb minőségben, minél frissebb, természetesebb és egészségesebb formában elérhetőek. Továbbá az élelmiszerek biztonsága, a hozzájuk kapcsolható megbetegedések elkerülése is egyre jobban teret kap a fogyasztói szempontok között, ezek mind újabb tartósítási eljárások megjelenését teszik szükségessé (Gould, 1995). Emellett a különböző tartósító eljárások kombinálásával is jó minőségű, a fogyasztói igényeknek megfelelő termékeket lehet készíteni (Singh és Shalini, 2016).

Számos olyan élelmiszer van, mint a friss zöldségek és gyümölcsök, minimálisan feldolgozott élelmiszerek, vagy a RTE termékek, ahol a hagyományos tartósító eljárások, mint a hőkezelés, fagyasztás, szárítás, sózás, a termékek jellegéből adódóan nem használhatóak. A kémiai tartósítószer minimalizálása mellett a fogyasztói igények egyre inkább a frissebb, kevésbé feldolgozott élelmiszerek irányába tolódnak, ezzel hatást gyakorolva az élelmiszeripar, azon belül a tartósító eljárások fejlesztési irányaira. Ennek hatására a 20. században megjelentek új tartósító eljárások is, mint az ionizáló sugárzás, a nagy hidrosztatikus nyomású (HHP-high hydrostatic pressure) kezelés, vagy a pulzáló elektromos térerővel (PEF- high voltage electric field pulses) történő tartósítás (Mesías et al., 2021; Farkas, 2001). A fizikai eljárások mellett a biológiai kontroll, mint potenciális tartósítási eljárás is egyre kutatottabbá vált, és napjainkban is egyre szélesebb körű az alkalmazhatóságának feltérképezése.

### 3.5 Biológiai kontroll

A biológiai kontrollt (röviden biokontrollt), mint eljárást az élelmiszer feldolgozás során elsőként növényeknél, kártevők ellen alkalmazták (Gálvez et al., 2010). Mint kíméletes tartósító eljárás, alternatívát jelenthet a friss és egészséges élelmiszerek, a tartósítószer mentes élelmiszerek, valamint a RTE termékek előállításánál, emellett a fentarthatóbb élelmiszeripar koncepciójába is beleillik (Bale et al., 2007).

A biokontroll definíció szerint egy meghatározott szervezet alkalmazása egy másik szervezet populáció sűrűségének csökkentése végett (Bale et al., 2007). Alkalmazása a növényvédelem területén nem újkeletű (Roselló et al., 2013), de az élelmiszereknél is előfordul régmúlta visszatekintő használata, ha a tejsavbaktériumok által fermentációval előállított termékekre gondolunk. A biokontroll tehát olyan kölcsönhatásokon alapszik, amelyek esetén egy szervezet gátolni tudja egy másik szervezet élettevékenységét.

A mikroba populációk a természetben soha nem egyedül, hanem más mikrobák populációjával együtt fordulnak elő, így mindig valamilyen kölcsönhatásban élnek egymással (Deák et al., 2006) (1. táblázat). Ennek köszönhetően a természetben és az élelmiszereken természetesen előforduló mikroorganizmusok jó forrásai lehetnek különböző patogének ellen hatásos mikrobáknak (Oliveira et al., 2015). A mikrobák biokontroll mechanizmusaként megemlíthető kölcsönhatások a vetélkedés, a parazitizmus és az amenzalista interakciók, amelyeknél valamiféle antagonistá hatás lép fel valamely populációval (adott esetben mindkettővel) szemben. Biokontroll organizmusként használhatóak baktériumok, gombák, fonalférgék, rovarok, atkák és vírusok is (Belák, 2014).

A biológiai kontroll a tisztító és fertőtlenítő eljárásoknál is alternatív megoldás lehet (Vandini et al., 2014; Gray et al., 2018), amely az élelmiszerek előállítása során kaphat szerepet.

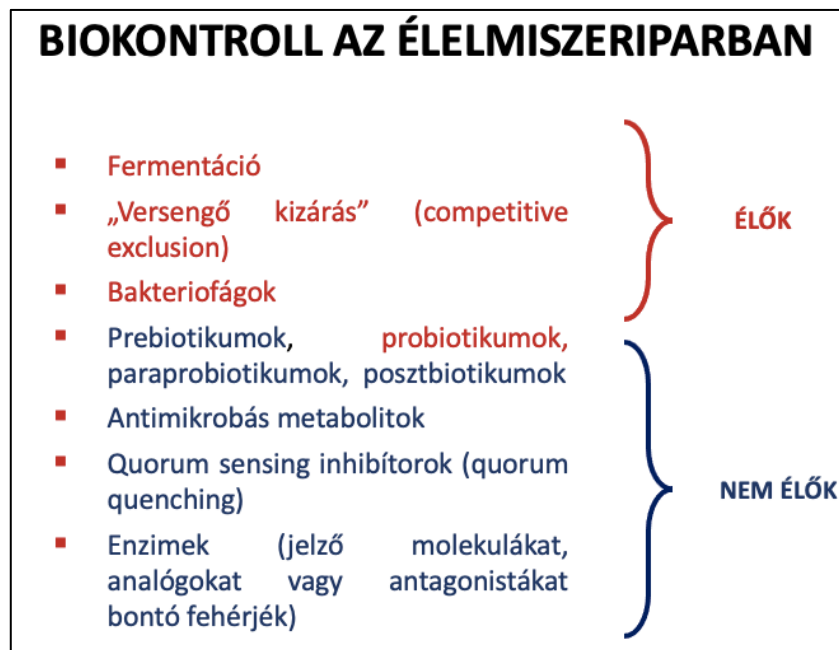
Az élelmiszerek biztonságosabbá tételét szem előtt tartva különböző biokontroll mechanizmusokkal kísérleteznek, mint a bakteriofágok és endolizinek (Bai et al., 2016), mikroorganizmusok közötti versengés, vagy védő kultúrák használata (Hossain et al., 2017; McIntyre et al., 2012)

**1. táblázat:** Mikroorganizmusok közötti kölcsönhatások (Forrás: Deák et al, 2006)

Interakció	1. faj	2. faj	Megjegyzés
Neutrális	0	0	Egyik faj sem hat a másikra; ritka
Kommenzalista	+	0	Egyikre hasznos, másokra közömbös
Mutualizmus	+	+	Kölcsönösen előnyös, nagyon jelentős; laza együttéléstől a szimbiózisig terjed
Vetélkedés	-	-	Mindkét fajra hátrányos, igen gyakori
Parazitizmus	+	-	Egyikre előnyös a másik kárára; gyakori
Amenzalista	-	0	Egyikre hátrányos, de a másokra sem előnyös

Egy Blackburn és mtsai (Blackburn et al., 2016) által publikált cikk alapján a mezőgazdaságban alkalmazott biológiai kontroll módszerek négy csoportba sorolhatók: klasszikus, inundatív, inokulatív és konzerváló. A klasszikus esetben a kártevő természetes ellenségét használják fel egy olyan helyre telepítve, ahol eddig nem volt jelen, hogy a kártékony organizmust visszaszorítsa, azzal a várárással, hogy az odakerült biokontroll organizmus képes lesz az új környezetben hosszútávon fennmaradni. Inundatív esetben a természetes kontroll organizmust nagy mennyiségben a kártevő ellen egyszerre felhasználva, hosszútávú hatás nélkül azonnali kontrollként alkalmazzák; ennek a mechanizmusa hasonlít leginkább a kémiai szerek hatásához. Inokulatív biológiai kontroll esetén a kártevő természetes ellenségét alkalmazzák, a klasszikus és az inundatív alkalmazás köztes verziójaként úgy, hogy valamennyi biokontroll organizmust felhasználva annak időszakos jelenlétét feltételezve, bizonyos intervallumonként megismétlik az eljárást. A konzerváló biológiai kontroll esetében pedig a kártevő környezetében megtalálható természetes ellenségeit igyekeznek óvni, hogy hatásukat minél inkább ki tudják fejteni.

Stenberg és mtsai (Stenberg et al., 2021) az élelmiszeriparban alkalmazható biológiai kontrollt két csoportra osztják: élő (biokontroll szervezetek) és nem élő (természetes alapú vegyületek) biológiai védekezést különítenek el. Biokontroll szervezetek használata során élő szervezeteket – baktériumokat, gombákat, nematódákat, rovarokat, atkákat, illetve vírusokat – alkalmazunk más szervezetek gátlására, míg természetes alapú vegyületek használata során növényi extraktumokat és szemiokemikáliákat lehet alkalmazni (2. ábra).



2. ábra Biokontroll az élelmiszeriparban (Forrás: Belák, 2021)

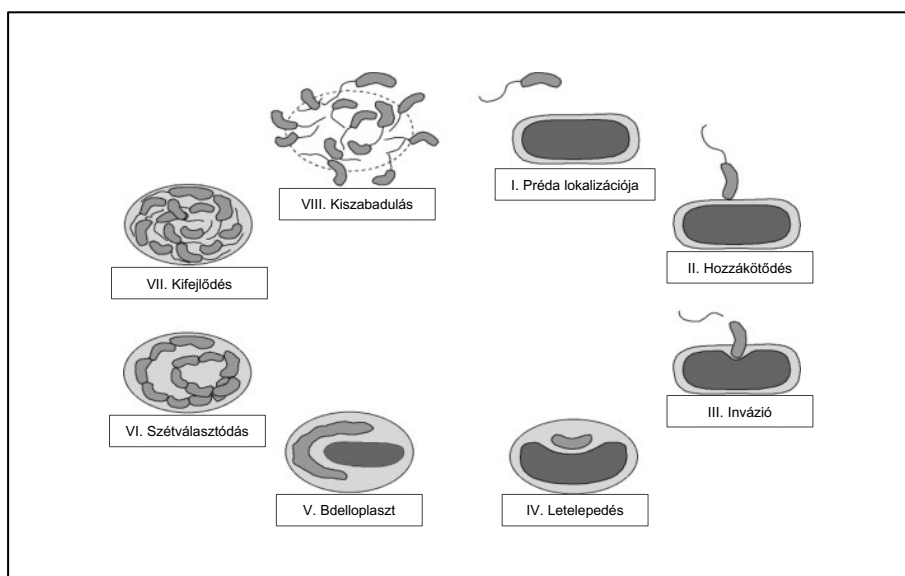
### 3.5.1 Biológiai kontroll mechanizmusok

McIntyre és mtsai (McIntyre et al., 2007) alapján az élelmiszerekben történő biológiai védekezés lehetséges jelöltjei közé tartoznak a bakteriofágok, bakteriocinek, sziderofórok, quorum sensing, organizmusok közötti versengés, valamint különböző mikroba és növényi eredetű antimikrobás szerek.

A baktériumok ellen alkalmazható biológiai kontrollokat az alábbiak szerint lehet csoportosítani (Belák, 2014; Faust és Raes, 2012; Weiland-Bräuer, 2021):

- **bakteriofágok:** olyan vírusok, amelyek csak baktériumok fertőzésére képesek. Az élelmiszerekben való felhasználásra szánt fágoknak erősen lítikusnak kell lenniük (Kazi és Annapure, 2016). Alkalmazásuk széleskörűen és szigorúan szabályozott: széles gazdaspektrummal kell rendelkezniük, kellően virulensek legyenek, felszaporításuk nem patogén gazdaszervezetben történjen, teljes genomszekvenciájuk ismeret legyen, képtelenek legyenek a nem-víruseredetű bakteriális DNS-t transzformálni, ne tartalmazzanak patogénitást vagy potenciálisan allergén fehérjéket kódoló géneket, GRAS státusszal rendelkezzenek, legyenek stabilan és nagy mennyiségben előállíthatók és tárolhatók.

- **parazita baktériumok:** itt a Gram-negatív *Bdellovibrio* nemzetség tagjait érdemes megemlíteni, amik más Gram-negatív baktériumokon folytatnak ragadozó életmódot. Számos növény- és humánpatogén baktérium ragadozója (pl: *E. coli*, *Salmonella*), de az emberre nézve nem patogén (Shimkets, 2015; Bratanis et al., 2020) (3. ábra).



3. ábra. A *Bdellovibrio bacteriovorus* parazita életmódot folytató baktérium életciklusa  
(Forrás: Shimkets, 2015)

- **védőkultúrák használata:** elsősorban a tejsavbaktériumok és *Bifidobacterium* törzsek alkalmazását jelenti. Nem számít új eljárásnak, ha a fermentálás hagyományára gondolunk. Használatukkor az eltarthatóság növelése mellett fontos szempont az íz kialakítása is. A védőkultúrákkal szemben támasztott követelmények az alábbiak: ne legyen egészségügyi kockázatuk, ne termeljenek toxint, legyenek mentesek az emberi egészségére káros biogén aminosavaktól és egyéb metabolitoktól, ne legyenek patogének, pozitív hatással legyenek a termékre, adaptálódjanak a termékhez/szubsztráthoz, védő funkcióval rendelkezzenek, adott paraméterek közötti metabolikus aktivitással rendelkezzenek (tejsav termelés gáztermelés nélkül), versenyképesség az eredeti mikrobiótával, specifikus enzimaktivitás (húsonál: nitrát redukáz, kataláz), ne legyenek negatív (érzékszervi) hatással a termékre GMP körülmények között (nincs sav-, gáz-, nyálkatermelés), rossz körülmények között indikátorként funkcionáljanak (Fischer és Titgemeyer, 2023).
- **antimikrobás metabolitok:** lehetnek szerves savak, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kismolekulájú metabolitok (reuterin, diacetil, zsírsavak), vagy akár siderofórok is (Braga et al., 2016).

- **quorum sensing:** a baktériumok kommunikációja különböző élő szervezetekkel. Sejtjelzés, ami kis jelzőmolekulák detektálása által irányítja a baktériumok összehangolt viselkedését. Ilyenek lehetnek a felülethez tapadás, biofilm képzés, virulencia faktorok kifejeződése vagy a másodlagos anyagcseretermékek előállítása (Braga et al., 2016; Farkas és Mohácsiné Farkas, 2014).
- **versengés:** történhet tápanyagokért vagy specifikus kötőhelyekért, jelentheti különböző gátlóanyagok termelését vagy az immunrendszer stimulálását is (Belák, 2014, Weiland-Bräuer, 2021).

### 3.5.2 Biokontroll az élelmiszeriparban

Az évezred elején még nem voltak széleskörűen elterjedtek az olyan -élelmiszer eredetű patogén mikroorganizmusok ellen biokontrollként használható- módszerek, mint az antagonista baktériumok és versengés (Farkas, 2001). Ennek egyik oka lehet, hogy nehézkes a biokontroll ágensek olyan terméké alakítása, amelyek a piacon is megállják a helyüket. Ha nem sikerül megvalósítani a folyamatos és egyenletes minőséget nem túl drága előállítási költségek mellett, a nagyobb volumenű előállítás nem valósul meg. Ezen okokból korábban sokszor már a kutatási szakaszban megrekedtek ezek a kezdeményezések (Cook, 1993). Azonban egyre több publikáció jelent meg a témában annak köszönhetően, hogy a biokontrollt potenciális tartósító eljárásnak tekintették, ami még inkább alkalmazható lehet egyéb eljárásokkal kombinálva, mint a hűtés vagy a fagyasztás (Farkas, 2001). A kutatásoktól pedig eljutott a különböző biokontroll mechanizmusokon alapuló termékek fejlesztése odáig, hogy napjainkban már az iparban is alkalmazható termékek kaphatóak a piacon, amelyekről a továbbiakban részletesebben is szó lesz.

A természetes antimikrobiális anyagok, mint például a bakteriocinek alkalmazása új technológiákkal kombinálva újabb lehetőségeket kínál a patogén baktériumok elleni küzdelemben, javítva az élelmiszer-biztonságot és -minőséget (Gálvez et al., 2010). A különböző biokontroll mechanizmusok felhasználása gát technológia részeként hatékony tartósító eljárás lehet. Fizikai tartósító eljárásokkal együtt alkalmazva kíméletes tartósító módszerként minimálisan befolyásolja a kezelt élelmiszer beltartalmi jellemzőit és érzékszervi tulajdonságait (Abdelhamid és El-DougDoug, 2020).

Akár felületek fertőtlenítésére is használhatóak lehetnek különböző biokontroll mechanizmusok (Kazi és Annapure, 2016). Az antagonista mikroorganizmusok által termelt



extracelluláris metabolitok biofertőtlenítőként használhatók az élelmiszer-feldolgozó üzemekben, ezáltal csökkentve az elfogyasztott élelmiszerek mikrobiális kockázatát. Erre példa egy három tejsavbaktérium törzset (két *Carnobacterium maltaromaticum*, és egy *Enterococcus mundtii*) és nízint tartalmazó felületfertőtlenítő, amit Twele és munkatársai (Twele et al., 2010) szabadalmaztattak és *L. monocytogenes* elleni védekezésre javasolnak.

Számos bakteriofággal végzett kutatás eredménye alapján elmondható, hogy a bakteriofágok alkalmazása akár humán megbetegedések esetén is opció lehet. Ezeken felül élelmiszeripari alkalmazásuk is jelentős teret kaphat. Az Amerikai Egyesült Államokban több FDA által jóváhagyott fág készítményt is nyilvántartanak, amelyeket különböző élelmiszer eredetű patogén baktériumok ellen lehet alkalmazni. Ilyenek a *L. monocytogenes* ellen hatékony ListShield™ (Intralytix, Inc., Baltimore, Maryland, USA) vagy a Listex P100 (Microcos Food Safety, Wageningen, The Netherlands), az *E. coli* O157:H7 ellen hatásos EcoShield™ (Intralytix, Inc., Baltimore, Maryland, USA), vagy a *Salmonella* ellen használható SalmoFresh (Intralytix) (Bai et al., 2016). Sok kutatás foglalkozik a bakteriofágok élelmiszeripari hasznosíthatóságával (Garvey, 2022). Európában is folynak ilyen irányú termékfejlesztések (például az előbb említett Listex 100), azonban az EU-ban szabályozás hiányában egyelőre nem használható semmilyen fág készítmény.

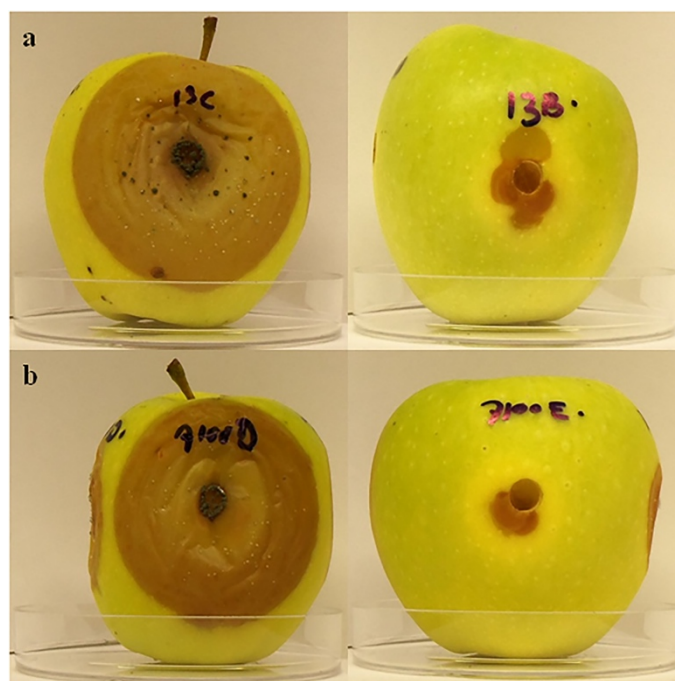
Megtalálhatóak a piacon egyéb, kereskedelmi forgalomban már egy ideje jelenlévő biokontroll hatásmechanizmusú termékek, mint például a DuPont Nutrition & Biosciences által forgalmazott HOLDBAC termékcsalád, amelynek különböző tagjai húsok, húskészítmények, tejtermékek és fermentált növényi alapú termékek esetében kínálnak különböző mikroorganizmusok ellen hatékony védőkultúrákat. Termékeik között vannak élesztők és penészek ellen, *L. monocytogenes* ellen, vagy akár heterofermentatív laktobacillusok ellen alkalmazható kultúrák is (Holdbac, 2023).

### 3.5.2.1 Biokontroll használata zöldségek és gyümölcsök esetében

Szakirodalmi források alapján a legtöbb alkalmazási lehetőség, kutatás a zöldség-gyümölcs termékcsoporthban történik a biokontroll alkalmazhatóságával kapcsolatban (Janisiewicz et al., 1999; Alegre et al., 2012; Leverentz et al., 2006; Trias et al., 2008; Alegre et al., 2013; Roselló et al., 2013; Dukare et al., 2019) köszönhetően többek között a betakarítás utáni veszteségek minimalizálására való törekvésnek és a természetesebb tartósítási eljárások iránti igényeknek (Droby et al., 2016; Mesías et al., 2021).

A gyümölcsöket általánosságban élelmiszerbiztonsági szempontból nem tartják kockázatosnak kis pH értékük és savasságuk miatt. Azonban alma- és narancslé által okozott *E. coli* O157:H7 és *Salmonella* spp. járványok ennek ellentmondva rávilágítottak arra, hogy ezek a termékek is lehetnek patogén mikroorganizmusok forrásai. Ezt laboratóriumi körülmények között vizsgálva igazolták is, ahol az alma és narancslé pH-jával egyező, bogyós gyümölcsből készített gyümölcslében és pürében is képes volt az *E. coli* O157:H7 és *Salmonella* spp. a túlélésre. Így fontos szem előtt tartani, hogy akár a szennyezett vízzel való öntözés, akár a nem megfelelő trágyázási gyakorlat, de még a feldolgozás is olyan lépés lehet, amelyek során patogén baktériumok kerülhetnek a gyümölcsre, és ha azok a fogyasztásig életképes maradnak, akkor megbetegedést okozhatnak (Zhao, 2005).

A gyümölcsök betakarítás utáni gombás megbetegedései jelentős gazdasági veszteséget jelentenek, emellett az egyes gombák által termelt mikotoxinok egészségügyi kockázattal is bírnak, akár közvetlenül elfogyasztva a gyümölcsöt, akár a belőlük feldolgozva készült élelmiszerek által. Leggyakrabban szintetikus kémiai fungicideket használnak ilyenkor, de a fogyasztók természetesebb élelmiszerek iránti igénye miatt a biokontroll használata is előtérbe került (Sui et al., 2016). A kutatások ezért ebben az irányban széleskörűek, és gyakran különböző élesztők azok, amik a betakarítás utáni veszteség csökkentésében a segítségünkre lehetnek, biokontroll organizmusként használva őket (4. ábra) (Nadai et al., 2018). A frissen fogyasztott, vagy minimálisan feldolgozott fogyasztásra kész zöldségek és gyümölcsök esetében a patogén baktériumok biofilm képzésének megakadályozására is használhatóak biokontroll módszerek, mint a bakteriofágok, különböző mikroorganizmusok anyagcseretermékei, enzimeik, bakteriocinek vagy tejsavbaktériumok. A biokontrollt valamilyen tartósító eljárással, mint például egy fizikai módszerrel kombinálva a zöldség- és gyümölcstermékek hosszabb ideig biztonságosan eltarthatóak maradnak az érzékszervi tulajdonságaik megváltozása nélkül (Mendoza et al., 2022).



4. **ábra.** *Starmarella bacillaris* sejtek által visszaszorított *Penicillium expansum* növekedés Golden Delicious almákon 25 °C -on 7 napos inkubációt követően (kontroll balra) (Forrás: Nadai et al., 2018.)

### 3.5.2.2 Biokontroll használata húsonnál és húskészítményeknél

Biológiai kontroll alkalmazása során sokszor csak a biokontroll mikrobák gátló hatású metabolitjait használják fel a kívánt hatás eléréséhez. Különböző, GRAS státusszal rendelkező tejsavbaktériumok anyagcseretermékeit gyakran vizsgálják ilyen célokból. Húsok és hústermékek esetében a csomagolóanyagoknál alkalmazott *Lactobacillus*-ok által termelt bakteriocinek ígéretesek, mivel képesek a RTE és feldolgozott termékekben gyakran előforduló *L. monocytogenes* szaporodásának visszaszorítására (Castellano et al., 2017; Martín et al., 2022).

A RTE termékek mellett a különböző fermentált húskészítmények, kolbászok esetében is találunk példát a biokontroll alkalmazására. Akár bakteriocinokkal, akár védőkultúrák alkalmazásával olyan termékek állíthatók elő, amelyek biztonságosak, és kevesebb tartósítószer tartalmaznak a mai napig erősödő fogyasztói igényeknek megfelelően (Oliveira et al., 2018). A fermentált és szárított hústermékeknel gyakran előforduló *Penicillium nordicum* által termel ochratoxin A szennyezettség csökkentésére is eredményesnek bizonyultak különböző biokontroll törzsek. Simoncini és munkatársai (Simoncini et al., 2014) szárítva

pácolt sonkák esetében sikeresen alkalmaztak *Debaryomyces hansenii* élesztőt a *P. nordicum* szennyezettség csökkentésére, még Cebrián és munkatársai (Cebrián et al., 2022) fermentált száraz kolbászok esetében kaptak hasonló eredményeket *D. hansenii* egyedüli és *Staphylococcus xylosum*-szal együtt történő alkalmazásakor.

A bakteriofágok potenciális alkalmazhatóságát élő állatokkal végzett kísérletek során is igazolták. Ezzel az antibiotikumok használata csökkenthető, így a multirezisztens baktériumok számának növekedése is mérsékelhető. Több kutatás során sikeresen szorította vissza fág koktélok alkalmazása olyan zoonózist okozó patogének szaporodását élő állatok között, mint a *Salmonella*, az *E. coli* vagy a *Campylobacter*. Emellett felületfertőtlenítésre is bizonyítottan hatékonyak, amelynek előnye az állatok feldolgozása során kerülhet előtérbe (Atterbury, 2009).

### 3.5.2.3 Tejtermékek

Különböző tejtermékek esetében a védőkultúrák biológiai kontrollként való használata a történelem előtti időkre nyúlik vissza (Hammami et al., 2019). A starterkultúráként használt tejsavbaktériumok által kialakított pozitív érzékszervi tulajdonságok mellett az általuk fermentált tejtermékek mikrobiológiailag is biztonságosak, az elszaporodott tejsavbaktériumok anyagcsere termékeinek köszönhetően általában nincs szükség egyéb tartósítási módra. Ilyen anyagcsere-termékek lehetnek a bakteriocinek, mint például a nizin (Medina és Nuñez, 2011), vagy egyéb peptidek és fenolos komponensek, amik egymás hatását erősítve képesek a gombák okozta romlást megakadályozni (Varsha és Nampoothiri, 2016). Ezeken kívül a nem starterkultúráként használt tejsavbaktériumok között is találhatóak biokontroll tulajdonsággal bíró bakteriocin termelő mikroorganizmusok, mint például az enterocint termelő *Enterococcus*-ok (Giraffa, 2003). A tejsavbaktériumok anyagcsere-termékei mellett különböző bakteriofágok is szóba jöhetnek, ha tejtermékek tartósításáról van szó, szem előtt tartva, hogy az élelmiszer struktúrája képes befolyásolni ezek hatékonyságát (García-Anaya et al., 2020).

### 3.5.3 Biokontroll mikroorganizmusok

Élőhelytől, és a környezeti tényezőktől függően különböző mikroorganizmusok találhatóak meg a környezetünkben, amelyek képesek egyéb körülöttük jelenlévő mikroorganizmusok élettevékenységét befolyásolni.

A biokontroll a növényvédelem területén is használt módszer, itt a biokontroll mikroorganizmusok közül az élesztőgombák és penészgombák azok, amelyek a leggyakrabban előfordulnak. A penészgombák közül a *Trichoderma* alapú készítmények terjedtek el, melyek mikroparazitizmus, antibiózis és versengés útján hatékony biokontroll termékek (Thambugala et al., 2020; Yao et al., 2023). Az élesztőgombák hatékonyságát bár számos kutatás igazolja különböző növénypatogének ellen, a piacra csak néhány termék kerül ki. Biokontroll tulajdonságaikért többféle hatásmechanizmus felelős. Ilyenek például a biokontroll élesztők által kiválasztott illékony szerves vegyületek, vagy bizonyos enzimek, mint például a kitináz, amely alkalmas a kártevő gombák sejtfalának károsítására. Emellett versengés, toxinok kiválasztása vagy rezisztencia indukció útján is képesek biokontroll hatást elérni (Freimoser et al., 2019).

Az élelmiszertartósítás területén a bakteriofágok is potenciális biokontroll mikroorganizmusokként vannak számontartva. Számos kutatás foglalkozik az alkalmazhatóságukkal, és bár Európában a használatuk szabályozás hiányában nem lehetséges, az FDA több fág készítményt is engedélyezett élelmiszeripari felhasználás céljából. A bakteriofágok alkalmasak lehetnek az élelmiszerek kezelésére, felületek fertőtlenítésére és az élőállatok között előforduló megbetegedések csökkentésére is (Gildea et al., 2022).

#### 3.5.4 Biokontroll baktériumok

Akár Gram-pozitív, akár Gram-negatív baktériumokról van szó, találunk közöttük olyanokat, amelyek anyagcseretermékeikkel képesek visszaszorítani különböző patogén baktériumok vagy más kórokozók szaporodását.

Bár összességében a Gram-pozitív baktériumok talán kevésbé állnak az ilyen irányú kutatások középpontjában, több tanulmány is foglalkozik a *Streptomyces* és *Bacillus* fajok potenciális alkalmazhatóságával, leginkább növénypatogének ellen (Asaka és Shoda, 1996; Emmert és Handelsman, 1999; Law et al., 2017; Nagórska et al., 2007). Erre példa, hogy a kilencvenes évek végén egy *Bacillus subtilis* törzset Kodiak néven növényvédőszerként mutattak be, mert igen hatásosnak bizonyult a patogén *Fusarium* és *Rhizoctonia* ellen (Emmert és Handelsman, 1999). A már korábban említett tejsavbaktériumok is számos esetben bizonyultak potenciális biokontroll mikroorganizmusoknak (Gálvez et al., 2010; Castellano et al., 2017).

Gram-negatív biokontroll baktériumokra is találhatunk példákat a szakirodalomban. Egyes, almáról izolált Enterobacteriaceae fajok képesek voltak kontrollálni az *E. coli* O157:H7,

*Salmonella* és *L. innocua* szaporodását minimálisan feldolgozott (MPR) almán és barackon vizsgálva (Alegre et al., 2012). Leverentz és mtsai 2006-ban olyan mikroorganizmusokat izoláltak almáról, köztük például a *Gluconobacter asaii* egy törzsét, amelyek gátló hatást mutattak *L. monocytogenes* és *Salmonella* Poona ellen.

### 3.5.4.1 *Pseudomonas* nemzetség

A *Pseudomonas* nemzetségen belül több biokontroll tulajdonsággal rendelkező fajt is találhatunk. Ezek leggyakrabban talajból vagy élelmiszerekből kerültek izolálásra (Alegre et al., 2013; Haas és Défago, 2005; Weller, 2007). Számos kutatásban bizonyultak hatásosnak élelmiszereken alkalmazott biokontrollként különböző élelmiszer eredetű patogén baktériumok ellen élelmiszerből izolált *Pseudomonas*-ok. 1995-ben Cheng és munkatársai darált sertés- és csirkehúsból izoláltak három *P. fluorescens* törzset, amelyek képesek voltak antagonistá hatást kifejteni mind Gram-pozitív (*L. monocytogenes* és *S. aureus*), mind Gram-negatív (*S. enteritidis*, *E. coli* 0157:H7, *Y. enterocolitica* és *C. jejuni*) baktériumok ellen. Belák és Maráz (2015) antiliszteriális hatást mutattak ki élelmiszerből izolált *Pseudomonas* sp.CMI-1 törzsnél, míg Algere és mtsai (2013) egy *P. graminis* törzset alkalmaztak sikeresen *Salmonella* és *L. monocytogenes* biokontrolljára MP alma felületén. Egy, az MP zöldségek és gyümölcsök biokontrollal történő biztonságossá tételét vizsgáló tanulmányban (Siroli et al., 2015) további *Pseudomonas* törzseket is említene, melyeket korábbi vizsgálatok során alkalmasnak találtak különböző minimálisan feldolgozott élelmiszerek biztonságosabbá tételére (2. táblázat).

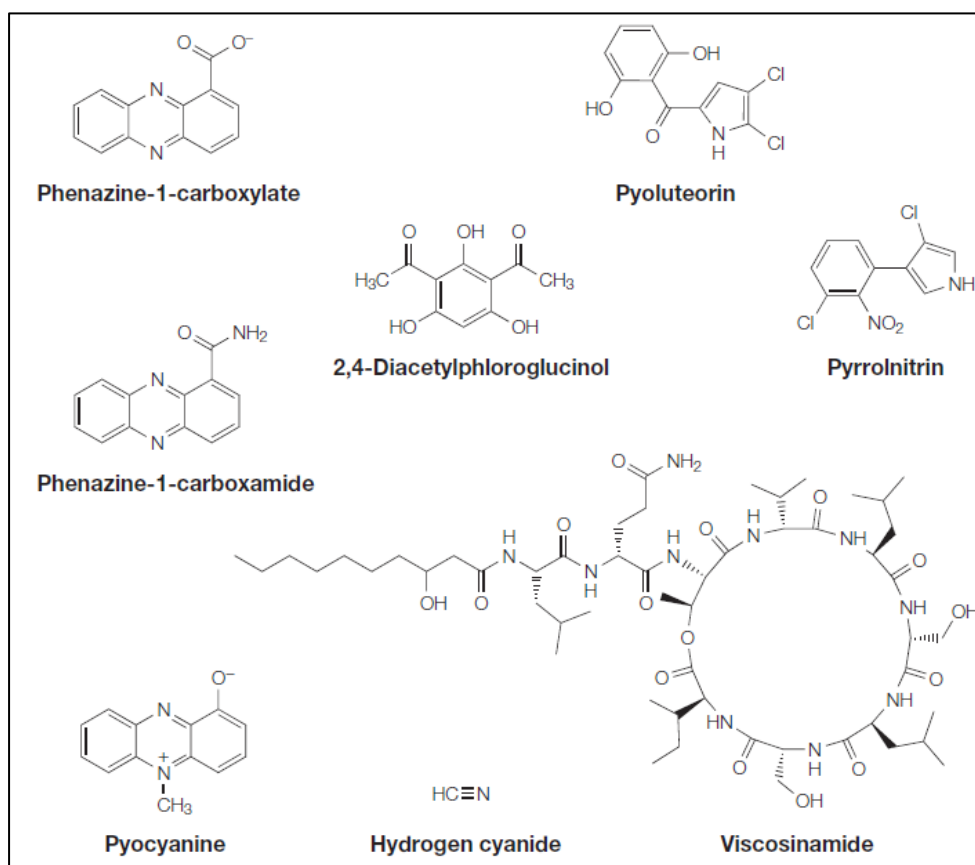
## 2. táblázat Élelmiszer eredetű patogének ellen biokontroll hatást mutató további *Pseudomonas* törzsek MP termékekben (Siroli et al. 2015 nyomán)

Biokontroll <i>Pseudomonas</i> faj	Patogén, amelyre hatással volt	Élelmiszer	Forrás
<i>P. fluorescens</i>	<i>L. monocytogenes</i>	endívia levelek	Carlin és mtsai (1996)
<i>P. fluorescens</i>	<i>L. monocytogenes</i>	modell	Buchanan és Bagi (1999)
<i>P. fluorescens</i> és <i>P. viridiflava</i>	<i>L. monocytogenes</i>	burgonyagumó szeletek	Liao és Sapers (1999)
<i>P. fluorescens</i>	<i>Penicillium expansum</i>	alma	Mostafavi és mtsai (2013)
<i>P. syringae</i>	<i>E. coli</i>	alma	Janisiewicz és mtsai (1999)

Ahogy a fent bemutatott korábbi eredményekből is látszik, a nemzetségen belül leginkább a fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkező fajok azok, amelyek az élelmiszer eredetű patogénekkal szemben leginkább képesek hatást kifejteni (Belák és Maráz, 2015; Siroli et al., 2015).

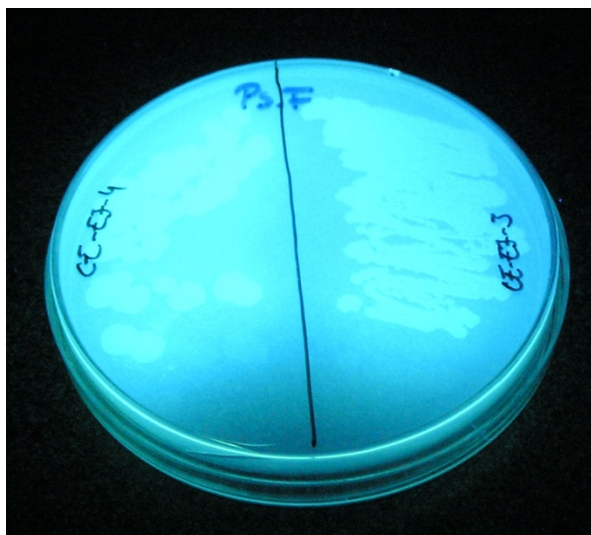
### 3.5.4.2 A *Pseudomonas*-ok által termelt antimikrobiális anyagok

A fluoreszcens *Pseudomonas* fajok számos olyan vegyületet termelhetnek, amelyek felelősek lehetnek biokontroll tulajdonságaikért, gombaellenes, antibakteriális, antivirális, tumorellenes vagy nematóda ellenes hatást kifejtve általuk. Ilyenek lehetnek különböző másodlagos anyagcseretermékek (9. ábra), mint a phenazinek (PHZ), a 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), a pyoluteorin (PLT), pioverdin, pyrrolitín (PRN), ciklikus lipopeptidek (CLP), indolacetát, valamint egyéb illékony szerves vegyületek (VOC), mint a hidrogén-cianid (HCN) (Haas et al., 1991; Haas és Keel, 2003; Mishra és Arora, 2018).



5. ábra. Fluoreszcens *Pseudomonas*-ok által termelt antibiotikumok (Forrás: Haas és Défago, 2005)

Ezek közül a pioverdin, más nevén pseudobactin sziderofórként van jelen a fluoreszcens *Pseudomonas* fajoknál, ez okozza a sárgás-zöldes fluoreszkálását (6. ábra) ezeknek a baktériumoknak. A sziderofórok kis molekulatömegű kelátképzők, általában 6-12 aminosavból álló peptidek. A sziderofórok biokontrollként való működése a vas transzport során betöltött szerepükkel magyarázható, feltételezhetően elvonják a patogénektől a vasat, a rezet, illetve a cinket, ezáltal gátolják azok növekedését, míg a termelő törzsnél elősegítik a vas transzportját (Bonneau et al., 2020).



6. **Ábra.** Fluoreszkáló pseudomonaszok UV fény alatt (saját kép)

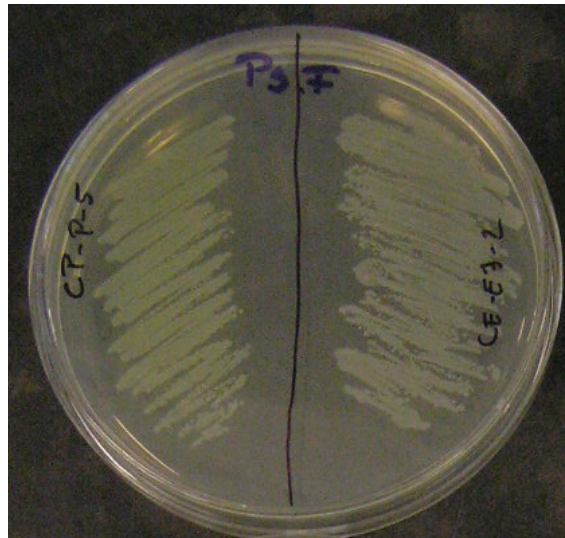
#### 3.5.4.3 *Pseudomonas lundensis*

A *P. lundensis* leggyakrabban az élelmiszerek aerob tárolása során bekövetkezett romlásáért tehető felelőssé. Előfordul nyers tejben, húsbán, általában a környezetből, levegőből, vízből kerül az élelmiszer felületére. Pszichrotrof baktérium, amely gyakran jelentős proteolitikus aktivitással bír, emellett képes biofilmképzésre is (Lianou et al., 2016; Techer et al., 2014; Zagorec és Champomier-Vergès, 2017).

Molin és munkatársai (1986) írták le, mint új baktérium fajt, amit húsból izoláltak. Munkájuk nyomán az alábbiakkal jellemezhetőek a *P. lundensis* fajhoz tartozó törzsek: pálca alakú nem spóráképző Gram-negatív baktériumok, amelyek a fluoreszcens pseudomonaszok közé tartoznak (7. Ábra). Hőmérsékleti optimumuk 25 °C, legtöbb törzsük képes azonban növekedni 0-30 °C között is. Hatvan izolátum vizsgálatának eredménye alapján viszont közel



egyharmaduk 37 °C-on is képez telepeket. Kemoorganotróf anyagcserét folytató, nem fermentáló baktériumok.



7. **Ábra.** *P. lundensis* izolátumok által képzett telepek Pseudomonas F agaron, jól látható zöldes fluoreszcens pigmentképzéssel (saját kép)

#### 3.5.4.4 *Serratia marcescens*

A *S. marcescens* egy, az Enterobacteriaceae családba tartozó Gram-negatív opportunistá patogén baktérium, amely a kórházi fertőzések egyik gyakori okozója. Környezeti izolátumainak nagy része képes a prodigioszin nevű piros pigment termelésére szobahőmérsékleten (Buckle, 2015; Khanna et al., 2013; Nelson és Greene, 2020) A különböző tápanyagok széleskörű felhasználásával képes a fertőtlenítőszernek és bizonyos antibiotikumoknak is ellenállni, ami fertőzések esetében nehezíti a kezelését. Ez a rezisztens tulajdonság a nem-pigment termelő fajaira jellemzőbb (Cooney et al., 2014; Yang et al., 2012).

A nem-klinikai eredetű *S. marcescens* izolátumok között több biokontroll tulajdonsággal rendelkező törzs is található, amelyek akár patogén baktériumok, akár egyéb kártevők ellen is hatékonyak lehetnek (Fu et al., 2021). Bizonyos törzsei növénypatogén fonalgombák ellen bizonyultak hatékonyak (Ordentlich et al., 1987; Parani et al., 2011; Purkayastha et al., 2018) míg másokat fonalférgek biokontrolljaként találtak hatásosnak (Mohamed et al., 2009).

A *S. marcescens*-t vizsgáló tanulmányok az alábbi antimikrobiális hatásokat figyelték meg a baktérium által:

- antibiózis pirrolnitrin és prodigiozin termelése által (Li et al., 2015; Purkayastha et al., 2018),
- hidrolitikus enzimaktivitás (Chet et al., 1990; Parani et al., 2011; Purkayastha et al., 2018),
- sziderofór termelés (Purkayastha et al., 2018),
- IV típusú fehérje szekréciós rendszer (Murdoch et al., 2011; Li et al., 2015).

A pirrolnitrin egy gombaellenes vegyület (Gordee és Matthews, 1969), amit számos baktérium képes termelni. A különböző *Serratia* fajok több tagján kívül bizonyos *Pseudomonas* fajok, ezek mellett a *Burkholderia cepacia*, *Myxococcus fulvus*, *Coralloccoccus exiguous*, *Cystobacter ferrugineus*, valamint az *Enterobacter agglomerans* baktériumok bizonyos törzsei is termelnek pirrolnitrint (van Pée, 2012). Gombaellenes hatása mellett *Streptomyces* és számos fitopatogén baktérium ellen is hatékony lehet (Chernin et al., 1996; El-Banna és Winkelmann, 1998).

A prodigiozin a prodiginin családba tartozó vörösen pigmentált tripirrol, egy, a *S. marcescens* faj számos törzse által termelt másodlagos anyagcseretermék antibiotikus hatással (Bennett és Bentley, 2000; Fineran et al., 2005; Hu et al., 2016). A *S. marcescens* törzseken kívül más Gram-negatív baktériumok is képesek ennek a vörös pigmentnek a termelésére, mint a *Hahella chejuensis* és *Pseudoalteromonas denitrificans*, de az aktinomicétáknál is található olyan faj, amely termeli, mint pl. a *Streptomyces coelicolor* (Williamson et al., 2006). A *S. marcescens*-ek közül a klinikai izolátumokra nem jellemző a pigmenttermelés, még környezeti izolátumaik között gyakran találhatóak vörös színű telepeket képző törzsek (Roy et al., 2014) (8. ábra).



**8. ábra.** *S. marcescens* izolátum telepei WL és CASO agar felületén látható prodigiozin pigmenttermeléssel (saját kép)

A *S. marcescens* által termelt különböző hidrolitikus enzimek is részt vehetnek az antimikrobás hatás kialakításában. Ilyen enzimek a proteáz, a lipáz és a kitináz (Purkayastha et al., 2018), utóbbit a *S. marcescens* exokitináz és endokitináz formájában is képes termelni (Brurberg et al., 2001), és különösen hatékony a patogén és mikotoxin termelő gombák ellen (Ordentlich et al., 1988; Wang et al., 2014). Ezen enzimek mellett a *S. marcescens* biokontroll tulajdonságáért a sziderofórok (katekolát és hidroxamát) termelése is felelőssé tehető (Purkayastha és mtsai, 2018).

A *S. marcescens* másik gátló mechanizmusa a IV típusú fehérje szekréciós rendszer, ami Murdoch és mtsai (2011) megfigyelései alapján nagy szerepet játszik a *S. marcescens* versenyképességében az *E. coli*, az *Enterobacter cloacae* és a *P. fluorescens* baktériumokkal szemben.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1 Felhasznált anyagok

#### 4.1.1 Alkalmazott tápközegek

##### **Előre gyártott tápközegek**

- CASO lemezek (Merck KGaA, Darmstadt, GER)
- Contact slide TSA agarral (Merck KGaA, Darmstadt, GER)
- Mintavevő tampon TSB-ben (Merck KGaA, Darmstadt, GER)

##### **További tápagarok**

#### TSA lemez petricsészében és ferde agarként

TSB leves (Biokar, Pantin, FR)	30 g/l
Agar	15 g/l

#### WL (Wallerstein Laboratory) Nutrient agarlemez

Élesztőkivonat	4 g/l
Pepton	5 g/l
Glükóz	50 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,55 g/l
KCl	0,425 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,125 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,125 g/l
FeCl <sub>3</sub>	0,0025g/l
MnSO <sub>4</sub>	0,0025 g/l
Brómkrezol zöld	0,022 g/l
Agar	15 g/l

#### CAS agarlemez:

Kings B agar (Merck KGaA, Darmstadt, GER)	900 ml
kromazurol-S festék	0,0605 g/l
vas(III)-oldat (1 mM FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O és 10 mM HCl)	10 ml

HDTMA (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

0,0729 g/l

Cetrimid agarlemez

Cetrimid	0,3 g/l
Pepton	20 g/l
Magnézium klorid	1,4 g/l
Kálium szulfát	10 g/l
Agar	15 g/l

Nutrient agarlemez

Pepton	10 g/l
Húskivonat	8 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	22 g/l

Tejporos TGE agar

Pepton	5 g/l
Glükóz	1 g/l
Élesztőkivonat	2,5 g/l
Sovány tejpor	10 g/l
Agar	15 g/l

Pseudomonas F szelektív agar (Merck KGaA, Darmstadt, GER)

Harlequin™ agar (Lab M Limited, Heywood, Greater Manchester, UK)

BCM agar

Tripton	10 g/l
Élesztőkivonat	5 g/l
NaCl	10 g/l
$\alpha$ -kitin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	2,5 g/l
Agar	15 g/l
rákhéj-porból, illetve pelletből (Sigma-Aldrich, C7170, C9213)	

## Tápoldatok

### TSB (Biokar, Szeged, HU)

#### TGE leves

Pepton	5 g/l
Glükóz	10 g/l
Élesztőkivonat	2,5 g/l

#### Müller-Hinton tápleves

Kazein	17,5 g/l
Keményítő	1,5 g/l
Húskivonat	2 g/l

#### Minimál tápleves

Ammónium-szulfát	5 g/l
Kálium-dihidrogén-foszfát	1 g/l
Magnézium-szulfát,	0,5 g/l
Glükóz	10 g/l
Wickerham vitamin oldat (sterilezés után hozzáadva)	3 ml

#### Ásványi 0: folyékony ásványi tápközeg

NaCl	3 g/l
Élesztőkivonat	0,5 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 g/l
Szacharóz	50 g/l

#### Ásványi 1: folyékony ásványi tápközeg fruktóz szénforrással

NaCl	3 g/l
Élesztőkivonat	0,5 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 g/l
Fruktóz	10 g/l

## Ásványi 2: módosított ásványi tápközeg

NaCl	3 g/l
Élesztőkivonat	0,5 g/l
Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	6 g/l
KH <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub>	2,4 g/l
NH <sub>4</sub> ·Cl	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
Fruktóz	10 g/l

### 4.1.2 Egyéb felhasznált vegyületek és anyagok

- KOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kataláz reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- oxidáz reagens: N,N,N',N'-tetrametil-p-feniléndiamin-dihidroklor reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Wickerham vitamin oldat

Folsav	0,002 g/l
Biotin	0,002 g/l
Ca-pantotenát	0,4 g/l
Inozit	2 g/l
Nikotinsav	0,4 g/l
p-amino-benzoészav	0,2 mg/l
Piridoxin HCl	0,4 mg/l
Tiamin HCl	0,4 mg/l
Riboflavin	0,2 mg/l

- 10x Tris-Bórsav-EDTA (TBE) puffer [pH 8]:

Tris base	108 g/l
Bórsav	55 g/l
Na <sub>2</sub> -EDTA (0,5 M)	40 ml

- Etídium-bromid törzsoldat:

Etídium-bromid (Carl Roth GmbH + Co., GER) 10 mg/ml

Oldószer - 96%-os etanol és desztillált víz 1:1 arányú keveréke

- pufferek pH beállításához Ruzin (1999) leírása alapján:

- o foszfát-citrát puffer (3. táblázat):

**3. táblázat** Különböző pH-jú agarlemezekhez használt foszfát-citrát puffer arányok

pH	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	0,1 M citrát (ml)
3	10,2	39,8
4	19,3	30,7
5	25,7	24,3
6	32,1	17,9
7	43,6	6,5

- o Sorensen féle foszfát puffer (pH8):

- 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,3 ml
- 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 94,7 ml
- desztillált víz 100 ml

- o glicin-NaOH puffer (pH9):

- 0,2M NaOH 4,4 ml
- glicin 25 ml
- desztillált víz 70,6 ml

- API 20 NE and API 20 E kitek (bioMérieux, FR)
- BBL Crystal teszt (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- celofán (Hewa, Sarantis Magyarország Kft., Budaörs, HU)
- proteináz K (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- proteáz *Streptomyces griseus*-ból (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- tripszin szarvasmarha hasnyálmirigyből (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- α-kimotripszin szarvasmarha hasnyálmirigyből (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- DNS-polimeráz puffer (New England Biolabs® Inc., USA)
- *Taq* DNS polimeráz (New England Biolabs® Inc., USA)
- agaróz gél: agaróz (SeaKem, Lonza Rockland Inc., USA), 0,5x TBE oldat, etidium-bromid
- molekula méret markerek agaróz gélelektroforézishez:



- DNA Molecular Weight Marker VI. - RAPD-PCR analízishez (F.Hoffmann–La Roche Ltd., CH)
- 100 bázisos létra - PCR analízishez (New England Biolabs® Inc., USA)
- GR Green futtató festék gélelektroforézishez (Biocenter, Szeged, HU)
- DNS izoláló kit: Master Pure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre Technologies Corp., USA)
- PCR termék tisztító kit: PCR-Advanced™ PCR Clean Up System (Viogene BioTek Corp., TW)
- EtOH (Reanal, HU)
- EtAc (Reanal, HU)

#### 4.1.3 Eszközök

- Biosan DEN-1B denzitométer (Biosan, LV)
- Multiskan Ascent Microplate photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (mikrotiter lemez olvasó fotométer)
- ScanVac CoolSafe™, (Labogene, Allerød, DEN) (líoifilizáló)
- membránszűrő (0,22 µm-es) FilterBio PES Syringe Filter (Lab-Ex Ltd, HU)
- Specord Plus 2000 UV spektrofotométer (Analytik Jena, Jena, GER)

#### 4.1.4 Patogén baktériumok

A vizsgálataimhoz a 4. táblázatban látható patogén baktériumokat használtam fel.

**4. táblázat.** A vizsgálatok során felhasznált, törzsgyűjteményekből származó patogén baktériumok

Patogén baktérium	Kód
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCM 4699
<i>Salmonella</i> Hartford	NCAIM B1310
<i>Yersinia enterocolitica</i>	HNCMB 98002
<i>Escherichia coli</i>	NCAIM B01909

## 4.2 Módszerek

### 4.2.1 Baktériumok izolálása és fenntartása

A felületi minták, amelyekből a munka során felhasznált baktériumok izolálása történt, két különböző módszerrel kerültek levételre:

- sima, egyenes felületek esetében TSA-t tartalmazó Contact slide-okat alkalmaztam,
- míg a nehezen hozzáférhető, nem egyenletes felületekhez mintavevő tampont (TSB levesben) használtam.

A felületi mintavételek az alábbiakban felsorolt, különböző élelmiszerfeldolgozó környezetekben történtek; a vizsgált helyek után zárójelben a későbbiekben alkalmazott kódok olvashatók. A kódok előtagját a mintavétel módja és helye határozta meg, C kezdődés esetében tamponos mintavétel, CS esetében Contact Slide-os mintavétel történt, kivéve a zöldségüzemnél, ahol a minták korábban kerültek levételre és kódolásra.

#### Vágóhíd (P):

- Asztal termelés közben (CP-T)
- Bőr feldolgozás közben (CP-S)
- Húslével szennyezett munkafelület (CP-MJ)
- Húsos tálca (CP-P)

#### Tojásfeldolgozó üzem (E)

- Tojás felülete (CE-E)
- Puffertartály (CE-PT)
- Tojástörő gép felszíne (CE-B)
- Tojáslé (CE-EJ)
- Munkaasztal (CSE-T)
- Tojástörő gép belseje (CSE-B)

#### Tejüzem (M)

- Nyerstej leeresztő csap (CM-RMTT)
- Savanyú termék tartály belső fala termelés közben (CM-SMT)
- Pasztörözött tejszíntartály leeresztő csap (CM-CT)
- Pasztörözött tejtartály leeresztő csap (CM-MTT)
- 2,8%-os pasztörözött tejtartály (CSM-PMT2)

- Nyerstejtartály leürítés után (CSM-RMT2)
- Nyerstejsiló leürítés után (CSM-RMT)
- Savanyútermék tartály (CSM-BCT)
- 1,5%-os pasztörözött tejtartály (CSM-PMT)
- Savanyúterméktartály belső fala adagoláskor (CSM-ST)
- ESL csomagológép dobozformáló talp (CSM-PM)

### Zöldségfeldolgozó üzem

A zöldségfeldolgozó üzemből vett minták a zöldségek tárolására felhasznált rekeszek belső felszínéről származnak.

A levett mintákat 25 °C-on 24 órán át inkubáltam. A Contact Slide-dal levett mintákról a különböző morfológiával rendelkező telepeket TSA lemezekre oltottam tovább tisztatenyészet készítési módszerrel, míg a TSB levesbe levett mintákat tizedelő hígítási sor készítését követően felületi szélesztéssel -100 µl pipettázásával TSA agar felületére, majd szélesztőbotos szélesztéssel – oltottam a TSA agarlemez felületére. Ezt követően az izolátumok 25 °C-on 24 órán át voltak inkubálva. A különböző morfológiával rendelkező baktériumok tiszta tenyészetét steril paraffinolajjal lezárt TSA ferde agarokon, 4 °C-on kerültek tárolásra.

#### 4.2.2 Az izolátumok csoportosítása morfológia alapján

Az izolált baktériumok csoportosítása és az azonos morfológiával rendelkezők kiszűrése céljából elvégeztem az izolátumok WL agaron történő tenyésztését is. Az izolátumokat exponenciális növekedési szakaszban oltókaccsal oltottam ki WL és TSA lemezekre, majd 25 °C-on 24-48 órás inkubálást követően történt a hasonló morfológiájú telepek csoportosítása, végül a csoportokból egy-egy izolátumot választottam ki további vizsgálatok céljából.

#### 4.2.3 Kontakt inhibíció vizsgálata agar spot módszerrel

A gátló hatással rendelkező izolátumok kiszűréséhez használtam ezt a módszert. A 4. táblázatban szereplő patogén baktériumokat TSA lemezekre oltást követően 37 °C-on, *Y. enterocolitica* esetében 25 °C-on inkubáltam 24 órán keresztül. Az így készült egy napos patogén baktérium tenyészetekből steril desztillált vízben szuszpenzióit készítettem. A szuszpenziók sűrűségét Biosan DEN-1B denzitométer segítségével 2,5 McFarland értékre

állítottam be, ami kb.  $10^8$ - $10^9$  CFU/ml-nek felel meg. Tizedelő hígítási sor készítése után 1 ml szuszpenziót pipettáztam ki abból a hígítási tagból a TSA lemezekre, amely mikrobaszáma a hígítást követően kb.  $10^4$ - $10^5$  CFU/ml sűrűségűnek felelt meg. A szuszpenzió feleslegét lepipettáztam. Ezt követte a lemezek felületének szárítása, majd az izolátumokból készített sejtsuszpenziókból 10  $\mu$ l-t az agar felületre pipettáztam (körülbelül  $10^6$  sejtet). Ezekhez a sejtsuszpenzióhoz 24 órán át inkubáltam az izolátumokat TSA lemezen friss átoltást követően, majd steril vízben készítettem belőlük 2,5 McFarland sűrűségű szuszpenziókat. A kontakt inhibíciós teszthez leoltott lemezeket 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 és 42 °C-on inkubálam 6 napig, az esetlegesen megjelenő gátláshoz szükséges optimális hőmérséklet és idő meghatározása miatt. A gátló hatás megjelenését a vizsgált izolátumok makrokolóniái körüli feltisztulási zónák kialakulása jelezte. A lemezek egy, két, három és hatnapos inkubáció után kerültek értékelésre.

Későbbi vizsgálataim során megismételtem a módszert négy, tojásból származó *Salmonella* izolátum ellen is, ekkor azonban már csak a korábban *S. Hartford* ellen gátló hatást mutató izolátumokat tesztelve.

#### 4.2.4 Kontakt inhibíció vizsgálata agar spot módszerrel, különböző pH értékű táptalajokon

A módszer megegyezett a 4.2.3-as pontban leírtakkal, annyi különbséggel, hogy az inhibíció vizsgálat során használt TSA lemezeket különböző pH értékekre állítottam be, amelyek az alábbiak voltak: pH 4, 5, 6, 7, 8, 9. Az adott pH érték eléréséhez a biokémiai vizsgálatokhoz is használt puffereket használtam (foszfát-citrát puffer, Sorensen-féle foszfát puffer, glicin-NaOH puffer). A lemezeket 20 °C és 30 °C-on inkubáltam 24 órán keresztül. Ebbe a vizsgálatba csak az előzetes tesztelés, a „screening” során gátló hatást mutató izolátumok kerültek bevonásra.

#### 4.2.5 Biokémiai és fiziológiai tesztek

A gátló hatással bíró izolátumok karakterizálásához az alábbi tesztek végzettem el. A fiziológiai paraméterek közül a hőmérséklet és pH hatását vizsgáltam az izolátumok szaporodására nézve. A hőmérséklet optimum meghatározásához az izolátumokat oltókaccsal TSA agar felületére oltottam, majd az alábbi hőmérsékleteken inkubáltam 24 órán keresztül: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 és 42 °C.

A pH optimum meghatározásához különböző pH értékű (3, 4, 5, 6, 7, 8, és 9) TSA lemezeket készítettem, az alábbi pufferek segítségével Ruzin (1999) leírása alapján:

- pH 3-7: foszfát-citrát puffer,
- pH 8: Sorensen-féle foszfát puffer,
- pH 9: glicin-NaOH puffer.

A TSA lemezeken a szaporodást 24 óra elteltével értékeltem, az inkubáció 25 °C-on történt.

Biokémiai vizsgálatok közül KOH tesztet, kataláz tesztet és oxidáz tesztet végeztem.

#### 4.2.6 A gátló hatású izolátumok genomiális DNS-ének kivonása

Az antagonista izolátumok genomiális DNS-ének kivonásához a „Master Pure™ Complete DNA and RNA Purification Kit”-et használtam a gyártó által leírt protokoll szerint. Ehhez TSA agaron 25 °C-on 24 órás tenyészeteket készítettem az izolátumokból.

#### 4.2.7 Molekuláris tipizálás RAPD-PCR módszerrel

A gátló hatású izolátumok klonális hasonlóságának vizsgálatához molekuláris tipizálást végeztem RAPD-PCR módszerrel, az alábbi primereket felhasználva:

- OPE 18 (Belák, 2009): 5' GGACTGCAGA 3'
- M13 (Vassart et al., 1987): 5' GAGGGTGGNGGNTCT 3'
- D8635 (Van Looveren et al., 1999): 5' GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC 3'

A PCR reakció elegy (25 µl) a következőket tartalmazta:

- 1x DNS-polimeráz puffer
- 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,3 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 0,5 µM primer
- 0,75 U *Taq* DNS polimeráz
- 50 ng templát DNS

A PCR reakció az alábbi paraméterek szerint történt:

- kezdő denaturálás 95 °C-on 5 perc
- 35 cikluson keresztül:
  - denaturálás 95 °C-on 30 másodperc
  - primerkötés 37 °C-on (OPE 18 és M13) vagy 40 °C-on (D8635) 30 másodperc
  - lánchosszabbítás 72 °C-on 2 perc
- végső lánchosszabbítás 72 °C-on 5 perc.

A keletkezett PCR termékek elválasztása és kimutatása 1,5%-os agaróz gélen gélelektroforézissel történt, DNA Molecular Weight Marker VI. létra futtatásával. A mintázatok összehasonlítása a GelCompar® II (Applied Maths NV, Belgium) szoftver segítségével történt.

#### 4.2.8 Antagonista hatású izolátumok azonosítása

##### *4.2.8.1 Miniaturizált identifikációs tesztek*

Az antagonista hatással rendelkező izolátumokat első lépésben miniaturizált identifikációs tesztekkel próbáltam azonosítani. A Gram-negatív izolátumokhoz API 20 NE és API 20 E kitéket, míg a Gram-pozitív izolátumokhoz BBL Crystal tesztet használtam.

##### *4.2.8.2 Szekvenálás 16S rDNS alapján*

Második lépésben az izolátumokat a 27f-1492r primerpárral (Maiwald, 2004) előállított 16S rDNS PCR-termékek közvetlen Sanger szekvenálásával azonosítottam nemzetség vagy faji szinten. A keletkezett amplikonokat PCR-Advanced™ Clean Up System nevű PCR termék tisztító kit segítségével tisztítottam meg, a szekvenálást pedig az Eurofins BIOMI Kft. (Gödöllő) végezte el. A nukleotid sorrend meghatározása a reverz primer segítségével történt. A kapott szekvenciákat a MEGA6 programmal (Tamura et al., 2013) dolgoztam fel, majd az EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) és a Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) adatbázisok segítségével értékeltem.

A felhasznált primerek szekvenciája:

- 27f: 3' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 5'
- 1492r: 3' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 5'

A PCR reakcióelegy (25 µl) a következőket tartalmazta:

- 1x DNS-polimeráz puffer
- 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,1 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 0,25 µM 27f primer
- 0,25 µM 1492r primer
- 0,75 U *Taq* DNS polimeráz
- 50 ng templát DNS

A PCR reakció az alábbi paraméterek szerint történt:

- kezdő denaturálás 95 °C-on 5 perc
  - 35 cikluson keresztül: denaturálás 95 °C-on 30 másodperc
  - primerkötődés 58 °C-on 30 másodperc
  - lánchosszabbítás 72 °C -on 1 perc
- végső lánchosszabbítás 72 °C-on 3 perc.

A keletkezett PCR termékek kimutatása 1%-os agaróz gélen gélelektroforézissel történt, 100 bázispáros méretmarker futtatásával.

#### 4.2.9 Gátló hatás vizsgálata együtt tenyésztéssel táplevesben és tejben

A kontakt inhibíciós vizsgálatok során két, *Salmonella* Hartforddal szemben gátló hatást mutató törzset vizsgáltam ugyanezen *Salmonella*-val, illetve egy tojásléből izolált *S. enterica* törzssel való együtt tenyésztéssel TSB levesben (5. táblázat). A TSB levest tartalmazó lombikokat különböző patogén: gátló mikroorganizmus koncentráció arányokkal oltottam be, amelyek a következők voltak: 1:1, 1:10, 1:100 és 1:1000. A legkisebb koncentráció 10<sup>1</sup> sejt/ml-t jelentett. Kontrollként csak a patogént, illetve csak a gátló mikroorganizmust tartalmazó lombik is beoltásra került. A lombikokat 6 napon keresztül inkubáltam 25 °C-on, statikus körülmények között. Az első, második, harmadik és hatodik napon kioltást végeztem a lombikokból TSA és az adott patogénnek megfelelő szelektív táptárgar (Harlequin agar) felületére szélesztéssel két párhuzamosan leoltva. Így a TSA felületén nőtt telepekből a patogén és a gátló törzs koncentrációja együtt volt meghatározható, míg a szelektív táptalajról csak azon patogének

számát lehetett leolvasni, amelyek képesek voltak látható telepeket létrehozni, ezáltal kiszámolhatóvá vált mind a két mikroorganizmus növekedése/túlélése ( $N_{\text{gátló baktérium}} = N_{\text{összes-}} - N_{\text{patogén}}$ ) az idő előrehaladtával.

Az együtt tenyésztést élelmiszermatrixban is elvégeztem a CSM-RMT-1 jelű törzs esetében, TSB leves helyett 2,8%-os zsírtartalmú UHT tejet használva tápközegként. Ennek a vizsgálatnak a menete azonos volt a fentebb leírtakkal.

**5. táblázat:** Az együtt tenyésztéses módszerrel vizsgált izolátumok, a patogén baktériumok, és a felhasznált szelektív táptalajok

Tesztelt gátló izolátum	Patogén mikroorganizmus	A felhasznált szelektív táptalaj
CP-P-5 ( <i>Pseudomonas lundensis</i> )	<i>Salmonella</i> Hartford	Harlequin™ agar
CSM-RMT-1 ( <i>Serratia marcescens</i> )	<i>Salmonella enterica</i>	Harlequin™ agar

#### 4.2.10. Sejtmentes felülúszó gátló hatásának vizsgálata

A sejtmentes felülúszó gátló hatásának vizsgálatával az extracelluláris gátló anyagok termelését vizsgáltam mikrotenyészetek segítségével. A screening során gátló hatást mutató izolátumok TSB levesben tenyésztett kultúráiból előállított egy-, három- és hatnapos sejtmentes felülúszók gátló hatását Multiskan Ascent készülék segítségével vizsgáltam.

A kiválasztott izolátumokból kb.  $10^6$  sejt/ml koncentrációjú tenyészeteket készítettem, majd 25 °C-on inkubálva egy, három és hat napot követően vettem ki 1 ml mintát. Mintavétel után a sejtek centrifugálással (14 000 rpm, 15 perc) kerültek elválasztásra a tápközegtől, a felülúszókat 0,2 µm pórusméretű membránszűrőn átszűrve kaptam meg a továbbiakban vizsgált sejtmentes felülúszókat. A mikrotiter lemezek mélyedéseibe 300 µL folyadék került, amely 75 µL négyszeres erősségű TSB levesből, 75 µL kórokozó sejtuszuspenzióból és 150 µL, a vizsgált törzs sejtmentes felülúszójából állt. A négyszeres erősségű TSB levesre azért volt szükség, hogy a végtérfogat (300 µL) is megfelelően koncentrált táplevest tartalmazzon. A beoltott mikrotiter lemezeket 25 °C-on inkubáltam, és az 595 nm-en mért abszorbancia értékeket a tenyésztés 24 órája alatt 30 percenként automatikusan rögzítette a méréshez használt műszer. A vizsgálatok során három párhuzamos mérés történt. Az idő függvényében kapott abszorbancia értékekből növekedési görbéket készítettem, így láthatóvá vált a sejtmentes felülúszók hatása a kórokozók növekedésére.



#### 4.2.10.1 Sejtmentes felülúszó gátló hatásának vizsgálata különböző tenyésztési körülmények mellett

Az előző pontban leírtak szerinti vizsgálatot végeztem el két, a *Salmonella* Hartfordot gátló izolátummal (CP-P-5, CE-EJ-2). A tenyésztés az alábbiak szerint történt: statikus és rázott (180 rpm, 25 °C) körülmények között inkubáltam a tenyészeteket, továbbá a TSB leves mellett TGE tápvelesben tenyésztve is megvizsgáltam a kinyert sejtmentes felülúszók gátló hatását annak érdekében, hogy meghatározzam a megváltozott tenyésztési körülmények hatását az antagonista vegyület(ek) termelődésére.

Emellett a két izolátum (CP-P-5, CE-EJ-2) TSB-ben statikus körülmények mellett elkészített felülúszóit agar lyukdiffúziós módszerrel is megvizsgáltam, hogy összevegyem az így megfigyelteket a mikrotiter lemezzel kapott eredményekkel. Ehhez a 4.2.3-as pontban leírt agar-spot módszerhez hasonlóan elkészített, patogénnel leoltott TSA agarlemezbe 7 mm átmérőjű lyukakat fúrtam, majd ezekbe pipettáztam bele a sejtmentes felülúszókat, és inkubáltam 25 °C-on 24 órán át.

#### 4.2.10.2 Különböző kezelések hatásának vizsgálata a sejtmentes felülúszó gátló hatására

Statikus körülmények között 24 órán át TSB levesben inkubált CP-P-5 izolátumból nyert sejtmentes felülúszóinál az alábbiakban felsorolt kezeléseket alkalmaztam, majd vizsgáltam a kezelt felülúszók hatását *Salmonella* Hartfordot szaporodására az előzőekben ismertetett módon:

- proteáz kezelés 37 °C-on 90 percig:
  - proteináz K 200 µg/mL
  - proteáz *Streptomyces griseus*-ból 200 µg/mL
  - tripszin szarvasmarha hasnyálmirigyből 100 µg/mL
  - α-kimotripszin szarvasmarha hasnyálmirigyből 100 µg/mL

- 0,2 N NaOH kezelés
- hőkezelés:
  - 95 °C-on 5 perces forralással,
  - 95 °C-on 30 perces forralással,
  - 121 °C -on 15 percig autoklávban, kb 1,1 bar nyomáson.

A kezeléseket követően a gátló hatásokat a korábbiakban leírtak alapján, mikrotiter lemezben Multiscan Ascent készülékkel vizsgáltam, a korábban gátolt patogénnel szemben. A kezelések több izolátum esetében a liofilizált felülúszókkal is elvégzésre kerültek, azonban az eredmények alapján a nem koncentrált felülúszóknál számos esetben nem volt értelme vizsgálni a fent említett kezeléseket.

#### *4.2.10.3 Liofilizálással koncentrált sejtmentes felülúszó vizsgálata*

A kiválasztott gátló hatású izolátumok sejtmentes felülúszóiból liofilizálással 10x-es töménységű oldatokat készítettem. Ehhez a TSB levesben statikus körülmények között előállított tenyészetekből készítettem felülúszókat a fentebb leírtak alapján egy, három és hatnapos tenyésztést követően. A felülúszókat ezt követően -80 °C-os fagyasztás után liofilizáltam.

A liofilizált felülúszókat a kiindulási térfogathoz képest tized mennyiségű TSB levesben feloldva a 10x-esen koncentrált felülúszókkal megismételtem a gátló hatás vizsgálatokat mikrotiter lemezt használva Multiscan Ascent készülékkel, a 4.2.10-es fejezetben ismertetett paraméterekkel.

#### *4.2.11 Celofános vizsgálat*

A vizsgálat Giolitti és Bertani (1953) által leírtak alapján történt, kisebb módosításokkal. Körülbelül 4 cm átmérőjű celofánkorongokat vágtam ki, és szűrőpapírral elválasztva üveg petricsészébe helyeztem őket. A szűrőpapírokat előzőleg desztillált vízbe áztattam, és a celofánkorongokat óvatosan a nedves papírra helyeztem. A celofánkorongokat autoklávban történő sterilizálás (121 °C -on 15 percig) után steril csipesz segítségével a TSA lemezekre helyeztem, ami így minimálisra csökkentette a celofán alatt megjelenő légbuborékok esélyét. Ezután a szűrőpapírt eltávolítottam, és 10 µl-t az antagonista izolátum vizes szuszpenziójából

a celofán közepére cseppentettem. Ez a térfogat körülbelül  $10^6$  sejtnek felelt meg. 24 órás 25 °C -on történő inkubálás után steril csipesszel eltávolítottam a celofánt, amelynek felületén kolóniák fejlődtek. A TSA lemezeket ezután a screeningnél használt módszer szerint oltottam le a tesztelt patogén mikroorganizmusokkal, majd inkubáltam a gátló hatások megjelenésének kedvező hőmérsékleteken 15, 20, 25 és 30 °C-on hat napig. Az eredményeket egy, kettő és hat nap után olvastam le.

#### *4.2.11.1. UV spektrumok felvétele celofánon történő tenyésztés után*

A gátló komponens meghatározására tett kísérletként lemértem a gátló komponenst tartalmazó agar darabok extraktumának UV spektrumát. Ehhez a celofános vizsgálat során ismertett módszerrel készített lemezekből a 24 órás tenyésztést követően a celofán eltávolítása után 1x1x1 cm-es agar darabokat vágtam ki. Az antagonista hatásért felelős vegyület agarból történő kivonásához az Okulate (2009) által korábban leírtak szerint öt szerves oldószert (acetont, kloroformot, etil-acetátot, metanolt és 2-propanolt) és ionmentesített desztillált vizet használtam. Az agarból kivágott 1 cm<sup>3</sup> -es darabokat 2 ml szerves oldószert vagy vizet tartalmazó kémcsőbe helyeztem. Két órás 25 °C-on elvégzett extrakció után minden csőből 1 ml mintát elemeztem Secord Plus 2000 UV spektrofotométerrel, 200 nm-től 800 nm-ig terjedő spektrumot rögzítve, 2 nm-enkénti méréssel.

#### 4.2.12 Antibiotikum rezisztencia vizsgálat

A gátló hatású izolátumok antibiotikum-érzékenységének meghatározásához Bagul és Sivakumar (2016) által leírt kvalitatív korongdiffúziós érzékenységi vizsgálati módszert alkalmaztam. Az izolátumokból TSA agaron 25 °C-on egy éjszakán át tartó tenyésztést követően szuszpenziót készítettem. Ehhez 0,5 McFarland denzitású, kb.  $10^8$  sejt/ml-es koncentrációjú oldatokat készítettem 2 ml steril 0,85%-os NaCl-ban, majd steril mintavevő tamponos pálcával Müller-Hinton agarlemezekre oltottam a sejteket. Száradást követően steril csipesszel a következő antibiotikum korongokat helyeztem az agar felületére: kloramfenikol, ceftadizim, imipenem, eritromicin, naldixinsav, meropenem, norfloxacin, kolisztin-szulfát, ciprofloxacim, piperacillin, amikacin. A lemezek inkubálását a vizsgált izolátumok hőmérsékleti optimumán, azaz 25 °C -on végeztem el, az eredményeket pedig 24 óráután olvastam le (a kialakult gátlási zónák átmérőjének lemérésével).

#### 4.2.13 Proteáz aktivitás vizsgálata

A gátló hatású izolátumok proteolitikus aktivitását tejporos TGE agar segítségével vizsgáltam. Desztillált vízben 0,5 McFarland standardnak megfelelő sűrűségű sejtszuszpenziót készítettem az izolátumokból, amiből 10 µl-t pipettáztam a tejporos TGE lemezek felületére, amelyeket ezt követően 20, 25 és 30 °C-on inkubáltam. A megjelenő feltisztulási zónákat egy, két és öt napos inkubáció után olvastam le. A vizsgálatot három párhuzamosban végeztem.

#### 4.2.14 Sziderofór termelés vizsgálata

A sziderofór-termelődést Schwyn és Neilands (1987) módszere alapján, Verma és mtsai. (2012) által leírtak szerint vizsgáltam CAS agar lemezeket használva az alapközeg módosításával. A CAS-lemezeket az alábbiak szerint készítettem. a külön elkészített Kings B agarhoz kevertem a külön elkészített CAS festéket. A CAS festék elkészítéséhez 50 ml vízben feloldottam a kromazurol-S festéket, és a vas(III)-oldatot. A festékoldatot kevergetés mellett hozzáadtam a HDTMA-hoz, amelyet előzőleg 40 ml vízben oldottam fel. Az alapközeget és a CAS-festéket külön-külön sterilizáltam (121 °C-on 15 percig) és felhasználás előtt kevertem össze. A CAS-agarlemezeket ezt követően oltottam le oltókacs segítségével az izolátumok 24 órás tenyésztéssel, majd 25 °C-on 24 órán át inkubáltam. A leolvasás során a kék CAS-agaron kifejlődő telepek körül megjelenő színváltozás, a narancssárga zóna jelezte a sziderofór aktivitást, aminek oka, hogy a sziderofórok erős kelátképző vegyületek, amelyek képesek a vasat kiszakítani a komplexből, így a festék színének változását eredményezve.

#### 4.2.15 Kitináz termelés vizsgálata

##### *4.2.15.1 Kitináz termelés vizsgálata tenyésztéssel*

A kitináz termelés és aktivitás kimutatása a Leisner és munkatársai (2008) által leírt módszer alapján történt. A vizsgálathoz a *S. marcescens* antagonista törzsek sejtszuszpenzióit bázikus kitint tartalmazó táptalajra (BMC) cseppentve három napos, 30 °C-on történő inkubációt követően váltak értékelhetővé a feltisztulási zónák kitináz aktivitás megléte esetén.

A módszer a későbbiekben finomításra került azzal, hogy rákhéj por helyett az abból készített koloidális kitin került a táptalajba. Számos irodalmi forrás ugyanis a kitináz aktivitás vizsgálatára a mikroorganizmusok, azok enzimeit által jobban hozzáférhető, jobban oldódó koloidális kitint alkalmazza, mivel ezt tartják a kitináz legjobb indukátorának (Gomaa, 2012; Saima és Roohi, 2013; Sandhya et al., 2004), ezért rákhéj-porból, illetve pelletből koloidális kitin készült a Liu és munkatársai (2014), valamint Gómez Ramírez és munkatársai (2004) leírata szerint.

#### 4.2.15.2 Kitináz kódoló gén kimutatása PCR-rel

A *S. marcescens* törzsek *chiA* génje a Ramaiah és mtsai. (2000) által leírtak alapján kerültek detektálásra PCR segítségével.

Ehhez az alábbi primerek kerültek felhasználásra:

- chiFEMSF (5'-GATATCGACTGGGAGTCCC-3')
- chiFEMSR (5'-CATAGAAGTCGTAGG TCATC-3').

A vizsgálat során pozitív kontrollként *S. marcescens* eredetű DNS-t használtam.

A PCR reakcióelegy (25 µl) a következőket tartalmazta:

- 1x DNS-polimeráz puffer
- 100 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 10 pM chiFEMSF primer
- 10 pM chiFEMSR primer
- 2,5 U *Taq* DNS polimeráz
- 50 ng templát DNS

A PCR reakció az alábbi paraméterek szerint történt:

- kezdő denaturálás 94 °C-on 4 perc
- 35 cikluson keresztül:
  - denaturálás 92 °C-on 1 perc
  - primerkötés 58°C-on 1 perc
  - lánchosszabbítás 72 °C-on 1 perc
- végső lánchosszabbítás 72 °C-on 7 perc.

A polimeráz láncreakció után az eredmények értékelése FlashGel TM (Lonza Group Ltd.) elektroforézis készülékkel valósult meg.

#### 4.2.16 Prodigiozin termelés vizsgálata

##### 4.2.16.1 Előzetes színteszt

A *S. marcescens* törzseket Nutrient agar lemezekben tenyésztettem, és egy éjszakán át a következő hőmérsékleteken inkubáltam: 20, 25, 30, 37 és 40 °C-on. A prodigiozin extrakcióhoz a tenyészetekből 3-4 kacsnyit 1 ml 96%-os EtOH-val keverve Eppendorf csőbe tettem és szobahőmérsékleten 24 órán át állni hagytam. Ezt követően 15 percig 10 000-es fordulatszámon centrifugáltam, majd 10 µL 37%-os HCl-t vagy 10 µL NH<sub>3</sub>-át adtam a kémcsőben lévő pillethez. A megjelenő vörös (savas környezet) vagy sárga (lúgos környezet) színváltozást a prodigiozin jelenléte esetén lehet megfigyelni (Bharmal és Jahagirdar, 2012).

##### 4.2.16.2 Prodigiozin termelő gének PCR analízise

A prodigiozin-termelésért felelős génklaszter jelenlétének vizsgálatához a *cueR* és *copA* gének PCR-es amplifikációját a Harris et al. (2004) által leírtak szerint végeztem el.

Ehhez az alábbi primerek kerültek felhasználásra:

A *cueR* génhez a *cueR* és a *pigA* által határolt régióra specifikus primer pár a *cueR* és PE1, míg a *copA* génhez a *pigN* és a *copA* által határolt régióra specifikus primer pár az ab77 és PE2 volt.

A primerek szekvenciái az alábbiak:

- *cueR* (5'-TCGTAAAACGAATCGTC-3')
- PE1 (5'-GCAAAACTCTGAGCGGATTTCGC-3')
- ab77 (5'-GAAACACTTAACCTGACG-3')
- PE2 (5'-CGCAGTTCATGCAGGACAGC-3')

A PCR reakcióelegy (25 µl) a következőket tartalmazta:

- 1x DNS-polimeráz puffer
- 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,1 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

- 0,4  $\mu\text{M}$  primer (cueR vagy ab77)
- 0,4  $\mu\text{M}$  primer (PE1 vagy PE2)
- 0,75 U *Taq* DNS polimeráz
- 50 ng templát DNS

A gradiens PCR reakció kétféle képpen történt, egy alacsonyabb és egy magasabb hőmérsékleti tartományban, a kapott eredmények alapján módosítva a hőmérsékleteket. Az elvégzett gradiens PCR az alábbi paraméterek szerint zajlott:

- kezdő denaturálás 95 °C-on 5 perc
- 35 cikluson keresztül:
  - denaturálás 95 °C-on 30 másodperc
  - primerkötés 48 °C, 51 °C, 54 °C -on 30 másodperc  
vagy 62 °C, 65 °C, 68 °C -on 30 másodperc
  - lánchosszabbítás 72 °C-on 2 perc
- végső lánchosszabbítás 72 °C-on 3 perc.

A keletkezett PCR termékek elválasztása és kimutatása 1,5%-os agaróz gélen gélelektroforézissel történt, 100 bázispáros molekula méretmarker futtatásával.

#### 4.2.17 Fluoreszcencia vizsgálata *Pseudomonas* törzsek esetén

A *Pseudomonas* törzsek fluoreszcens festékanyag termelő képességének vizsgálatához a baktériumokat *Pseudomonas* F szelektív agarra oltottam, majd 25 °C-on 24 órán át inkubáltam. Ezt követően 365 nm-es UV fényben történt a fluoreszcens pigmentek termelődésének kimutatása.

#### 4.2.18 Kromatográfiás vizsgálatok

A kromatográfiás vizsgálatok az Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézetének közreműködésével készültek. Ezekben a vizsgálatokban a két legeredményesebb gátló hatást mutató törzsnek (CP-P-5 és CSM-RMT-1) a liofilizálással 10-szeresre koncentrált felülúszóit használtuk.

#### 4.2.18.1 HPTLC vizsgálat

A liofilizált felülúszók extrahálás utáni kivonatai először HPTLC módszerrel voltak megvizsgálva. Az első vizsgálatkor az extrahálás 5 ml etanollal, majd 5 ml 50% vizes etanollal történt. A kivonatokat HPTLC-*Bacillus subtilis* teszttel vizsgáltuk (Móricz et al., 2016).

#### 4.2.18.2 Frakcionált felülúszók gátló hatásának vizsgálata

A HPTLC-s vizsgálatokat zavarta a tápközegben lévő nagy mennyiségű peptid, ezért új, kisebb mátrixú tápközegre volt szükség a gátló törzsek tenyésztéséhez, amiben megfelelő mennyiségben képesek termelődni a gátló komponensek. A további vizsgálatok során így az alábbi tápközegekben tenyésztettem a baktériumokat:

- A CSM-RMT-1 törzsetminimál táplevesben,
- A CP-P-5 törzset:
  - Ásványi 0: folyékony ásványi tápközegben
  - Ásványi 1: folyékony ásványi fruktóz szénforrással
  - Ásványi 2: módosított ásványi tápközegben.

A kivonatok és a frakciók a következő fejezetben leírtak szerint készültek.

A különböző eljárásokkal kapott frakciók gátló hatását újból megvizsgáltam mikrokultúrás módszerrel (lásd 4.2.10-es fejezet, csak a 150 µl felülúszó helyett 150 µl frakciót használtam), így láthatóvá vált, melyik frakcióban maradhettek jelen a gátló komponensek.

#### 4.2.18.2 Felülúszók elválasztása

A vizsgálat során az alábbi extrakciók történtek:

- Hex: Kivonás 7,5 ml hexánnal majd a felülúszó beszárítása, és 100 µl EtAc -ban feloldása.
- EtAc: A maradék kivonása 5 ml EtAc-cal majd a felülúszó beszárítása, és 100 µl EtAc-ban feloldása.
- EtOH: A maradék kivonása 1 ml EtOH-val majd a felülúszó szűrése.



Az extrakciók során a hexán az apoláris anyagokat vonta ki, az EtAc a szemipoláris, míg az EtOH a polárisabb anyagokat. A frakciók ezt követően HPTLC módszerrel kerültek vizsgálatra.

A következő vizsgálathoz a felülúszók frakcionálása egy C18 SPE oszlopon (500 mg Merck Lichrolut) történt az alábbiak szerint:

0. A C18 oszlopon a felülúszóból megkötődött anyagokat metanollal eluáltuk, majd beszárítás után feloldottuk 6 ml vízben.
1. C18 oszlopon áteső felülúszót liofilizáltuk, azt extraháltuk 35 ml etanollal ultrahangfürdőben (1 perc), majd centrifugálás (5 perc, 2000 rpm) után a felülúszót beszárítottuk és feloldottuk 6 ml vízben.
2. Az előző fázisból (1) maradt szilárd anyagot extraháltuk 35 ml metanollal ultrahangfürdőben (1 perc), majd centrifugálás (5 perc, 2000 rpm) után a felülúszót beszárítottuk és feloldottuk 6 ml vízben.
3. Az előző fázisból (2) maradt szilárd anyagot feloldottuk 6 ml vízben.
4. 2 ml 3-as mintából kicsaptuk a peptideket, fehérjéket, amit visszaszuszpendáltunk 1 ml vízben.
5. A fehérjekicsapás után maradt vizes fázist liofilizáltuk és 2 ml vízben visszaoldottuk.

A fehérje kicsapás az alábbi lépések szerint történt:

1. 200 µl fehérjeoldathoz (2ml-es centrifugacsőben) hozzámértünk 800 µl metanolt, majd alaposan vortexeltük,
2. hozzámértünk 200 µl kloroformot, majd megint vortexeltük,
3. hozzáadtunk 600 µl vizet és megint vortexeltük,
4. 13 000 rpm sebességgel 3 percig centrifugáltuk (centrifugálás után két fázis fog elválni: az alsó kloroformos és a felső vizes-metanolos fázisok határán ülnek ki a fehérjék) majd eltávolítottuk a felső fázist vigyázva arra, hogy a fázishatáron lévő fehérjéket ne szippantsuk fel,
5. az alsó fázishoz hozzáadtunk 1600 µl 50%-os metanolt és 50 µl kloroformot, majd megint vortexeltük,
6. ezután centrifugáltuk és eltávolítottuk a felülúszót a 4. pont szerint,
7. az 5. és 6. pontokat még kétszer megismételtük (tehát összesen háromszor mostuk a fehérjéket 50%-os metanollal),
8. az utolsó metanolos mosás és a felső fázis eltávolítása után hozzámértünk az alsó fázishoz 800 µl tiszta metanolt (ekkor csapódtak ki véglegesen a fehérjék), majd 13 000 rpm sebességgel centrifugáltuk 10 percen keresztül. A felülúszót eltávolítottuk a csapadékról úgy, hogy kb. 50 µl felülúszó még maradjon rajta. Ebben

visszaszuszpendáltuk, és egyesítettük az azonos eredetű mintákat egy 1,5 ml-es centrifuga csőben. Újra lecentrifugáltuk az előző paraméterekkel. A felülúszót ezúttal teljesen eltávolítottuk, hogy még a cső fala sem maradjon nedves,

9. a felülúszó eltávolítása után a fehérjecsapadékot addig szárítottuk szabad levegőn, amíg a metanol szagát már nem éreztük (kb. 2-4 perc). (Nem szabad túlszáritani, mert akkor nehezebben oldódik vissza!)
10. száradás után visszaoldottuk a DTT-vel kiegészített 2D pufferben (szobahőn érdemes akár több órán keresztül is oldani, időnként megvortexelni és szonikálni röviden (1-2 perc, nehogy felmelegedjen)),
11. a visszaoldódás után maximum sebességgel centrifugáltuk le 10 percen keresztül szobahőmérsékleten (nehogy kikristályosodjon az urea). Az esetlegesen kiülepedett pelletről leszívtuk a tiszta fehérjeoldatot, ami így már alkalmas fehérje mennyiség mérésére és rehidratációra.

A harmadik vizsgálathoz a felülúszók liofilizátuma egymás után egyre polárisabb oldószerrel volt kivonva, a maradék pedig vízben volt feloldva, így az alábbi frakciók készültek:

A CSM-RMT-1 törzs esetén:

- S0 – 20 ml hexánnal extraháltuk a liofilizátumot, beszárítottuk a hexános kivonat 4 ml vízben felvéve a szárazanyagot,
- S1 – 20 ml etanollal extraháltuk a maradékok, beszárítottuk az etanos kivonatot, 5 ml vízben felvéve a szárazanyagot,
- S2 – a maradékot feloldottuk 5 ml vízben,
- S3 - 20 ml metanollal extraháltuk a maradékot, beszárítottuk a metanos kivonatot 5 ml vízben felvéve a szárazanyagot.

A CP-P-5 törzs esetén:

- P0 - 20 ml hexánnal extraháltuk a liofilizátumot, beszárítottuk a hexános kivonatot 4 ml vízben felvéve a szárazanyagot (Ásványi 2 tápleves)
- P2/2 - 20 ml metanollal extraháltuk a maradékot, beszárítottuk a metanos kivonatot 5 ml vízben felvéve a szárazanyagot (Ásványi 2 tápleves)
- P2/3 - a maradékot feloldottuk 5 ml vízben (Ásványi 2 tápleves)

- P1 -20 ml etanollal extraháltuk a maradékot, beszárítottuk az etanolos kivonatot, 5 ml vízben felvéve a szárazanyagot (Ásványi 1 tápleves)
- P1/2 - 20 ml metanollal extraháltuk a maradékot, beszárítottuk a metanolos kivonatot 5 ml vízben felvéve a szárazanyagot (Ásványi 1 tápleves)
- P1/3 - a maradékot feloldottuk 5 ml vízben (Ásványi 1 tápleves).

## 5. Eredmények és azok megbeszélése

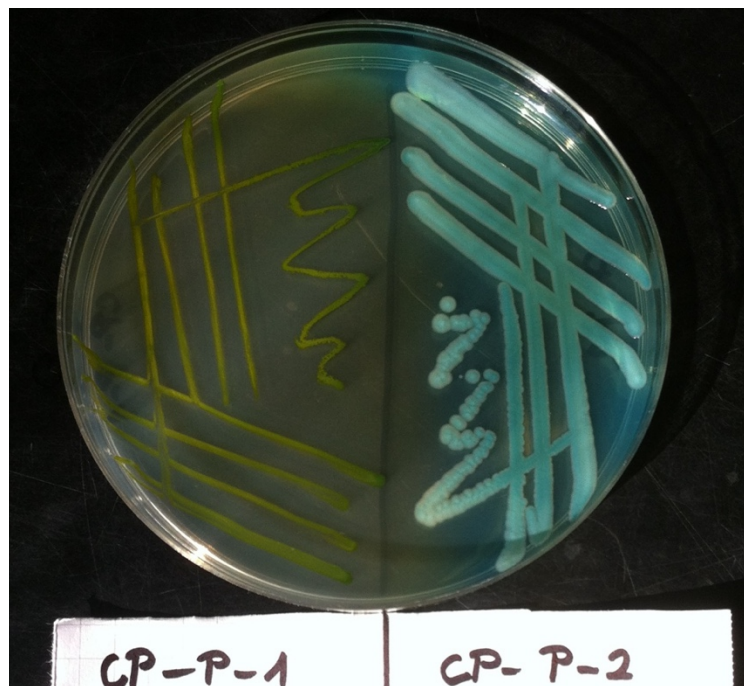
### 5.1 A munka során gyűjtött izolátumok

Összesen 78 baktérium került izolálásra a négy különböző élelmiszerfeldolgozó környezetből. Ezek közül:

- 20 darab sertés vágóhídról,
- 6 darab zöldségfeldolgozó üzemből,
- 18 darab tojás feldolgozó üzemből, míg
- 34 darab tejfeldolgozó üzemből lett begyűjtve.

A telepmorfológia vizsgálata után mind a TSA, mind a WL tápagarak felületén (9. ábra) hasonló morfológiát mutató izolátumokból csak egy lett kiválasztva a további vizsgálatokhoz, így végül 64 baktériumot teszteltem le gátló hatás szempontjából:

- 13-at a sertés vágóhídról,
- 6-ot a zöldségfeldolgozó üzemből,
- 18 izolátumot a tojás feldolgozó üzemből, és
- 27-et a tejfeldolgozó üzemből.



9. **Ábra** Azonos helyről izolált baktériumok telepmorfológiájának összehasonlító vizsgálata WL tápagaron (saját fénykép)

Élelmiszerfeldolgozó környezetben természetes a mikroorganizmusok nagyszámú előfordulása, még a munkafolyamatokat követő tisztítás után is (Maes et al., 2019). Munkám során számos baktériumot sikerült begyűjtenem a mintavételek során, amelyek a 25 °C-os 24 órás inkubálást követően a Contact Slide-okon (TSA agarral) és a táplevesekből történő kioltás után a TSA agarlemezek felületén szemmel látható telepeket képeztek. Ez alapján elmondható, hogy a munka során kiválasztott izolálási helyek mindegyikén nagy számú és különböző morfológiájú baktériumok voltak jelen a mintavétel idején. A négy élelmiszerfeldolgozó környezetből, ahonnan az izolátumok begyűjtésre kerültek, a zöldségfeldolgozó és tojás feldolgozó üzemből származó 6 illetve 18 izolátum morfológia alapján mind különbözőnek bizonyult, ami a jelenlévő baktériumok jelentős változatosságát mutatja. A vágóhídról és a tejfeldolgozó üzemből származó 20, illetve 34 izolátum közül 7-7 került kizárásra morfológiai egyezőségek alapján (2. melléklet, M2), azonban még így is nagy számú, eltérő telep morfológiájú baktérium jellemezte ezen mintavételi helyeket is.

## **5.2 Az élelmiszer eredetű patogén baktériumok szaporodását gátló izolátumok szelektálása**

Az élelmiszer alapanyagokból és a feldolgozó környezetükből gyűjtött izolátumok antagonistikus hatását agar spot módszerrel vizsgáltam *L. monocytogenes*, *Salmonella* Hartford, *Y. enterocolitica* és *E. coli* (4. táblázat) ellen. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a vizsgált 64 izolátumból 20 volt képes gátolni a vizsgált kórokozók legalább egyikét (6. táblázat a-d). Ezekben az esetekben az izolátumok körül részleges vagy teljes feltisztulási zónák jelentek meg. Az izolált baktériumok közül kettő (CM-CT-2, CSM-RMT-1) mind a négy kórokozót gátolni tudta legalább részlegesen, további két izolátum három kórokozót gátolt, három izolátum két kórokozó növekedésére volt negatív hatással, 13 pedig csak az egyik kórokozót tudta gátolni valamelyik vizsgált hőmérsékleten a 6 napos inkubáció alatt.

**6. táblázat** A kontakt inhibíciós vizsgálatok során gátló hatást mutató izolátumok eredményei *S. Hartford* (a), *E. coli* (b), *L. monocytogenes* (c) és *Y. enterocolitica* (d) ellen vizsgálva a 6 napos inkubáció során eltérő időpontokban és különböző hőmérsékleteken

a)

<i>Salmonella</i> Hartford																
Kód	1. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.
CP-P-5	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	-	-	-	-
CE-EJ-2	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	(+)	-	-	-
CM-CT-2	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSM-RMT-1	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Kód	2. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.
CP-P-5	+	-	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-2	+	-	+	(+)	+	(+)	+	+	+	(+)	+	-	(+)	-	-	-
CM-CT-2	+	-	+	-	+	(+)	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSM-RMT-1	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-
Kód	3. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.
CP-P-5	+	-	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-2	+	-	+	(+)	+	(+)	+	+	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CM-CT-2	+	-	+	+	+	(+)	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSM-RMT-1	+	-	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-
Kód	6. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.
CP-P-5	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-2	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CM-CT-2	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSM-RMT-1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-

b)

<i>Escherichia coli</i>																
Kód	1. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.
CP-P-5	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	-	-	-	-
CP-S-8	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-2	-	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	(+)	-	-	-
CE-EJ-3	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-4	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CSM-RMT-1	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CM-CT-2	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Kód	2. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.
CP-P-5	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CP-S-8	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-2	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	(+)	-	-	-
CE-EJ-3	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-4	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CSM-RMT-1	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CM-CT-2	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	-	-	-
Kód	3. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.
CP-P-5	(+)	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	-	-	-	-
CP-S-8	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-2	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	(+)	-	-	-
CE-EJ-3	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-4	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	-
CSM-RMT-1	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CM-CT-2	(+)	-	+	-	+	(+)	+	-	+	-	+	(+)	+	-	-	-
Kód	6. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.	Szap	Felt.
CP-P-5	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	-	-	-	-
CP-S-8	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-2	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	+	(+)	+	-	(+)	-	-	-
CE-EJ-3	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CE-EJ-4	+	-	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	(+)	-	+	(+)	+	-	+	(+)	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)
CSM-RMT-1	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-
CM-CT-2	+	-	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	-	-	-

c)

<i>Listeria monocytogenes</i>																
Kód	1. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.
6/2Z	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CP-P-2	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	+	(+)	+	-	+	-
CE-EJ-3	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CE-EJ-4	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CM-CT-2	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-
CSM-RMT-1	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	(+)	-
Kód	2. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.
6/2Z	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CP-P-2	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	(+)	+	-	+	-
CE-EJ-3	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
CE-EJ-4	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CM-CT-2	+	-	+	-	+	(+)	+	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-
CSM-RMT-1	(+)	-	+	-	+	+	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	(+)	-
Kód	3. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.
6/2Z	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CP-P-2	(+)	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	-	-	-	-	-	-	+	(+)	+	+	+	(+)	+	-	+	-
CE-EJ-3	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
CE-EJ-4	(+)	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CM-CT-2	+	-	+	(+)	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSM-RMT-1	(+)	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	(+)	-
Kód	6. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.
6/2Z	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	+	-	+	-	+	-
CP-P-2	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	-	-	+	-	(+)	-	+	(+)	+	-	+	(+)	+	-	+	-
CE-EJ-3	(+)	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+	-
CE-EJ-4	(+)	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CM-CT-2	+	+	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSM-RMT-1	+	-	+	(+)	+	+	+	(+)	+	-	+	(+)	+	-	(+)	-



d)

<i>Yersinia enterocolitica</i>																
Kód	1. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.
CP-P-5	(+)	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-	+	-	(+)	-	-	-
CP-P-8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
C2Z	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CE-E-1	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-
CE-B-1	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CSE-B-2	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-1	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-
CSE-T-3	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CE-PT-1	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CM-CT-2	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CM-SMT-1	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	(+)	-	+	-
CSM-RMT-1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
CSM-RMTII-1	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	(+)	-
Kód	2. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.
CP-P-5	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-
CP-P-8	-	-	-	-	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-
C2Z	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	+	+	-
CE-E-1	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	(+)	+	(+)	-	-	-	-
CE-B-1	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-
CSE-B-2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
CSE-T-3	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	(+)	+	-	+	-
CE-PT-1	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
CM-CT-2	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	(+)	-	-	-
CM-SMT-1	(+)	-	(+)	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
CSM-RMT-1	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CSM-RMTII-1	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-

Kód	3. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.
CP-P-5	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	(+)	-	-	-
CP-P-8	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
C2Z	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	+	+	-
CE-E-1	-	-	(+)	-	(+)	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	-	-	-	-
CE-B-1	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	-
CSE-B-2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-1	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	(+)	-	-
CSE-T-3	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-
CE-PT-1	-	-	(+)	-	+	-	+	(+)	+	+	+	(+)	-	-	-	-
CM-CT-2	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CM-SMT-1	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	+	-
CSM-RMT-1	(+)	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CSM-RMTII-1	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-

Kód	6. nap															
	5°C		10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		37°C		42 °C	
	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.	Szap.	Felt.
CP-P-5	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	(+)	-	-	-
CP-P-8	-	-	+	-	+	-	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+	-
C2Z	(+)	-	+	(+)	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
CSE-T-4	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CE-E-1	-	-	(+)	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	-	-	-	-
CE-B-1	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	-
CSE-B-2	+	-	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	-
CSE-T-1	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	(+)	-	-
CSE-T-3	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	+	+	+	-
CE-PT-1	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CM-CT-2	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CM-SMT-1	(+)	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	(+)	-
CSM-RMT-1	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-
CSM-RMTII-1	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

- (+) részleges gátlás  
+ teljes gátlás  
- nincs gátlás  
SZ szaporodás  
F feltisztulási zóna

Miután az izolátumok közel egyharmada rendelkezett valamelyik vizsgált patogénnel szemben gátló hatással, ez arra enged következtetni, hogy a környezetünkben, így az élelmiszerek környezetében is megtalálható mikroorganizmusok nagy része hatással van más mikrobák életfeltételeire, és sok esetben gátolhatják azok szaporodását.

A gátló hatás szempontjából optimális hőmérsékletet illetően megfigyelhető volt, hogy a legtöbb vizsgált hőmérsékleten a szaporodás gátlása csak részleges volt, míg teljes gátlás csupán egy vagy két hőmérsékleten volt megfigyelhető. A kontakt inhibíciós vizsgálat során a legtöbb esetben a gátló hatás 15 °C és 30 °C között volt tapasztalható, aminek oka az lehet, hogy az antagonista baktériumok számára ezek a hőmérsékletek lehetnek az ideálisak a szaporodáshoz, míg a patogének szempontjából ezek kisebb hőmérsékletek az optimumukhoz képest. Az izolátumok gátló hatása néhol már egy napos inkubáció után kimutatható volt azokon a hőmérsékleteken, amelyeken a kórokozók is képesek voltak növekedni, de legtöbb esetben a 2-3. inkubációs napot követően jelentek meg a gátló hatások. Ez arra enged következtetni, hogy a gátlásért felelős anyagcseretermékek a szaporodás során egyre növekvő mértékben vannak jelen. Néhány esetben azonban a vizsgálat hatodik napjára a kórokozó túlszaporodott azon a baktériumtörzsön, amely korábban gátolni tudta a növekedését. Ez jellemzően azokon a nagyobb hőmérsékleteken volt megfigyelhető, amelyek a patogén baktériumok szaporodása szempontjából ideálisabbak voltak.

A gátló hatással rendelkező baktériumok keresése során a legérzékenyebb kórokozónak a *Y. enterocolitica* bizonyult, mivel a 20 antagonista izolátum közül 14 hatott negatívan a növekedésére. A *L. monocytogenes* és az *E. coli* hét, illetve nyolc izolátummal szemben volt érzékeny, és csak négy baktérium tudta gátolni a *S. Hartford* növekedését. A gátló hatásokra példák az M3 mellékletben láthatóak.

### **5.3 A gátló hatással rendelkező izolátumok jellemzése, tipizálása és azonosítása**

Az *in vitro* gátló hatás vizsgálat eredményei alapján csak annak a 20 izolátumnak történt meg a további jellemzése, azonosítása és tipizálása, amelyek gátolták bármelyik patogén szaporodását.

A fiziológiai tesztek eredményei alapján elmondható, hogy egy kivételével valamennyi izolátum széles pH intervallumon belül (3-tól 9-ig) szaporodott; a CM-SMT-1 törzs azonban csak pH5 és pH9 között mutatott szaporodást. Hőmérséklet szempontjából elmondható, hogy az izolátumok ebben az esetben is széles határok között voltak képesek növekedni: csupán négy izolátum nem szaporodott 42 °C-on, egy izolátum kivételével mindegyik szaporodott 37 °C-on és csak két törzs nem szaporodott az 5 °C-on való tenyésztést követően. Egy izolátum (CM-SMT-1) volt, amely nem szaporodott pH 4-en és pH 3-on, a többi baktérium mindegyik pH-n képes volt valamilyen mértékű szaporodásra. A CE-E-1-es izolátum és az előbb már említett

CM-SMT-1 kivételével, amelyek egyébként is gyengébb szaporodást mutattak a vizsgálatok során, az izolátumok pH 7-es értéken szaporodtak a legerősebben. Összegezve megállapítható, hogy az izolátumok neutrofil és mezofil sajátságúak: optimális pH-értékük 7 körüli, míg optimális növekedési hőmérsékletük 25 °C közelében van (4. melléklet, M4).

Meg kell jegyezni azonban, hogy a patogének gátlására felhasználható antagonisták esetében fontos követelmény, hogy ők maguk ne legyenek emberi megbetegedés okozói. A 37 és 42 °C-on szaporodást mutató izolátumok esetében azonban felmerülhet annak lehetősége, hogy az emberi szervezetben uralkodó hőmérsékleten elszaporodva akár negatív hatást is kifejthetnek, így amennyiben egy potenciális antagonista nagy hőmérsékleten is növekszik, meg kell határozni annak lehetőségét, hogy képes-e megbetegedést okozni.

A biokémiai vizsgálatok eredményei alapján mind a 20 antagonista izolátum kataláz-pozitív volt, hét közülük nem mutatott citokróm-c-oxidáz aktivitást. A KOH-teszt eredményei szerint kilenc izolátum Gram-pozitív, 11 pedig Gram-negatív bizonyult (7. táblázat).

**7. táblázat** Az antagonista hatással rendelkező izolátumokkal elvégzett biokémiai tesztek eredményei

Az izolátum forrása	Kód	Kataláz	Oxidáz	KOH <sup>1</sup>
Zöldség	6/2 Z	+	+	+
	C2Z	+	+	+
Hús	CP-P-2	+	+	-
	CP-P-5	+	+	-
	CP-P-8	+	+	-
	CP-S-8	+	+	-
Tojás	CSE-B-2	+	+	-
	CE-B-1	+	-	+
	CE-PT-1	+	-	+
	CE-EJ-2	+	+	-
	CE-EJ-3	+	+	-
	CE-EJ-4	+	+	-
	CSE-T-1	+	+	+
	CSE-T-3	+	-	+
	CSE-T-4	+	-	+
	CE-E-1	+	+	+
Tej	CM-CT-2	+	+	-
	CM-SMT-1	+	-	+
	CSM-RMT-1	+	-	-
	CSM-RMTII-1	+	-	-

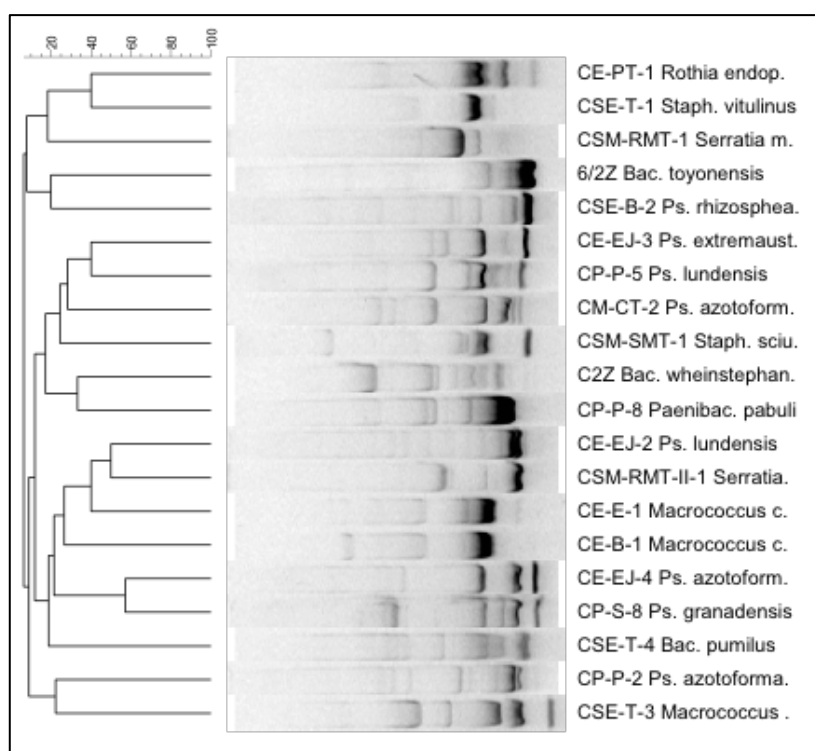
+: pozitív

-: negatív

<sup>1</sup> Gram szerinti pozitivitás KOH teszt alapján

Ezekből az eredményekből az látszik, hogy közel azonos volt a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok aránya az antagonista izolátumok között, illetve, hogy valamennyi aerob vagy fakultatív anaerob mikroba.

Az antagonista izolátumokat az azonosításukat megelőzően RAPD-PCR-rel vizsgáltam annak érdekében, hogy képet kaphassak a klonális kapcsolataikról, azaz hogy milyen mértékben hasonlítanak vagy térnek el egymástól. A molekuláris tipizálás eredményei alapján elmondható, hogy a legjobban értékelhető mintázatokat a D8635 primerrel sikerült elérni (10. ábra). Az OPE18-cal végzett tipizálás nem volt sikeres, mivel sok esetben nem keletkeztek amplikonok, míg az M13-mal és a D8635-tel végzett tipizálás azt mutatta, hogy mind a húsz antagonista izolátum klonálisan különböző, azaz eltérő törzseket reprezentálnak.



**10. ábra** Az antagonista izolátumok RAPD-PCR vizsgálata során kapott mintázatok D8635 primert használva

A törzsek azonosítása miniatűr identifikációs tesztekkel és a 16S rRNS-t kódoló 16S rDNS-gének szekvencia elemzésével történt. Amint az a 8. táblázatból látható, a két módszer szignifikánsan eltérő eredményeket adott. A *Pseudomonas* törzsek azonosítása az API-tesztek esetében nemzetség szinten volt elfogadható, míg az összes többi vizsgált baktériumot a miniatűrített tesztek tévesen azonosították, ami hangsúlyozza a nem klinikai izolátumok molekuláris azonosításának szükségességét.

**8. táblázat:** A baktérium izolátumok azonosításának eredményei miniatürizált identifikációs tesztekkel és a 16S rDNS gének szekvenálásával

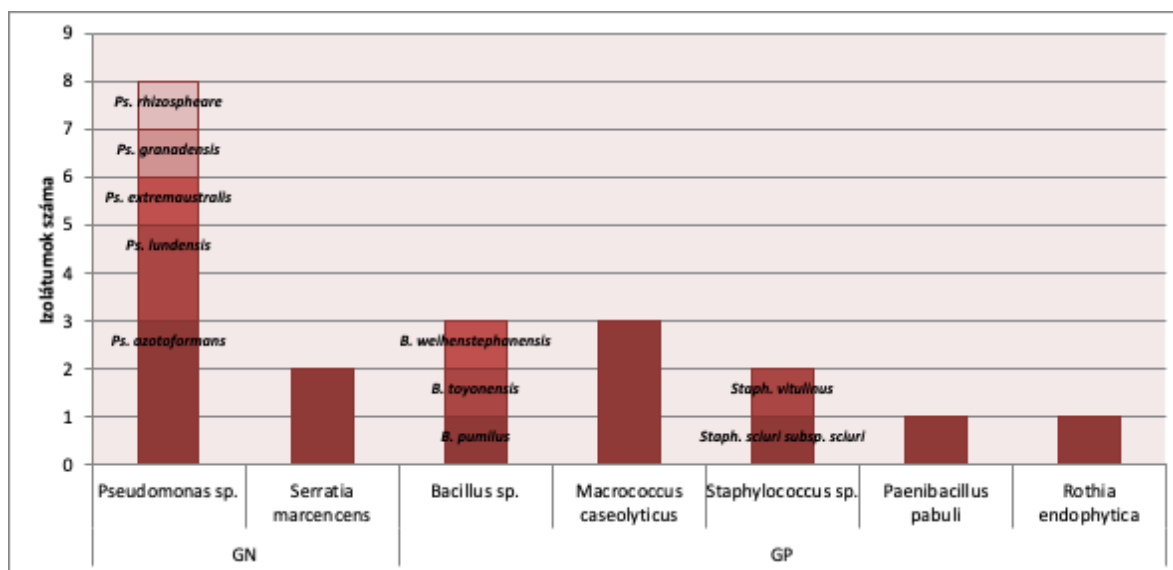
Forrás	Kód	Miniatürizált identifikációs teszt	16S rDNS szekvenálás (hasonlósági százalék)
Zöldség-feldolgozó	6/2 Z	<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	<i>Bacillus toyonensis</i> (100%)
	C2Z	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (99.91%)
Hús-feldolgozó	CP-P-2	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas azotoformans</i> (99.7%)
	CP-P-5	<i>Ps. putida</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i> (99.9%)
	CP-P-8	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Paenibacillus pabuli</i> (99.9%)
	CP-S-8	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas granadensis</i> (100%)
Tojás-feldolgozó	CSE-B-2	<i>Acinetobacter baumannii/ calcoaceticus</i>	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> (99.05%)
	CE-B-1	<i>Corynebacterium renale</i>	<i>Macrococcus caseolyticus</i> (99.8%)
	CE-PT-1	<i>Staph. kloosii</i>	<i>Rothia endophytica</i> (100%)
	CE-EJ-2	<i>Ps. putida</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i> (99.9%)
	CE-EJ-3	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> (99.81%)
	CE-EJ-4	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas azotoformans</i> (99.59%)
	CSE-T-1	<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	<i>Staphylococcus vitulinus</i> (100%)
	CSE-T-3	<i>Staph. haemolyticus</i>	<i>Macrococcus caseolyticus</i> (99.8%)
	CSE-T-4	<i>Helcococcus kunzii</i>	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)
CE-E-1	<i>Staph. haemolyticus</i>	<i>Macrococcus caseolyticus</i> (99.79%)	
Tejüzem	CM-CT-2	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas azotoformans</i> (99.52%)
	CM-SMT-1	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Staphylococcus sciuri subsp. sciuri</i> (100%)
	CSM-RMT-1	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Serratia marcescens subsp. marcescens</i> (99.5%)
	CSM-RMTII-1	<i>Aeromonas hydrophilia/caviae</i>	<i>Serratia marcescens subsp. marcescens</i> (100%)

A biokémiai tesztek eredményeit az azonosítás eredményeivel összevetve elmondható, hogy a szakirodalmi adatokkal (Götz et al., 2006) ellentétben, ahol kataláz és oxidáz pozitívként írják le a *Macrococcus* nemzetségbe és a *Staphylococcus sciuri* fajhoz tartozó baktériumokat, az általam *Macrococcus caseolyticus*-ként azonosított három izolátumból kettő (CE-B-1, CSE-T-3) oxidáz negatívnak bizonyult, és ugyanez volt megfigyelhető a *Staphylococcus sciuri* (CM-SMT-1) izolátumnál is. Ez alapján az általam izolált *Macrococcus*-ok különböznek egymástól, amit a RAPD-PCR eredményeiből készült dendrogramm is alátámaszt.

A CSE-T-4 izolátum (*Bacillus pumilus*) oxidáz negatív eredményt adott, ami Liu és Jurtschuk (1986) cikke alapján előfordulhat bizonyos *B. pumilus* törzseknél, valamint az oxidáz pozitív törzsek esetében is közel eshet az autooxidációs időpont megjelenéséhez a pozitivitást jelző színváltozás megjelenése.

Az eredményeket figyelembe véve elmondható az is, hogy a KOH-teszt alapján Gram-negatívnak tekintett CP-P-8 jelű törzs a szekvenencia analízis szerint *Paenibacillus pabuli*-ként lett azonosítva, amely azonban egy Gram-pozitív baktérium. Ezt a jelenséget már korábban Tsukatani és mtsai (2011) is megfigyelték *Paenibacillus macerans* esetében, ahol a KOH-tesztben szintén Gram-negatív eredményt mutatott az egyébként Gram-pozitív baktérium. Összegzésképpen tehát megállapítható, hogy az antagonista baktériumok fele (azaz 10 törzs) Gram-negatív volt, és a *Pseudomonas* nemzetség képviseltette magát a legnagyobb törzsszámmal, mivel összesen 8 izolátum került azonosításra *Pseudomonas*-ként. Ez összhangban van a korábbi, biokontroll törzsekkel kapcsolatos megfigyelésekkel is, mert a szakirodalomban is nagyon gyakran találkozhatunk *Pseudomonas* nemzetségből származó antagonista törzsekre vonatkozó megállapításokkal.

A molekuláris azonosítás eredményei alapján a gátló hatással rendelkező baktérium izolátumok hét különböző nemzetséghez tartoznak: *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Macroccoccus*, *Staphylococcus*, és *Rothia* (11. ábra). *Pseudomonas* törzseket már korábban is leírtak és vizsgáltak, mint potenciális biokontroll baktériumokat, (lásd 3.5.4.1.), de a többi nemzetséghez tartozó baktériumok ilyen irányú vizsgálatáról a szakirodalomban csak elvétve található leírás.



**11. ábra** A munkám során izolált antagonista izolátumok nemzetség szerinti megoszlása a 16S rDNS gének szekvenálásával kapott eredményei alapján

Korábban Földes és munkatársai (2000) izoláltak egy *Bacillus subtilis* törzset, amely képes volt nagymértékben gátolni a *L. monocytogenes* és a *S. aureus* növekedését. Egy nem-patogén

*Paenibacillus alvei* törzset vizsgálva Knolhoff és munkatársai (2015) megállapították, hogy antagonistaként viselkedik olyan, az élelmiszerekben előforduló bakteriális kórokozók ellen, mint a *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria*, *Shigella*, *Enterobacter* és *Staphylococcus*.

A *Staphylococcus* nemzetségbe tartozó baktériumok az ember és más emlősök kórokozói, élelmiszerekben is gyakran előfordulhatnak. A koaguláz-pozitív törzseket tekintik leginkább patogénnek, míg a koaguláz-negatív *Staphylococcus*-ok a bőrön fordulnak elő gyakran, azonban ezek között is vannak olyan fajok, amelyek fertőzéseket okozhatnak (Foster, 1996; Rodríguez-Sánchez et al., 2022). Cebrián és munkatársai (2020) ugyanakkor bebizonyították, hogy a *Staphylococcus xylosus* hatásos biokontroll lehet ochratoxin termelő *Penicillium nordicum* ellen.

A *Macrocooccus* nemzetség evolúciósan közeli rokonságban áll a *Staphylococcus*-okkal, azonban a *Staphylococcus*-okkal ellentétben a *Macrocooccus* fajok az állati gazdaszervezeteikre nézve avirulens baktériumoknak számítanak (Mazhar et al., 2018). Emellett a *Macrocooccus caseolyticus* baktériumot élelmiszerekben íz- és aromakialakításért felelős starterként is szokták alkalmazni (Ramos et al., 2021). A masztitist okozó *Streptococcus*-ok ellen vizsgálva bakteriocin termelést figyeltek meg *Macrocooccus caseolyticus* esetében, de további vizsgálatok szükségesek ennek meghatározására (Aldayel, 2019) Élelmiszereknél biokontrollként való használatáról nem található leírás a szakirodalomban.

Purkayastha és munkatársai (2018) bizonyították egy, a tea rizoszférájából izolált *S. marcescens* törzs növénynövekedést elősegítő és biokontroll hatását, míg a *Rothia endophytica*-t először Xiong és munkatársai (2013) izolálták egy vízi évelő gyógynövény *Dysophylla stellata* (Lour.) Benth. egészséges gyökereiből, de mint biokontroll baktériumot még nem írták le.

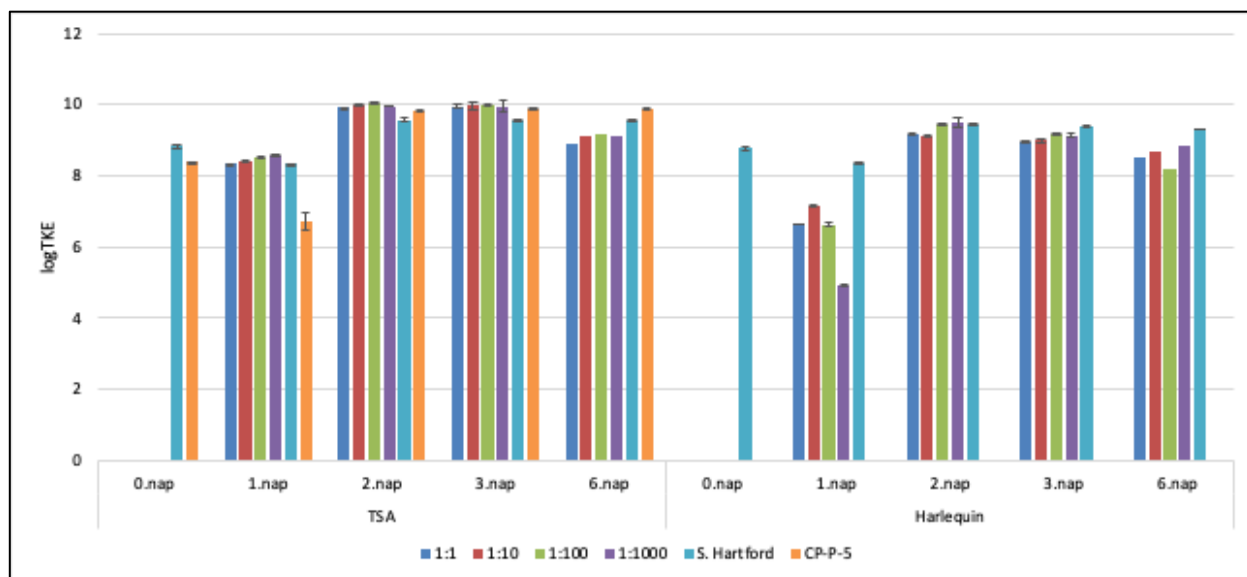
Ahhoz, hogy a munkám során izolált törzsek, vagy az általuk előállított anyagcseretermékek biokontroll mikrobákként felhasználhatók legyenek, további vizsgálatokra van szükség. Az általam is izolált *Macrocooccus caseolyticus* fajról nemrégiben megállapították, hogy antibiotikum rezisztencia géneket hordoz, amelyek, ha az élelmiszerekben is előforduló patogén baktériumokba (mint a kórokozó sztafilokokkuszok) is átjutnak, komoly humánegészségügyi problémát jelenthetnek (Ramos et al., 2021). Így a további vizsgálataim során törekedtem arra, hogy az antagonista hatással rendelkező törzseket minél átfogóbb vizsgálatoknak vessem alá a biokontrollként való felhasználhatóságuk megállapítása érdekében.



## 5.4 Együtt tenyésztéses vizsgálatok

### 5.4.1 A *Ps. lundensis* CP-P-5 törzs hatása *S. Hartford* szaporodására együtt tenyésztéses vizsgálat során

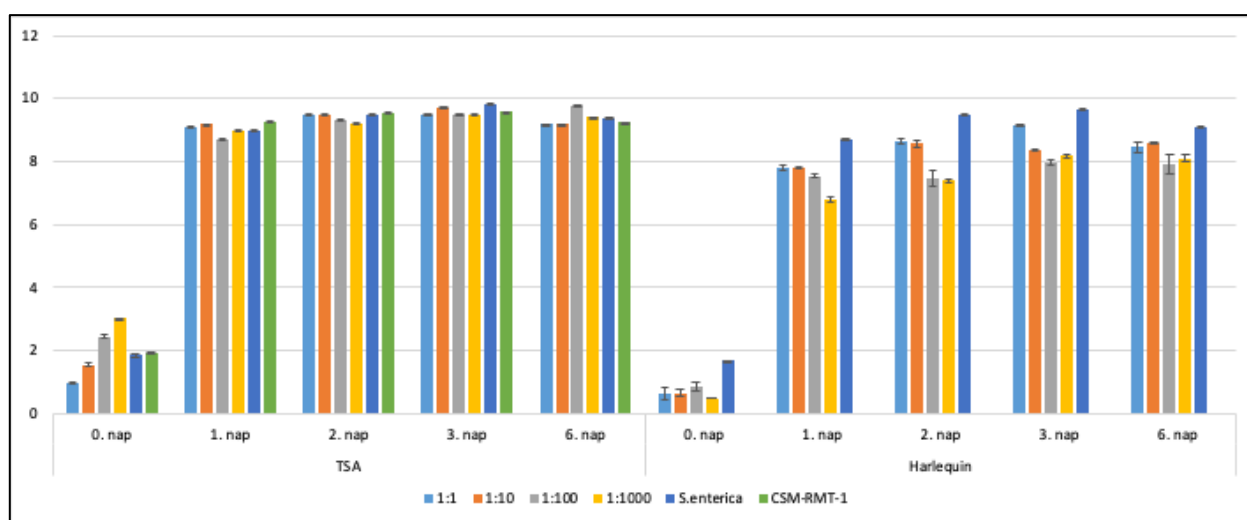
A *Ps. lundensis* CP-P-5 törzs különböző arányú sejtjeit *S. Hartford*dal együtt tenyésztve TSB levesben vizsgáltam az antagonista hatását a patogénre. A legjobb gátló hatás 24 órás inkubáció után volt megfigyelhető, és ez a gátlás akkor volt a leghatékonyabb, amikor az antagonista törzs sejtjeinek aránya 1000-szer nagyobb volt, mint a kórokozóé (12. ábra). A hatodik napi méréskor a gátló hatás jobb volt, mint a második és harmadik napon, de minden sejtszámarányban jóval gyengébbnek bizonyult, mint az első napon. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy bizonyos antagonista vegyületek az inkubáció első 24 órájában termelődnek, és később hatásuk gyengül. Ez a gátló metabolitok átalakulásának vagy lebomlásának eredménye lehet, ami koncentrációjuk csökkenését okozza. Továbbá valószínű, hogy több vegyület felelős a *Ps. lundensis* CP-P-5 gátló hatásáért, ezért változik annak erőssége, és lesz újra nagyobb az utolsó inkubációs napon megfigyelt hatás. A gátlás mértéke a kontakt inhibíciós vizsgálatban sem mutatott egyértelmű összefüggést a tenyésztési idő változásával, ami szintén a több gátló komponens vagy mechanizmus meglétét valószínűsíti.



**12. ábra** *Ps. lundensis* CP-P-5 törzs együtt tenyésztéses vizsgálatának eredménye *S. Hartford*dal TSB levesben

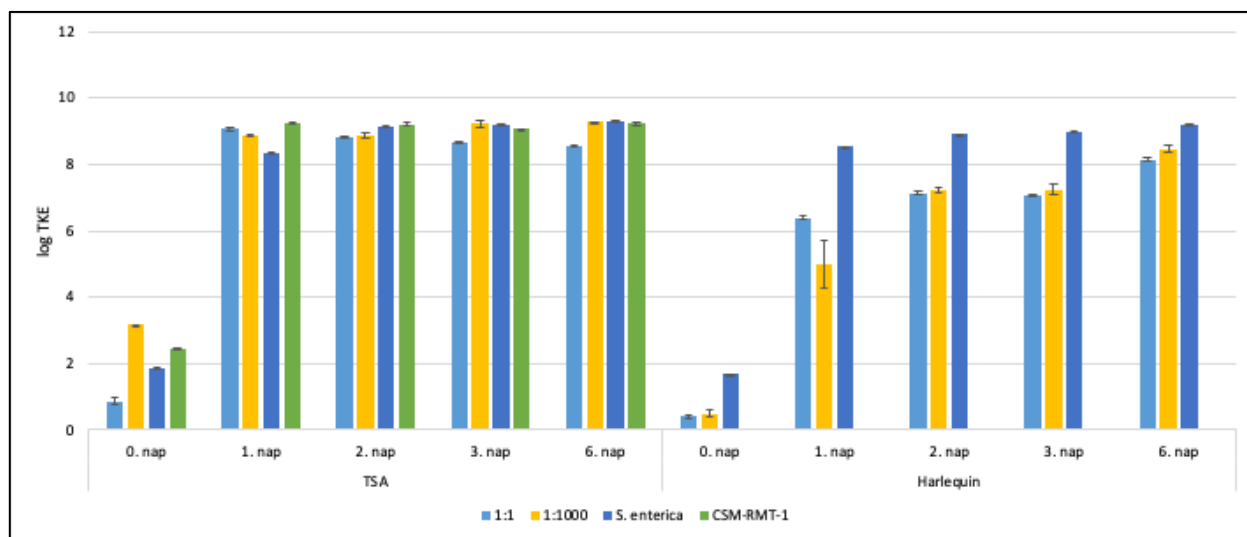
#### 5.4.2 A *S. marcescens* CSM-RMT-1 törzs hatása *Salmonella enterica* szaporodására együtt tenyésztés során

A *S. marcescens* CSM-RMT-1 antagonista hatását tojásból izolált *Salmonella enterica* (lásd 4.2.9. fejezet) ellen vizsgáltam TSB-ben és tejben együtt tenyésztéssel. A *S. marcescens* CSM-RMT-1 negatív hatással volt a kórokozó növekedésére TSB-ben, ami az 1:1000 sejtszamarány esetében volt a legnagyobb mértékű, azonban a gátlás jól látható volt mindegyik esetben. Az antagonista hatás a szalmonella számának közel két nagyságrendnyi csökkenését okozta az első nap után. Ugyanakkor az is látható, hogy a hatodik napon már nem volt szignifikáns különbség az életképes *Salmonella* sejtek számában a különböző arányban vizsgált tenyészetek között (13. ábra).



**13. ábra** *S. marcescens* CSM-RMT-1 és *Salmonella enterica* táplevesben történő együtt tenyésztésének eredményei

A tejet élelmiszer-mátrixként használva a CSM-RMT-1 jobb gátló hatást mutatott mindkét alkalmazott sejtszamarány esetén (1:1 és 1:1000), mivel a szalmonella száma legalább egy nagyságrenddel kevesebb volt, mint a táplevesben végzett kísérletben. Az inkubációs időszak alatt a kórokozó lassan újra növekedni tudott, és az utolsó napon a szalmonella számok közötti különbség az egyes keverékekben kevesebb mint egy nagyságrendnyi volt, azonban ez még mindig jelentős volt a kontroll mintához képest (14. ábra).



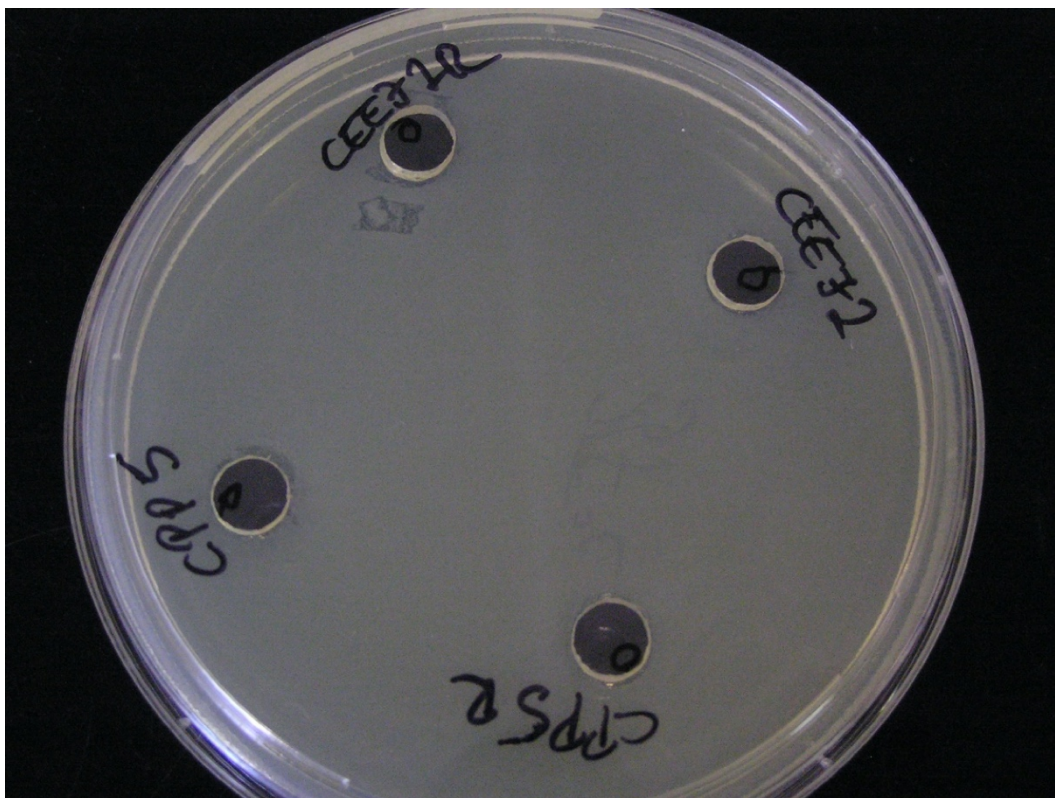
**14. ábra** *S. marcescens* CSM-RMT-1 és *Salmonella enterica* tejben való együtt tenyésztésének eredményei

Az eredmények alapján a CSM-RMT-1 bizonyos mértékben gátolni tudta a vizsgált patogén szaporodását, lassítva annak növekedését. Tejben vizsgálva ez a hatás még erőteljesebb volt, aminek oka lehet a megváltozott tápközeg mellett a tejben található antimikrobás anyagok is.

Az együtt tenyésztési vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy bár a tesztelt antagonista törzsek képesek voltak a *Salmonella* sejtek szaporodását mérsékelni, jelentős sejtcsökkentés azonban nem volt tapasztalható, illetve a gátló hatással bíró törzsek sejtjeit a patogénhez képest olyan nagy koncentrációban kellene alkalmazni, amely élelmiszerek esetében akár romlási folyamatokat is indukálhatna. Ezen megfigyeléseket alapul véve a további kísérletek során a gátló törzsek anyagcsere termékeire fókuszálva végeztem el vizsgálataimat.

### 5.5 Sejtmentes felülűzők gátló hatásának vizsgálata

A kontakt inhibíciós vizsgálatoknál gátlást mutató izolátumok sejtmentes felülűzőjének hatását a patogének szaporodására mikrotiter lemezes módszerrel megvizsgálva elmondható, hogy csak a *Y. enterocolitica* esetében volt teljes gátlás megfigyelhető. A többi patogén baktérium szaporodását nem, vagy csak részlegesen tudták gátolni a sejtmentes felülűzők (M5). Emellett agar lyukdiffúziós módszerrel is leteszteltem két *Ps. lundensis* (CP-P-5 és CE-EJ-2) törzs sejtmentes felülűzőjét *S. Hartford* ellen, azonban semmilyen gátló hatás nem volt megfigyelhető ezzel az eljárással (15. ábra), míg mikrokultúras tenyésztés során kis mértékben ugyan, de késleltetni tudták a patogén szaporodását a felülűzők (M5, I.)



**15. ábra** A *Ps. lundensis* törzsek sejtmentes felülúszóinak agar lyukdiffúziós vizsgálattal kapott eredményei *S. Hartford* ellen. (A vizsgálat során nem keletkezett feltisztulási zóna a *S. Hartford* esetén, tehát a felülúszóknak nem volt gátló hatása.)

A sejtmentes felülúszók hatásának mikrokultúrák vizsgálatánál továbbá megfigyelhető volt, hogy bizonyos esetekben a gátló hatás csak 3 napos inkubációt követően jelentkezett, míg a kontakt inhibíciós vizsgálatban a feltisztulási zónák már 1-2 napos inkubáció után láthatóak voltak. Az eredmények alapján elmondható az is, hogy a törzsek esetében megfigyelt teljes és részleges gátló hatás az agar-spot módszer esetén nem korrelált a sejtmentes felülúszók eredményeivel (9. táblázat), összességében tehát megállapítható, hogy a sejtmentes felülúszók kevésbé bizonyultak hatékonyak, mint az agar spot módszernél a sejtekkel végzett vizsgálatok. Ezek alapján arra lehet következtetni, hogy vagy nem extracelluláris metabolitok felelősek a gátló hatásért, vagy a folyékony közegben a gátló komponens nem tud olyan mértékben koncentrálni, mint a szilárd agar esetében, ahol a törzs által képzett telep körül az agarba diffundálva nagy mennyiségben van jelen a gátlásért felelős metabolit.

A kontakt inhibíciós vizsgálat során a kialakult feltisztulási zónák legtöbb esetben a vizsgálat teljes időtartama alatt fennmaradtak, míg a sejtmentes felülúszók gátló hatása nem volt kimutatható minden egyes mérési napon, emellett a gátlás megjelenése véletlenszerű volt a

hatnapos inkubáció során. Részleges gátlások több vizsgálati napon is kimutathatók voltak, azonban hat napon át tartó gátló hatást nem sikerült kimutatni. A spot módszer és a sejtmentes felülűszók eredményeit összevetve elmondható tehát, hogy a kontakt inhibíciós vizsgálat (spot módszer) esetén 4, 8, 7 és 14 izolátum tudta gátolni a *L. monocytogenes*, a *S. Hardford*, a *Y. enterocolitica* és az *E. coli* növekedését, míg ezek közül a folyadéktenyészetben - ahol az extracelluláris metabolitok hatását vizsgáltam - csak 2, 4, 3 és 13 izolátum volt negatív hatással a patogének szaporodási képességére (9. táblázat). Hasonlót figyeltek meg Pelyuntha és munkatársai (2019), akik a tejsavbaktérium-kultúrákból származó sejtmentes felülűszók hatását vizsgálták *Salmonella*-törzsekre, és megállapították, hogy a felülűszók használata esetén kevesebb izolátum őrizte meg a kórokozókkal szembeni aktivitását az agar spot teszthez képest. Feltételezték, hogy ennek hátterében a gátló anyagcseretermékek korlátozott oldhatósága áll.

**9. táblázat** Az antagonista törzseknél megfigyelt gátló hatások kontakt inhibícióval (agar spot módszerrel) és sejtmentes felülúszókat vizsgálva

Forrás	Kód	<i>Salmonella</i> Hartford		<i>Eserichia</i> <i>coli</i>		<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>		<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>		16S rDNS azonosítás eredménye
		K	F	K	F	K	F	K	F	
Zöldség- feldolgozó	6/2 Z	-		-		(+)	(+)	-		<i>B. toyonensis</i>
	C2Z	-		-				+	+	<i>B. weihenstephanensis</i>
Hús- üzem	CP-P-2	-		-		(+)	-	-		<i>Ps. azotoformans</i>
	CP-P-5	+	(+)	(+)	(+)	-		(+)	-	<i>Ps. lundensis</i>
	CP-P-8	-		-		-		(+)	+	<i>Pa. pabuli</i>
	CP-S-8	-		(+)	-	-		-		<i>Ps. granadensis</i>
Tojás- üzem	CSE-B-2	-		-		-		(+)	+	<i>Ps. rhizosphaerae</i>
	CE-B-1	-		-		-		(+)	(+)	<i>M. caseolyticus</i>
	CE-PT-1	-		-		-		+	+	<i>R. endophytica</i>
	CE-EJ-2	+	(+)	(+)	(+)	-		-		<i>Ps. lundensis</i>
	CE-EJ-3	-		(+)	(+)	+	(+)	-		<i>Ps. extremaustralis</i>
	CE-EJ-4	-		(+)	(+)	+	(+)	-		<i>Ps. azotoformans</i>
	CSE-T-1	-		-		-		(+)	+	<i>St. vitulinus</i>
	CSE-T-3	-		-		-		+	+	<i>M. caseolyticus</i>
	CSE-T-4	-		(+)	-	+	-	+	+	<i>B. pumilus</i>
	CE-E-1	-		-		-		(+)	(+)	<i>M. caseolyticus</i>
Tejüzem	CM-CT-2	+	-	+	-	+	-	(+)	(+)	<i>Ps. azotoformans</i>
	CM-SMT-1	-		-		-		+	+	<i>St. sciuri subsp. sciuri</i>
	CSM-RMT-1	(+)	-	+	-	+	-	+	(+)	<i>S. marcescens subsp. marcescens</i>
	CSM-RMTII-1	-		-		-		+	+	<i>S. marcescens subsp. marcescens</i>

(+) részleges gátlás

+

- nincs gátlás

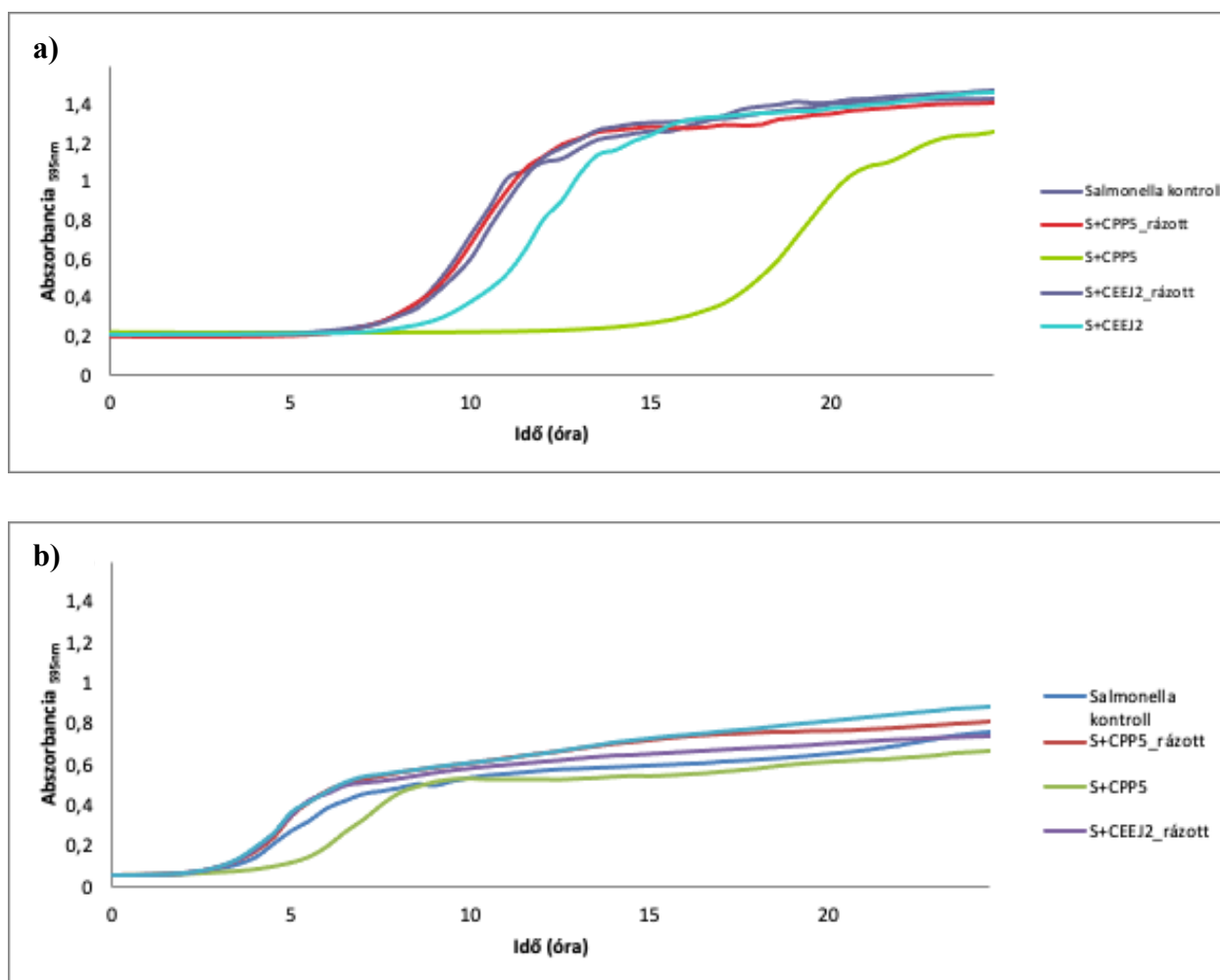
■ nem vizsgált

K kontakt inhibíciós vizsgálat

F felülúszós vizsgálat

Ahogy a spot módszernél, úgy a felülúszókkal végzett vizsgálatok során is a *Y. enterocolitica* bizonyult a legérzékenyebb patogén baktériumnak. Míg a többi patogénnél a gátló izolátumok száma lefeleződött a felülúszók hatékonyságának vizsgálatakor, addig a *Y. enterocolitica*-nál csak egy izolátum volt hatástalan az extracelluláris metabolitokat vizsgálva, és volt több olyan törzs is, amelyek felülúszója teljes gátlást volt képes elérni a 24 órás mikrotiter lemezes tenyésztés során, holott a kontakt inhibíciónál csak részleges gátlás volt megfigyelhető. Ez a

következő esetekben fordult elő: a CSE-T-1 háromnapos, a CSE-B-2 hatnapos és a CP-P-8 három és hatnapos tenyészetéből készült felülúszóknál. Ezek teljes gátló hatással rendelkeztek, szemben a spot módszernél az agar felületén megfigyelt részleges gátlással. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy nem csak egy metabolit felelős a gátló hatás kialakulásáért, hanem több komponens vesz részt az inhibícióban.



**16. ábra** Egynapos tenyésztést követően előállított sejtmentes felülúszók gátló hatása *S. Hartford* ellen különböző tápközegekben történő tenyésztés után. Tenyésztés (a) TSB táplevesben és (b) TGE táplevesben.

Belák és Maráz (2015) megfigyelték, hogy különböző tenyésztési körülményeket alkalmazva a *L. monocytogenes* ellen hatékony *Pseudomonas sp.* antagonista törzs esetén eltérő gátló hatás volt kimutatható, ezért munkám során megvizsgáltam egy másik, általánosan alkalmazott táplevesben (TGE-ben) nem statikus körülmények között tenyésztett *Ps. lundensis* törzsek (CP-P-5 és CE-EJ-2) sejtmentes felülúszójának hatását *S. hartford* ellen. Ezen vizsgált törzsek

esetében elmondható, hogy sem a TGE tápközeg, sem a rázatott tenyésztés nem segítette elő a gátló komponens termelődését, sőt, a korábban megfigyelt gátló hatás sem volt olyan mértékű, mint a statikus körülmények között, TSB-ben tenyésztett sejtek esetén készült felülűszók vizsgálatakor (16. ábra).

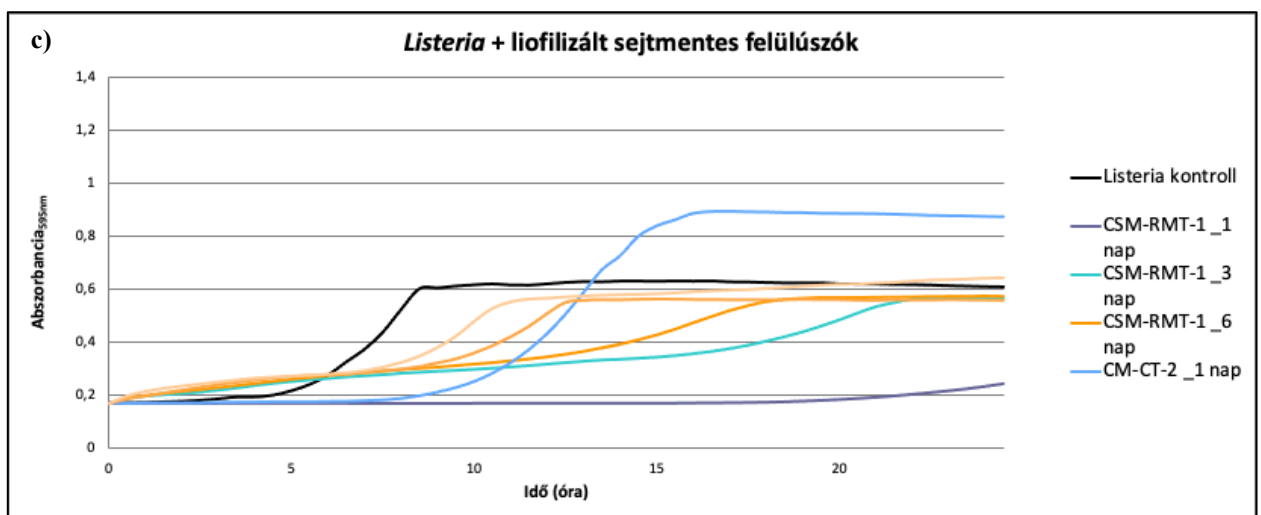
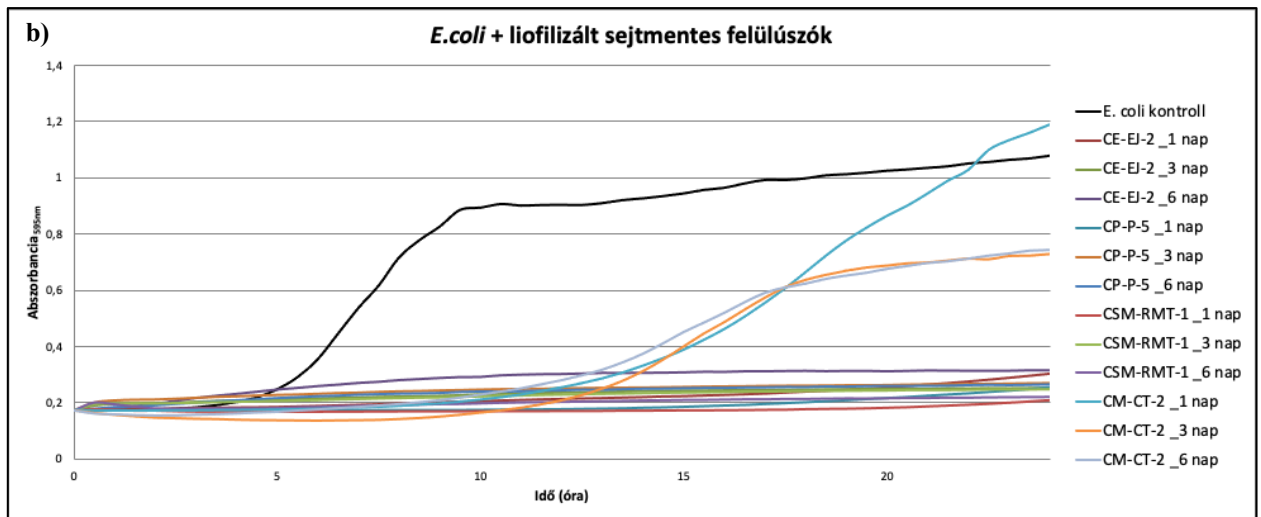
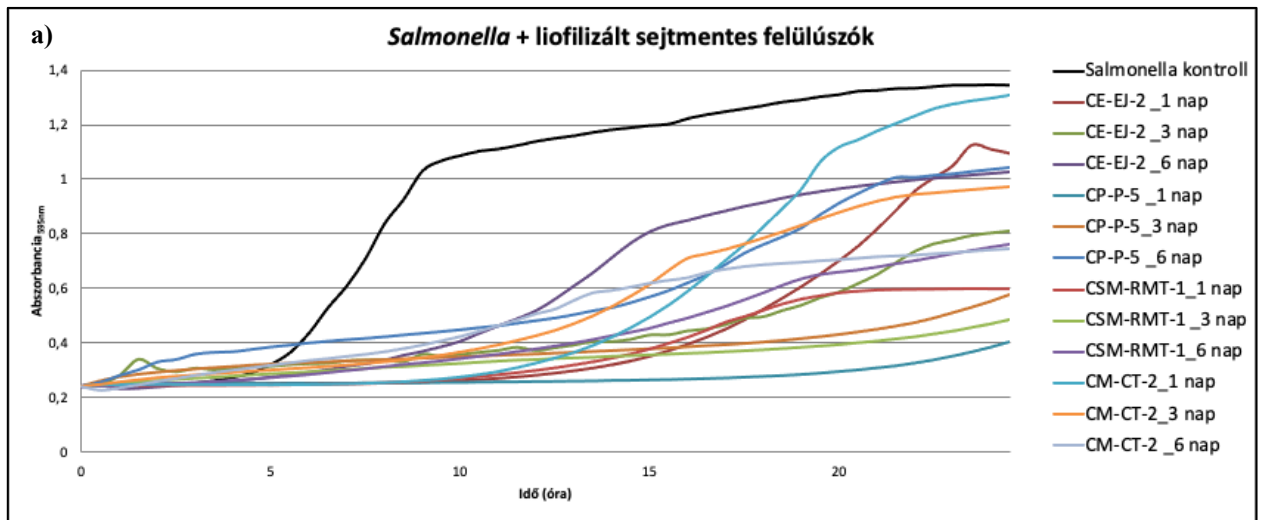
A gátló hatások megfigyelésére irányuló vizsgálatok alapján négy törzs került kiválasztásra a további kísérletek elvégzéséhez. Ezeknek volt mind a kontakt inhibíciós tesztek, mind a felülűszós vizsgálatok során a legerősebb és/vagy legtöbb patogén ellen hatásos gátlóanyag termelése. Ezen törzsek az alábbiak voltak:

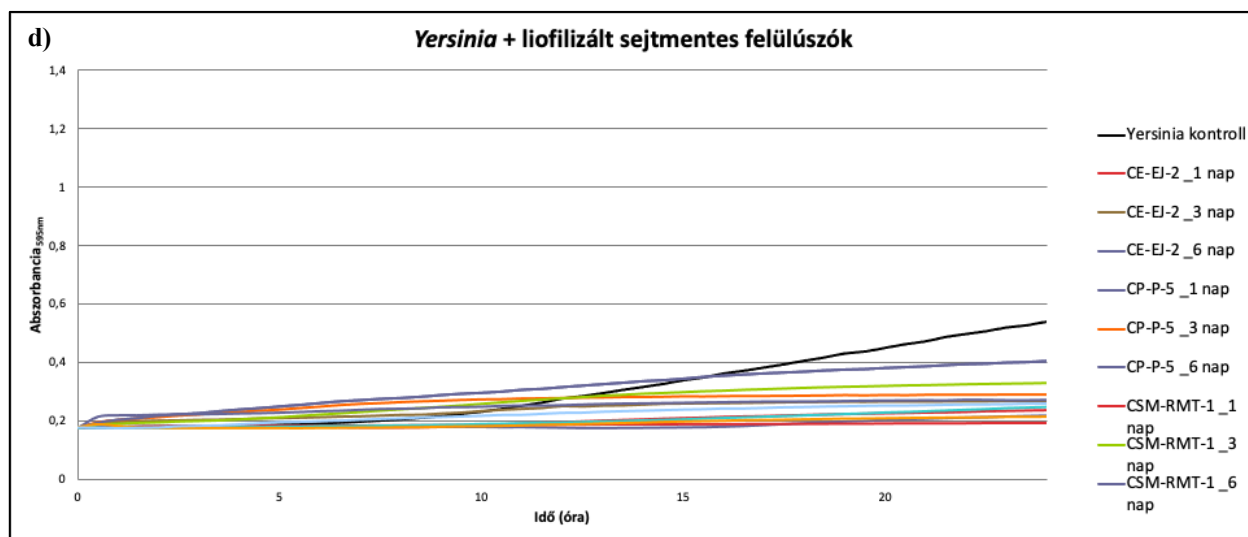
- *Pseudomonas lundensis* CP-P-5
- *Serratia marcescens subsp. marcescens* CSM-RMT-1
- *Pseudomonas lundensis* CE-EJ-2
- *Pseudomonas azotoformans* CM-CT-2.

## **5.6 Koncentrált sejtmentes felülűszók gátló hatásának vizsgálata**

A sejtmentes felülűszók gátló hatás vizsgálatának eredményei alapján valószínűsíthető volt, hogy a gátló komponensek folyékony tápközegben nem tudnak megfelelően koncentrálni, így liofilizálással próbáltam töményebb felülűszókat létrehozni. A liofilizálással koncentrált felülűszók hatásának eredményei (17. ábra) is ezt támasztották alá, ugyanis a 10-szeres koncentrátumok sokkal hatékonyabban voltak képesek a patogének szaporodását visszaszorítani. Mindebből arra lehet következtetni, hogy extracelluláris metabolit(ok) felelős(ek) a gátló hatásokért. Emellett az így jobban látható gátló hatásokról az is elmondható, hogy leghatékonyabbnak az egy- és a háromnapos tenyészetek felülűszói bizonyultak, kivéve a CM-CT-2 jelű *Ps. azotoformans* törzsnél. Itt az egynapos felülűszó gátló hatása csak a 24 órás tenyésztési idő első felében volt nagyobb, mint a három és hatnapos tenyészetekből készült felülűszóknak, majd később megközelítette a kontroll patogének szaporodási görbéit, vagy akár túl is nőtt rajtuk.







**17. ábra** Liofilizálással koncentrált sejtmentes felülűszók gátló hatás vizsgálatának eredményei (a-d)

A vizsgált *S. Hartford* ellen a leghatásosabbnak a *Ps. lundensis* CP-P-5 egynapos, és a *S. marcescens* CSM-RMT-1 háromnapos tenyészetéből készült felülűszója bizonyult, ezt követte a CP-P-5 háromnapos és a CSM-RMT-1 egynapos tenyészetéből készült felülűszó.

*E. coli* ellen a CM-CT-2-es jelű *Ps. lundensis* kivételével minden vizsgált felülűszó erős gátló hatást mutatott, azonban a CM-CT-2 mindhárom tenyésztési napon készült felülűszója is részleges gátló hatású volt.

A vizsgált *Listeria* törzs ellen a CSM-RMT-1 egynapos tenyészetéből nyert felülűszója rendelkezett a legerősebb gátló hatással, a többi vizsgált felülűszó csak részleges hatást mutatott, ám a nem koncentrált felülűszókhöz képest így is nagyobb mértékű volt a gátlás valamennyi esetben.

A *Y. enterocolitica* ellen leghatásosabbnak a CSM-RMT-1 egynapos tenyészetéből nyert felülűszója mutatkozott, még ezt követték a CM-CT-2 és CP-P-5 egynapos tenyészetéből származó felülűszók, de lényegében az összes vizsgált felülűszó szinte teljesen gátolta a szaporodását. Így ebben a vizsgálatban is ez a patogén bizonyult a legérzékenyebbnek, hasonlóan a korábban megfigyelt eredményekhez.

Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a sejtmentes felülűszókban jelenlévő extracelluláris metabolitok jó gátló hatást képesek elérni a vizsgált patogénekkal szemben, ha megfelelően koncentrált formában vannak alkalmazva.

## 5.7 Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

Eddigi eredményeim alapján megállapítható, hogy az antagonista törzsek esetében a patogének elleni legjelentősebb gátló hatás a koncentrált sejtmentes felülúszók esetében volt kimutatható. Ezek a kivonatok ugyan nem tartalmazzák a baktérium sejteket, de előfordulhat, hogy a sejtszuszpenzióban lizált sejtek is megtalálhatók, amelyek genetikai anyaga a szűrletbe kerülhet. Ezen extracelluláris DNS molekulák így részt vehetnek természetes rekombinációs folyamatokban is, amelynek következtében az esetlegesen antibiotikum rezisztenciával rendelkező gátló törzsek szerepet játszhatnak az ellenálló képesség továbbadásában. Ennek vizsgálata érdekében 11 antibiotikummal szembeni érzékenységet teszteltem le a négy kiválasztott törzsnek. A vizsgálat eredményei a 10. táblázatban láthatóak. Bár feltisztulási zóna megfigyelhető volt az alábbi esetekben, az EUCAST Breakpoint táblázata alapján meropenemre és ceftadizimere rezisztensnek bizonyult mind a három *Pseudomonas* törzs. Imipenem esetében csak a CM-CT-2-es törzs értéke esik a rezisztens tartományba. Az EUCAST ajánlása szerint chloramphenicol, erythromycin és norfloxacin nem alkalmas szisztémás fertőzések kezelésére *Pseudomonas* spp. esetén, ezért töréspontot sem határoz meg rájuk, míg a naldixinsav a nem alkalmazandó kategóriában szerepel.

*S. marcescens*-ről nem tartalmaz az EUCAST táblázata zóna átmérő adatokat, így a CSM-RMT-1-es törzs esetén nem rendelhető az értékekhez az egyes (rezisztens, átmeneti vagy érzékeny) kategóriák.

**10. táblázat** Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat eredményei. A mért feltisztulási zónák mm-ben vannak megadva.

Támadáspont	Antibiotikum	CE-EJ-2 <i>Ps. lundensis</i>	CP-P-5 <i>Ps. lundensis</i>	CM-CT-2 <i>Ps. azotoformans</i>	CSM-RMT-1 <i>S. marcescens</i> <sup>1</sup>	<Rezisztens <sup>3</sup>	Átmeneti <sup>3</sup>	≥Érzékeny <sup>3</sup>
Sejtfalszintézis gátlás (β-laktám)	meropenem	16	15	0	17	18	18-23	24
	piperacillin	30	27	32	28	18	18-49	50
	ceftadizime	13	9	0	23	17	17-49	50
	imipenem	34	33	12	26	20	20-49	50
citoplazma membrán	kolisztin-szulfát	17 <sup>1</sup>	18 <sup>1</sup>	16 <sup>1</sup>	19	-	-	-
fehérjészintézis (30S)	amikacin	29	29	28	21	15	-	15
fehérjészintézis (50S)	kloramfenikol	10 <sup>1</sup>	12 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	29	-	-	-
	eritromicin	0 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>	0	-	-	-
DNS-giráz	nalidixinsav	18 <sup>2</sup>	18 <sup>2</sup>	14 <sup>2</sup>	26	-	-	-
	norfloxacin	41 <sup>1</sup>	42 <sup>1</sup>	40 <sup>1</sup>	37	-	-	-
	ciprofloxacim	30	40	40	43	26	26-49	50

érzékeny

átmeneti tartományba esik

rezisztens

<sup>1</sup>nincs hozzá töréspont meghatározva

<sup>2</sup>nem alkalmazandó adott mikroorganizmus esetében

<sup>3</sup>Referencia töréspont tartományok *Pseudomonas*-oknál

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok alapján mindhárom *Pseudomonas* törzs esetében tapasztalható volt több antibiotikummal szemben is rezisztencia. Ezek az antibiotikumok elsősorban a  $\beta$ -laktámok voltak, azonban a zónák méreteit figyelembe véve valószínűsíthető, hogy a két, az 50S riboszóma alegységre ható, fehérjeszintézist gátló antibiotikummal szemben is ellenállók ezek a törzsek.

Az EUCAST táblázata elsősorban humán megbetegedésekhez kapcsolódó baktériumok adatait tartalmazza, és például a *S. marcescens* sem szerepel benne, így a korongdiffúziós vizsgálat eredményeinek összevetésére a CSM-RMT-1 törzs esetében nincs lehetőség. Ugyanakkor figyelembe véve a viszonylag nagy zónaméreteket a vizsgált antibiotikumok esetén elmondható, hogy a törzs feltételezhetően csak az erythromycinnel szemben rezisztens.

Összességében megállapítható, hogy az antagonista törzsek rendelkeznek bizonyos fokú ellenálló képességgel sejtfal- és fehérjeszintézist gátló antibiotikumokkal szemben, azonban annak megállapítására, hogy a tenyésztési idő során milyen arányban pusztulnak el a sejtek, azokból milyen mennyiségű DNS szabadul ki, és azok mennyire stabilak a környezetben, további vizsgálatok elvégzése lenne szükséges. Feltételezhető azonban, hogy a 24 órás inkubálás során még nem indul meg a sejtek jelentős lízise, és a környezetben jelenlévő nukleázok is hozzájárulnak az extracelluláris DNS-ek gyorsabb lebomlásához, azonban mindenképp érdemes lenne olyan kísérleteket is elvégezni, amelyek a kiszabadult DNS-ek horizontális géntranszferben való részvételüket megerősíti vagy elveti.

## **5.8 A kiválasztott antagonista törzsek gátló hatásának vizsgálata tojásporból izolált *Salmonella enterica*-k ellen**

Az antagonista törzsek gátló hatását négy, tojáspor minták élelmiszerbiztonsági vizsgálata során izolált *S. enterica* (11. táblázat) esetén is megvizsgáltam. A *Salmonella* törzsek izolálása tojásporból történt szelektív tenyésztést követően, majd szekvenálással történő molekuláris biológiai azonosításukat is elvégeztem. Ennek eredménye a 11. táblázatban látható.

Ebben a vizsgálatban a négy kiválasztott antagonista törzsnek, a *Ps. lundensis* CP-P-5 és CE-EJ-2-nek, a *Ps. azotoformans* CM-CT-2-nek, illetve a *S. marcescens* CSM-RMT-1-nek vizsgáltam meg az öt *Salmonella* (a 4 izolátum és a *S. Hartford*) elleni gátló hatását, így a rendelkezésemre álló valamennyi *Salmonella* nemzetségbe tartozó patogént egymás mellett tudtam tesztelni.

**11. táblázat** Tojásporból izolált kórokozók azonosításának eredményei

Eredet	Kód	16S rDNS azonosítás eredménye
Tojáspor	S1	<i>Salmonella enteritica subsp. enteritica</i> (99%)
	S2	<i>Salmonella enteritica subsp. enteritica</i> (99%)
	S3	<i>Salmonella enteritica subsp. enteritica</i> (99%)
	S4	<i>Salmonella enteritica subsp. enteritica</i> (99%)

A CP-P-5, CE-EJ-2, CM-CT-2, és CSM-RMT-1 jelű törzsek tesztelése a *Salmonella*-k ellen agar spot módszerrel hasonló eredményeket hozott, mint a *S. Hartford*-nál korábban is tapasztalt eredmények. Mind a négy újonnan izolált szalmonellát legalább részben gátolta a négy antagonista törzs 15 °C és 20 °C esetén, és nem volt nagy különbség a *Salmonella* törzsekre (S1, S2, S3, S4) gyakorolt gátló hatsok között. A gátlási zónák 24 óra elteltével jelentek meg, és a hatnapos inkubáció végére a kórokozók nem tudtak túlszaporodni az antagonistákon (12. táblázat).

12. táblázat Izolátumok gátló hatása kontakt inhibíciós vizsgálat során Salmonella-k ellen

Izolátum	Salmonella Hartford 1 nap								SI 1 nap								S2 1 nap								S3 1 nap								S4 1 nap															
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C								
CM-CT-2	0	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0					
CSM-RMT-1	0	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-					
CP-P-5	n	-	-	+	+	-	-	0	-	-	-	+	+	-	0	0	-	-	-	+	+	-	0	0	n	-	-	+	+	-	0	0	n	-	-	+	+	-	0	0	n	-	-	+	+	-	0	0
CE-EJ-2	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	n	-	-	-	-	-	-	0	-					
Izolátum	Salmonella Hartford 2 nap								SI 2 nap								S2 2 nap								S3 2 nap								S4 2 nap															
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C								
CM-CT-2	-	(+)	(+)	(+)	-	-	0	0	-	-	(+)	-	-	-	0	0	-	-	(+)	(+)	(+)	-	0	0	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	0								
CSM-RMT-1	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-								
CP-P-5	-	(+)	+	+	(+)	-	-	0	-	(+)	(+)	+	+	-	0	0	-	(+)	+	+	(+)	-	0	0	-	-	+	+	-	-	-	0	-	-	+	+	+	-	-	-								
CE-EJ-2	-	-	(+)	(+)	-	-	-	0	-	-	+	+	-	-	0	0	-	-	(+)	+	-	-	0	0	-	-	(+)	+	-	-	-	0	0	-	-	(+)	+	-	-	-	-							
Izolátum	Salmonella Hartford 3 nap								SI 3 nap								S2 3 nap								S3 3 nap								S4 3 nap															
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C								
CM-CT-2	-	(+)	(+)	(+)	-	-	0	0	-	-	(+)	(+)	-	-	0	0	-	-	(+)	(+)	-	-	0	0	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	0								
CSM-RMT-1	0	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	0	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-								
CP-P-5	-	(+)	+	+	(+)	-	-	0	-	(+)	(+)	(+)	+	-	0	0	-	(+)	+	+	(+)	-	0	0	-	+	+	+	+	-	-	0	-	+	+	+	+	-	-	-								
CE-EJ-2	n	(+)	(+)	(+)	-	-	-	0	-	(+)	(+)	(+)	+	-	0	0	-	(+)	(+)	(+)	-	-	0	0	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	0	0	-	(+)	(+)	+	-	-	-	-							
Izolátum	Salmonella Hartford 6 nap								SI 6 nap								S2 6 nap								S3 6 nap								S4 6 nap															
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C								
CM-CT-2	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	(+)	-	-	-	0	-	-	-	(+)	(+)	-	-	0	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	0							
CSM-RMT-1	0	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	0	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-								
CP-P-5	-	+	+	+	(+)	-	-	0	-	(+)	+	+	+	-	0	0	-	(+)	+	+	+	-	0	0	-	(+)	+	+	+	-	-	0	-	+	+	(+)	(+)	-	-	-								
CE-EJ-2	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	0	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	0	0	-	(+)	(+)	(+)	-	-	0	0	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	0	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-						

- + teljes gátlás
- (+) részleges gátlás
- nincs gátlás
- 0 nem nőtt az izolátum

Ennek a vizsgálatnak az eredményei alapján elmondható, hogy a vizsgált antagonista törzsek mind az öt tesztelt szalmonellát képesek voltak gátolni, ami arra enged következtetni, hogy általános gátló hatással rendelkeznek, ugyanakkor az újonnan izolált *Salmonella enterica* baktériumoknak sem a szerotipizálása, sem a molekuláris karakterizálása nem történt meg, így törzsekre vonatkozó következtetéseket nem lehet levonni.

### **5.9 Celofános módszerrel meghatározott gátló hatás eredményei**

A vizsgálat célja kettős volt: egyrészt azt szerettem volna megvizsgálni, hogy az antagonista törzsek képesek-e a gátlásért felelős metabolitot a patogén mikroorganizmus jelenléte nélkül is kellő mennyiségben megtermelni szilárd tápközegben, másrészt hogy elegendő-e csak a metabolit jelenléte a gátláshoz (hasonlóan a sejtmentes felülúszók vizsgálatához), vagy az antagonista sejtek is szükségesek az inhibícióhoz.

A vizsgálat eredményei a 13. táblázatban láthatóak. Mindegyik inkubációs napon jól megfigyelhető volt a gátló hatás az agar felületén 20, 25 és 30 °C-on, azonban a 15 °C-os tenyésztés ennél a módszernél nem segítette elő a gátló hatás kialakulását. A *Y. enterocolitica* itt is a legérzékenyebb patogén baktériumnak bizonyult, az első két tenyésztési napon csak a magasabb hőmérsékleteken (25-30 °C) szaporodott.



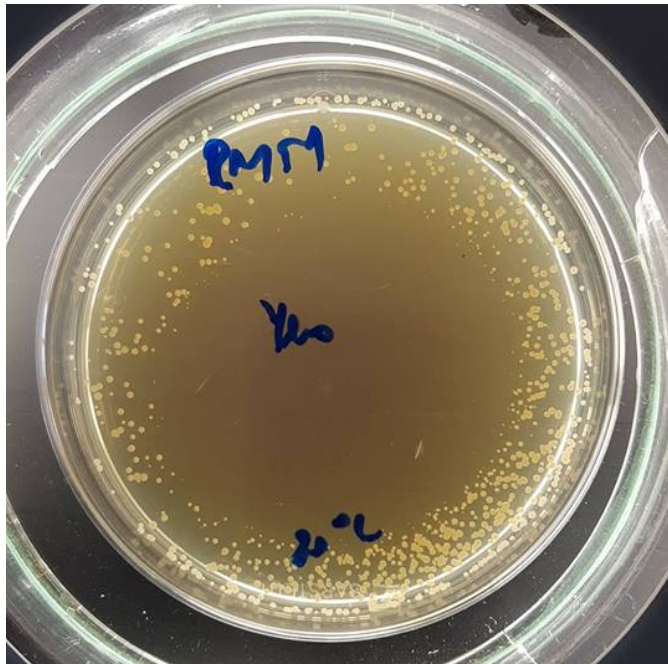
**13. táblázat** Az antagonista törzsek gátló hatása celofános vizsgálat során különböző hőmérsékleteken tesztelve

1 nap																
Izolátum	<i>S. Hartford</i>				<i>E. coli</i>				<i>L. monocytogenes</i>				<i>Y. enterocolitica</i>			
	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C
CP-P-5		+	(+)	-		+	+	(+)							+	+
CM-CT-2		+	(+)	+		+	+	(+)				+				+
CSM-RMT-1		+	(+)	(+)		+	+	+		-	+	+				+
CE-EJ-2		+	+	(+)		+	(+)	(+)								
2 nap																
Izolátum	<i>S. Hartford</i>				<i>E. coli</i>				<i>L. monocytogenes</i>				<i>Y. enterocolitica</i>			
	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C
CP-P-5		+	+			+	+	(+)							+	+
CM-CT-2		+	+	+		+	+	+		-	+	+			+	+
CSM-RMT-1		+	+	+		+	+	+		+	+	+			+	+
CE-EJ-2	-	(+)	+	(+)	-	(+)	-	-								
6 nap																
Izolátum	<i>S. Hartford</i>				<i>E. coli</i>				<i>L. monocytogenes</i>				<i>Y. enterocolitica</i>			
	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C
CP-P-5	-	(+)	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)						+	(+)	(+)
CM-CT-2	-	+	(+)	+	-	(+)	+	+	-	(+)	+	(+)		+	+	+
CSM-RMT-1	-	+	(+)	(+)	-	+	+	+	-	+	+	+		+	+	(+)
CE-EJ-2	-	(+)	(+)	(+)	-	+	(+)	(+)								

+	részleges gátlás
(+)	teljes gátlás
-	nincs gátlás
	nem nőtt a patogént
	nem vizsgált

Az inkubációs idő letelte után az agar azon pontjain, ahová korábban a celofánt helyeztem és az antagonista baktériumok sejtei növekedtek, a kórokozók látható feltisztulási zónái voltak megfigyelhetők (18. ábra). Ebből arra lehet következtetni, hogy az antagonista törzsek a tenyésztésük során a gátló vegyületeket a gátolandó kórokozó jelenléte nélkül is megtermelték, azaz nem indukált vegyületek. A metabolitok ezen felül a celofánrétegen keresztül is képesek voltak az agarba diffundálni, amely jelenség alátámasztja azt a feltételezést, hogy a gátló vegyületek extracelluláris anyagok, továbbá a termelő törzsek elsődleges metabolitjai, mert a 24 órás tenyésztés során kellő mennyiségben választódtak ki a megfelelő gátló hatás eléréséhez.

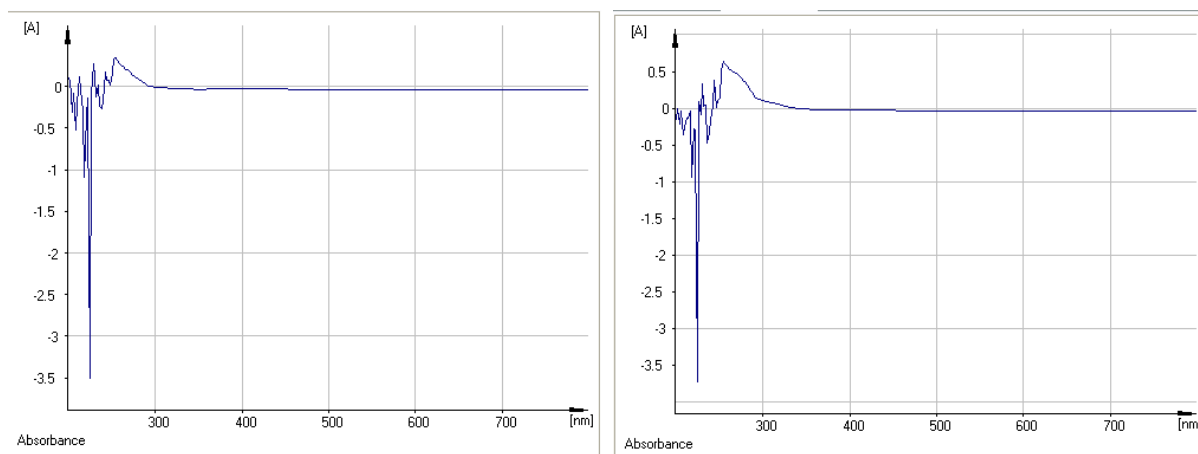


**18. ábra** *S. marcescens* CSM-RMT-1 törzs *Y. enterocolitica* elleni gátló hatása során látható feltisztulási zóna celofános vizsgálatot követően

## **5.10 A gátló hatású komponens jellemzése és meghatározása érdekében végzett vizsgálatok eredményei**

### 5.10.1 UV spektrumok analízise a celofános vizsgálatból kinyert agar darabok esetén

A celofános tenyésztési módszerrel készített agarból kivágott szeletek spektrumelemzése nem adott értékelhető eredményeket. Egyik görbén sem voltak csúcsok, amelyek utalhattak volna az antagonista hatásért felelős vegyületek kémiai tulajdonságára, ezért ezzel a módszerrel nem tudtam jellemezni a gátló vegyületeket (19. ábra). Az eredmények alapján elmondható, hogy valószínűleg nem volt hatékony az extrakció, és így nem jutott át gátló komponens az oldószerekbe, amely a spektrumok felvételek során eltérést eredményezett volna az oldószerek spektrumaihoz viszonyítva.

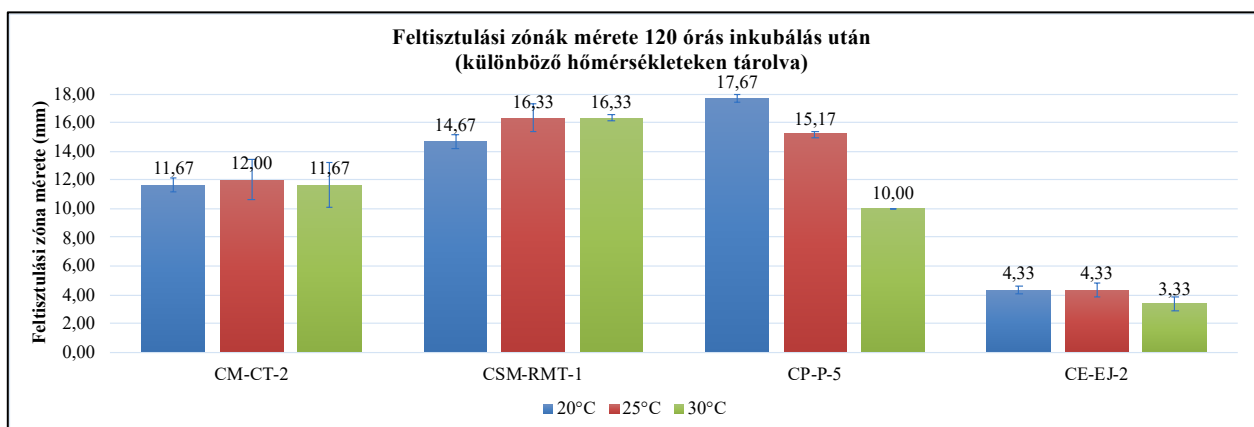
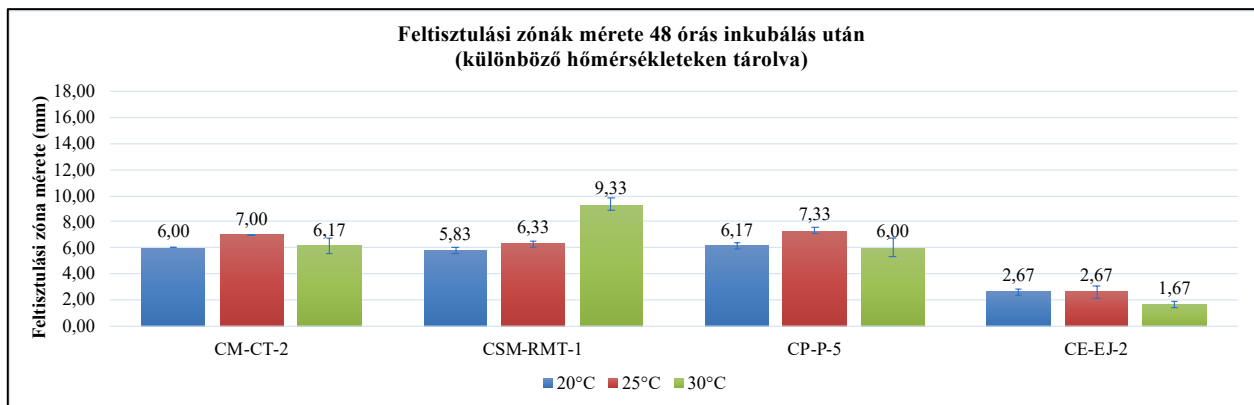
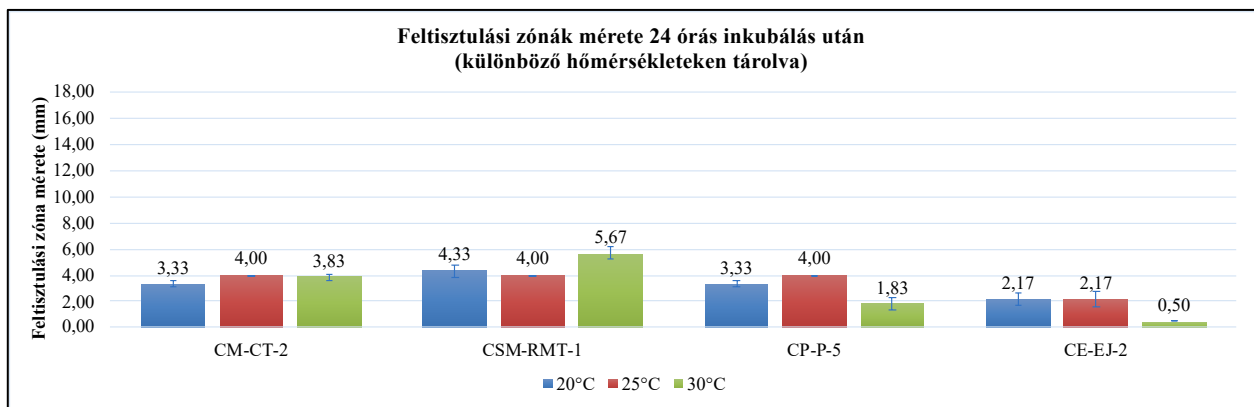


**19. ábra** Kloroform (balra) és kloroformmal extrahált agar szelet (jobbra) UV spektruma

### 5.10.2 Proteáz aktivitás vizsgálatának eredményei

Az összes gátló hatású törzs proteáz enzim aktivitása meghatározásra került, amelynek eredményeit a melléklet 6. táblázatában (M6) foglaltam össze. Összességében elmondható, a *Ps. rhizosphaerae* CSE-B-2 törzs kivételével mindegyik antagonista baktérium rendelkezett valamilyen mértékű proteáz aktivitással, és az inkubációs idő előrehaladtával a feltisztulási zóna mérete is növekedett a tejporos agarokon, azaz nőtt az enzimaktivitás mértéke. Ezek alapján feltételezhető, hogy az izolátumok gátló hatásában szerepet játszhat a proteáz aktivitásuk is, azonban a növekvő proteolitikus aktivitással párhuzamosan növekvő gátló hatásra is számítani lehetne. A kontakt inhibíciós vizsgálatok során megfigyelt eredmények azonban nem erre utalnak, ott ugyanis a gátló hatás nem növekedett egyértelműen az inkubációs napok és a hőmérsékletek növekedésével. Jellemzően a kisebb hőmérsékleteken és a rövidebb (1-3 napos) inkubációk során voltak erősebb gátló hatások megfigyelhetők.

A legjobb gátló hatással bíró törzsek (CP-P-5, CE-EJ-2, CM-CT-2, CSM-RMT) proteáz vizsgálata során leolvasott feltisztulási zónák változása a 20. ábrán látható. Mind a négy törzs rendelkezett valamekkora proteáz aktivitással, azonban a két *Ps. lundensis* (CP-P-5, CE-EJ-2) törzs közül a CE-EJ-2 enzimaktivitása elmaradt a többitől. Az eredmények alapján elmondható, hogy a proteáz aktivitást a tenyésztési hőmérséklet kevésbé, míg az inkubációs idő nagyobb mértékben befolyásolta.



**20. ábra** Proteáz aktivitás hatására mért feltisztulási zónák mérete tejporos TGE agaron 1, 2 és 5 napos inkubációs idő után három eltérő hőmérsékleten

### 5.10.3 Gátló hatás vizsgálata különböző pH értékek mellett

Annak megfigyelésére, hogy a pH befolyásolja-e az antagonista törzsek gátló tulajdonságát a vizsgált élelmiszerpatogén baktériumokkal szemben, különböző pH-értékű agarlemezekon végeztem el újabb kontakt inhibíciós (agar spot módszer) vizsgálatokat. Az eredmények (14. táblázat) azt mutatták, hogy a *S. Hartford* és az *E. coli* esetében a kisebb pH-értékek (4, 5, 6) kisebb hőmérséklettel (20 °C) kombinálva erősebb gátló hatással voltak a vizsgált kórokozók

növekedésére, mint a kontakt inhibíciós agar spot módszernél az megfigyelhető volt. Nagyobb pH-értékek és hőmérséklet (30 °C) esetén – amelyek optimálisabbak a kórokozók számára – a gátló hatás csak részleges volt, vagy el is tűnt. A *L. monocytogenes* esetében a *Ps. azotoformans* CM-CT-2 törzsnél a kisebb pH-értékek (5, 6) kisebb hőmérséklettel (20 °C) kombinálva segítették a gátló hatás kialakulását, míg a *S. marcescens* CSM-RMT-1 gátló hatását nem befolyásolták a megváltozott környezeti paraméterek. A *Y. enterocolitica* esetében a kis pH (4, 5, 6) és hőmérséklet (20 °C) elegendőnek bizonyult a növekedés gátlásához, mivel a kórokozó nem tudott növekedni a kontroll lemezeken sem. 30 °C és nagyobb pH (7, 8, 9) esetén a *Y. enterocolitica* gátlása a *Ps. lundensis* CP-P-5 esetében csak részleges volt, a többi izolátum azonban teljesen képes volt gátolni a szaporodását (21. ábra).

Az eredmények alapján elmondható, hogy a biokontroll törzsek, ha különböző ökológiai tényezők (pH, hőmérséklet) kombinációja mellett vizsgáljuk a hatásukat, jelentősebb mértékben képesek a patogének visszaszorítására. Ezek alapján akár a gát-technológia egyik elemeként a biokontroll vegyületként alkalmazható anyagcseretermékeknek még szélesebb felhasználási köre lehetséges, mint kíméletes tartósító eljárás, ahogy az a szakirodalomban is olvasható, más tartósító eljárásokkal kombinálva a biokontroll még szélesebb körben felhasználható lehet (Castellano et al., 2017; Mogren et al., 2018).

14. táblázat A pH hatása a gátlásra különböző hőmérsékleteken

<i>Salmonella</i> Hartford							
		pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
20°C	CP-P-5	+	+	+	(+)	(+)	(+)
30°C		(+)	(+)	(+)	(+)	-	-
20°C	CM-CT-2	0	(+)	-	(+)	-	-
30°C		0	-	-	-	-	-
20°C	CSM-RMT-1	+	-	(+)	(+)	-	-
30°C		(+)	(+)	(+)	-	-	-
20°C	CE-EJ-2	+	-	-	-	-	-
30°C		-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>							
		pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
20°C	CP-P-5	+	+	+	(+)	(+)	(+)
30°C		(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)
20°C	CM-CT-2	0	(+)	(+)	(+)	-	-
30°C		0	(+)	(+)	-	-	-
20°C	CSM-RMT-1	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
30°C		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
20°C	CE-EJ-2	(+)	(+)	(+)	-	-	-
30°C		-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>							
		pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
20°C	CP-P-5	-	-	-	-	-	-
30°C		-	-	-	-	-	-
20°C	CM-CT-2	0	(+)	(+)	(+)	-	-
30°C		-	-	-	-	-	-
20°C	CMSM-RMT-1	-	+	+	+	+	+
30°C		+	+	+	+	+	+
20°C	CE-EJ-2	-	-	-	-	-	-
30°C		+	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>							
		pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
20°C	CP-P-5				-	-	-
30°C					(+)	(+)	(+)
20°C	CM-CT-2				-	-	-
30°C					+	+	+
20°C	CSM-RMT-1				-	-	-
30°C					+	+	+
20°C	CE-EJ-2				-	-	-
30°C					+	+	+

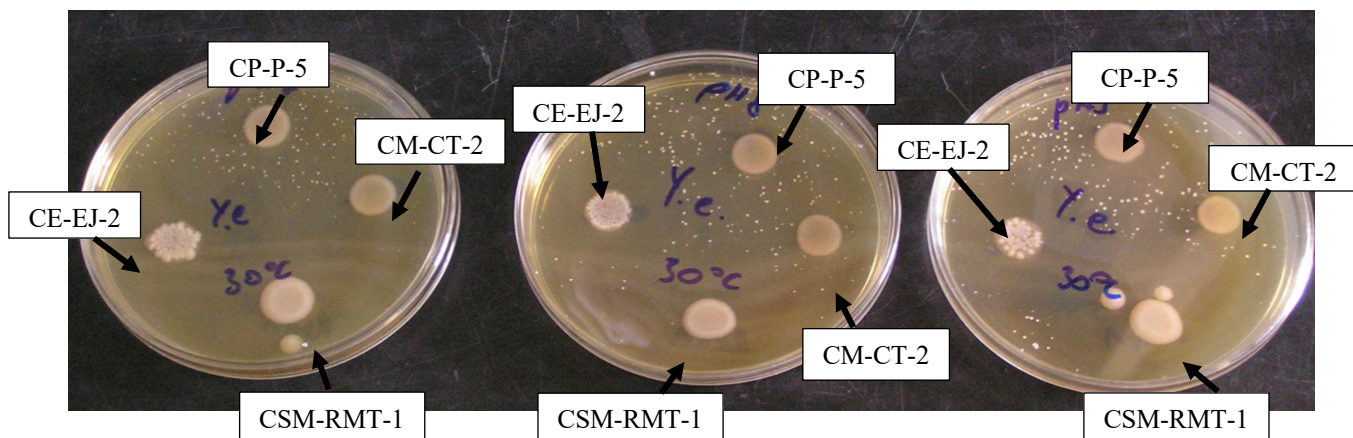
(+) részleges gátlás

+ teljes gátlás

- nincs gátlás

■ nem nőtt a patogént

0 nem nőtt az izolátum



**21. ábra** *Y. enterocolitica* szaporodásának gátlása különböző pH értékű (balról jobbra pH 7, 8, 9) TSA lemezeken 30 °C-on

#### 5.10.4 A sejtmentes felülűszók gátló hatása különböző kezelések után

A *Ps. lundensis* CP-P-5-ös törzs koncentrált és nem-lyofilizált felülűszóival elvégeztem a proteázos, a NaOH-s és a hőkezeléseket. Ezek alapján a TSB-ben statikus körülmények között előállított, nem koncentrált sejtmentes felülűszóknak sem a proteázos-, sem a NaOH-os kezelése nem befolyásolta a vizsgált kórokozókra gyakorolt enyhe gátló hatását, hőkezelés után azonban nem volt megfigyelhető gátlás. Ez arra utalhat, hogy a gátló vegyület hőérzékeny és ellenálló az alkalmazott proteolitikus enzimekkel szemben. Ezekkel az eredményekkel ellentétben a lyofilizált felülűszók enzimes kezeléseit azt mutatták, hogy a *Streptomyces griseus*-ból származó proteáz és a proteináz K csökkenteni tudta a koncentrált felülűszók *S. Hartford*-ra gyakorolt antagonista hatását, míg a többi kezelés (NaOH, hőkezelések, tripszin és  $\alpha$ -kimotripszin) nem befolyásolta azokat. Az *E. coli* esetében a felülűszók antagonista hatása csökkent majdnem az összes kezelés után (a NaOH kezelésnek volt a legnagyobb hatása a felülűszóra), míg a *Streptomyces griseus*-ból származó proteáz, és az egyik hőkezelés nem befolyásolta az antagonista aktivitást. A *Y. enterocolitica* esetében egyik kezelés sem volt hatással a sejtmentes felülűszók növekedést gátló hatására, azonban minden vizsgálatban ez a kórokozó volt a legérzékenyebb. Ezek az eredmények is, a korábban megfigyeltékhez hasonlóan arra engednek következtetni, hogy nem csupán egyféle anyag termelődése adja a CP-P-5-ös *Ps. lundensis* gátló hatását.

A kezelések változatos hatásait a *Ps. lundensis* CP-P-5 és a *S. marcescens* CSM-RMT-1 esetében a 15. táblázat tartalmazza összefoglalva.

15. táblázat Különböző kezelések hatása a *Ps. lundensis* CP-P-5 és a *S. marcescens* CSM-RMT-1 törzsek koncentrált sejtmentes felülúszóinak gátló hatására

<i>Ps. lundensis</i> CP-P-5				
Kezelés	<i>S. Hartford</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
proteináz K	+	+		-
proteáz	+	-		-
tripszin	(+)	+		-
$\alpha$ -kimotripszin	(+)	(+)		-
0,2 N NaOH	-	+		-
95 °C, 15 perc	-	+		-
95 °C, 30 perc	-	-		-
121 °C, 15 perc	-	+		-
<i>S. marcescens</i> CSM-RMT-1				
Kezelés	<i>S. Hartford</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
proteináz K	(+)	(+)	-	-
proteáz	(+)	(+)	-	-
tripszin	(+)	(+)	-	-
$\alpha$ -kimotripszin	(+)	(+)	-	-
0,2 N NaOH	(+)	-	-	-
95 °C, 15 perc	(+)	(+)	+	-
95 °C, 30 perc	(+)	(+)	+	-
121 °C, 15 perc	(+)	(+)	(+)	-
+	befolyásolta a gátló hatást			
(+)	kis mértékben befolyásolta a gátló hatást			
-	nem befolyásolta a gátló hatást			
	nem vizsgált			

A *S. marcescens* CSM-RMT-1 törzs 10x-es töménységű felülúszóinak kezelése után kapott eredmények alapján egyik kezelés sem volt jelentős hatással a *Y. enterocolitica*-ra gyakorolt gátlásra. A *S. Hartford*-dal végzett kísérlet során mindegyik kezelés kismértékben csökkentette a felülúszók gátló hatását, a legjelentősebb közülük a proteáz és a proteináz K hatása volt. Az *E. coli*-val szemben megfigyelt gátló hatásról elmondható, hogy az enzimes kezelések (tripszin,  $\alpha$ -kimotripszin, proteáz és a proteináz K) és a hőkezelések kismértékben rontották a felülúszók hatékonyságát, míg a *L. monocytogenes* esetében csak a hőkezelés (95 °C 15 perc, 95 °C 30 perc, 121 °C 15 perc) volt negatív hatással a gátlásra. A CSM-RMT-1-es *S. marcescens* esetében is, a CP-P-5-höz hasonlóan több vegyület is szerepet játszhat a gátló hatás megjelenésében, mert a különböző patogénekkal szemben különböző kezelések változtattak a felülúszók hatékonyságán.



A *Ps. lundensis* CE-EJ-2 10x-es töménységű felülúszóinak vizsgálata során a *S. Hartfordra* gyakorolt gátló hatást nem befolyásolta egyik alkalmazott kezelés sem, míg az *E. coli* vizsgálata során a felülúszók az enzimes kezelések hatására nagyobb, még hőkezelés hatására kisebb mértékben veszítettek a gátló hatékonyságukból.

A *Ps. azotoformans* CM-CT2 10x-es töménységű felülúszóinak egyébként sem erős gátló hatását nem befolyásolta jelentősen egyik kezelés sem *S. Hartford* esetében. Hasonló eredmény volt megfigyelhető a *Y. enterocolitica*-val végzett vizsgálatnál, a kezelések nem befolyásolták a felülúszók hatását, de itt a gátló hatás jelentős mértékű volt a 24 órás mérés során. Az *E. coli* elleni gátló hatást a proteáz és a proteináz K csökkenteni tudta, a többi kezelés nem volt rá hatással.

A vizsgált törzsek felülúszóinál nem volt egyértelműen megállapítható, hogy hőérzékeny komponens, vagy fehérje eredetű komponens játszik-e szerepet a gátló hatás kialakulásában. Az eredmények alapján több anyag felelős a gátlásért, ami patogéneknél is különbözhet.

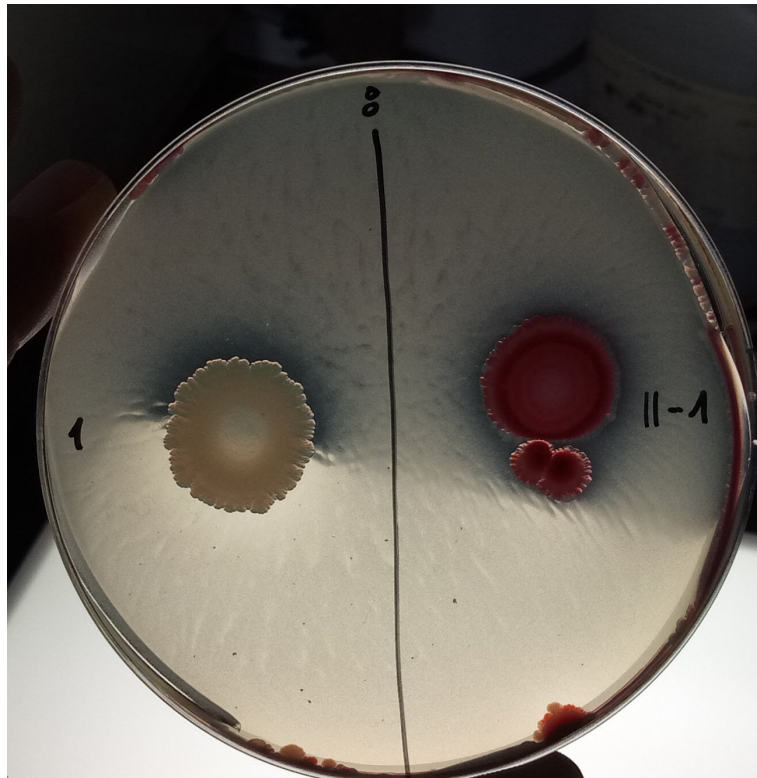
Kurninato és munkatársai (2021) hat *Streptomyces sp.* fagyasztva szárítással koncentrált felülúszójának hatását vizsgálták *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *E. coli*, *L. monocytogenes*, és *S. aureus* ellen, ahol szintén szükség volt a felülúszó koncentráálására a gátlóhatás megfigyeléséhez, amihez a liofilizálás megfelelő módszer volt.

#### 5.10.5 Az antagonista *S. marcescens* törzsekkel végzett vizsgálatok eredményei

Két *S. marcescens* törzset vizsgáltam, amelyek közül az egyik a korábban is részletesebben vizsgált nem-pigmentált CSM-RMT-1 volt (amely mind a négy patogén baktérium ellen hatásos volt valamilyen formában), a másik egy pigment termelő *S. marcescens* (CSM-RMT-II-1) volt, amely csupán a *Y. enterocolitica* ellen rendelkezett gátló hatással a kontakt inhibíciós vizsgálatok során.

##### *5.10.5.1 A kitináz termelés vizsgálat eredményei*

A két *S. marcescens* törzs kitináz aktivitását kolloidális kitin alkalmazásával mutattam ki. A kolóniák körüli feltisztulási zónák alapján mindkét *Serratia* képes volt kitináz enzimet termelni. A zónák mérete alapján a CSM-RMT-1 törzs kitináz aktivitása nagyobb volt, mint a CSM-RMT-II-1 törzsé (22. ábra).



**22. ábra** *S. marcescens* törzsek vizsgálata kitines táptalajon a feltisztulási zónákkal (balra CSM-RMT-1, jobbra CSM-RMT-II-1)

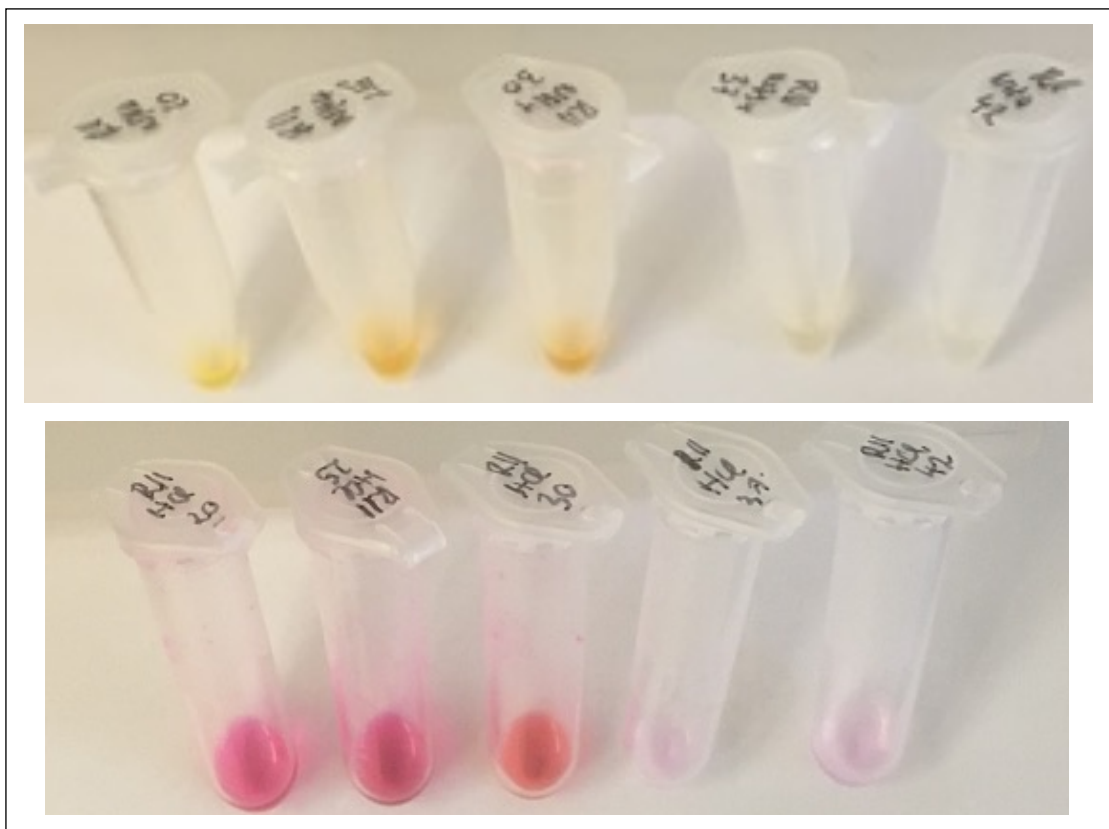
A *chiA*-specifikus PCR esetében mindkét törzs egy 225 bp. hosszú amplikont hozott létre, amely arra utal, hogy mind a két *S. marcescens* genomjában megtalálható a kitináz enzimet kódoló gén.

A kitináz termelés, gyakran fordul elő *Serratia* fajok esetében, kitinbontó képességüket már korábban is leírták (Medeiros et al., 2018; Vaaje-Kolstad et al., 2013), valamint a CSM-RMT-1-es törzshöz hasonlóan a *chiA* gén jelenlétét is több *Serratia* törzsnél igazolták már korábbi vizsgálatokban (Brurberg et al., 1994; Tariq és Reyaz, 2015; Watanabe et al., 1997). A mikrobiális kitin képes a sejtfalában található kitin bontására, így antibakteriális, gombaellenes, és rovarellenes hatású is lehet (Veliz et al., 2017). Mindezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a kitináz termelő képesség szerepet játszhat a törzsek gátló hatásában, de nem ez az enzim az elsődleges inhibítor metabolit, mert a gátolt patogéneknek nem sejtfal alkotója a kitin.

#### 5.10.5.2 A prodigiozin termelés vizsgálat eredményei

A prodigiozin termelést a két *S. marcescens* törzs egynapos tenyészeiből előállított kivonatokkal vizsgáltam. A CSM-RMT-II-1 törzs esetében a prodigiozin jelenléte 20 és 30 °C között volt

megfigyelhető savas és lúgos extrakcióval egyaránt. A CSM-RMT-1 törzs azonban sem savas, sem lúgos körülmények között nem mutatott színváltozást. Ezek az eredmények összhangban vannak a tenyésztés során megfigyelttel, ahol a CSM-RMT-1 törzs fehér kolóniákat, míg a CSM-RMT-II-1 törzs piros telepeket képzett TSA, illetve Nutrient agarlemezekon tenyésztve. A nagyobb hőmérsékletek (37 és 42 °C) nem voltak annyira alkalmasak a prodigiozin termelésére, mint a kisebbek (20 és 30 °C között), mivel mind lúgos, mind savas körülmények között csak enyhe színváltozás volt tapasztalható a csövekben, a kisebb hőmérsékleten azonban erős színváltozás volt megfigyelhető (23. ábra).



**23. ábra** Szinteszti eredményei *S. marcescens* CSM-RMT-II-1 törzs esetén lúgos (fent) és savas (lent) közegben öt különböző hőmérsékleten (20, 25, 30, 37, 42 °C)

A prodigiozin-termelésre vonatkozó szintesztek után a *cueR-pigA* és a *pigN-copA* régiók kimutatását mindkét *S. marcescens* esetében elvégeztem. A CSM-RMT-1-et vizsgálva sem a *cueR-pigA*, sem a *pigN-copA* régiók esetében nem keletkezett kimutatható PCR-termék az agaróz géleken az elektroforézist követően.

A CSM-RMT-II-1 törzs esetében a *pigN-copA* szegmensre specifikus primerek amplifikációt eredményeztek, azonban a kötődésük nem volt specifikus, mivel a PCR-termék mérete nagyobb

volt (kb. 500 bp), mint a várt 244 bp. A reakció körülmények optimalizálását követően a keletkezett amplikon még mindig nagyobb volt a vártnál. Látható volt azonban egy körülbelül 480 bp nagyságú DNS-szegmens jelenléte, amelyet a cueR és a PE1 primerpár (a *cueR-pigA* régióra specifikus) hozott létre. Mindez arra enged következtetni, hogy a CSM-RMT-II-1 törzs rendelkezik a *cueR* és a *pigA* génekkel, azonban az operonba rendeződött, prodigiozin termelésért felelős génszekvenciák között változások fordulhattak elő.

A PCR-es eredmények tehát összhangban vannak a prodigiozin-termelés és a tenyésztési vizsgálatok megfigyeléseivel, továbbá megállapítható, hogy a CSM-RMT-II-1-es törzs gátló hatásában szerepe lehet a prodigiozin termelésnek, míg a CSM-RMT-1-es törzs esetében más anyagcseretermékek felelősek a gátló hatás kialakulásáért.

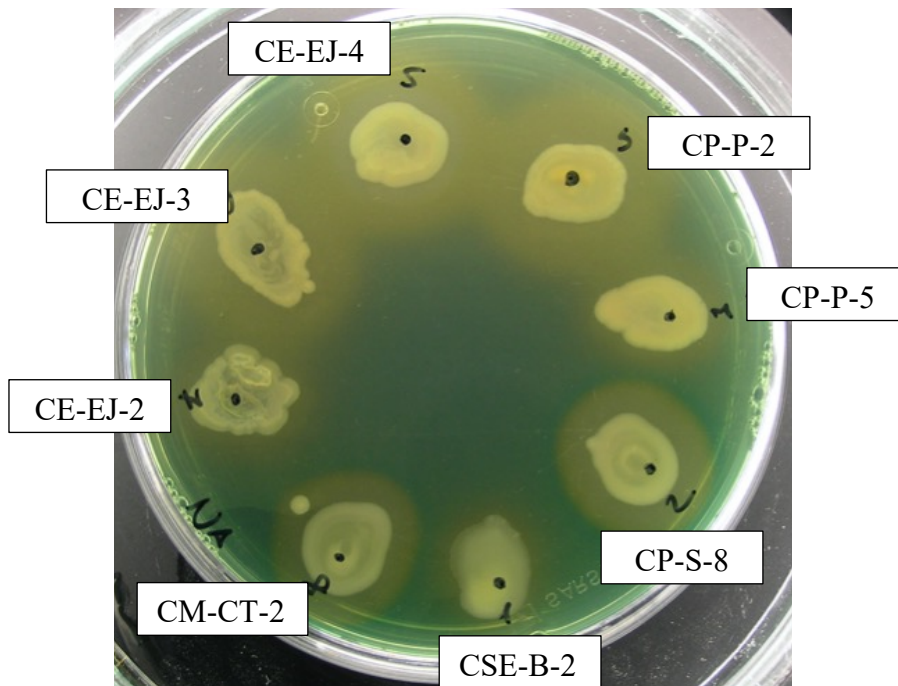
#### 5.10.6 A *Pseudomonas* törzsekkel végzett vizsgálatok eredményei

A 20 gátló hatású izolátum közül az azonosítást követően 8 törzs bizonyult a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozónak. Ezek az alábbiak voltak: *P. azotoformans* CP-P-2, *P. lundensis* CP-P-5, *P. granadensis* CP-S-8, *P. lundensis* CE-EJ-2, *P. extremaustralis* CE-EJ-3, *P. azotoformans* CE-EJ-4, *P. rhizosphaerae* CSE-B-2, és *P. azotoformans* CM-CT-2. Ebből a nemzetségből került ki vizsgálataim során a legtöbb, gátló hatással rendelkező izolátum (24. ábra). Szakirodalmi adatok alapján élelmiszerek esetében a *Pseudomonas* nemzetségből származó törzsek között gyakran találunk potenciális biokontroll baktériumokat (Alegre et al., 2013; Belák és Maráz, 2015; Cheng et al., 1995).

##### *5.10.6.1 Sziderofór termelés eredményei*

A sziderofór termelést CAS agaron vizsgáltam. A kék agaron megjelenő narancssárga zóna azt jelentette, hogy a törzs képes kelátképző metabolitot termelni. A 28. ábrán látható, hogy mindegyik *Pseudomonas* törzs esetében keletkezett narancssárga zóna, így elmondható, hogy az összes képes volt sziderofór termelésre.

Mivel a sziderofórok képesek a patogénektől elvonni a vasat rezet és cinket, így gátolhatják azok növekedését, így az általam vizsgált sziderofór termelési képessége is szerepet játszhat az antagonisták hatásának megjelenésében.

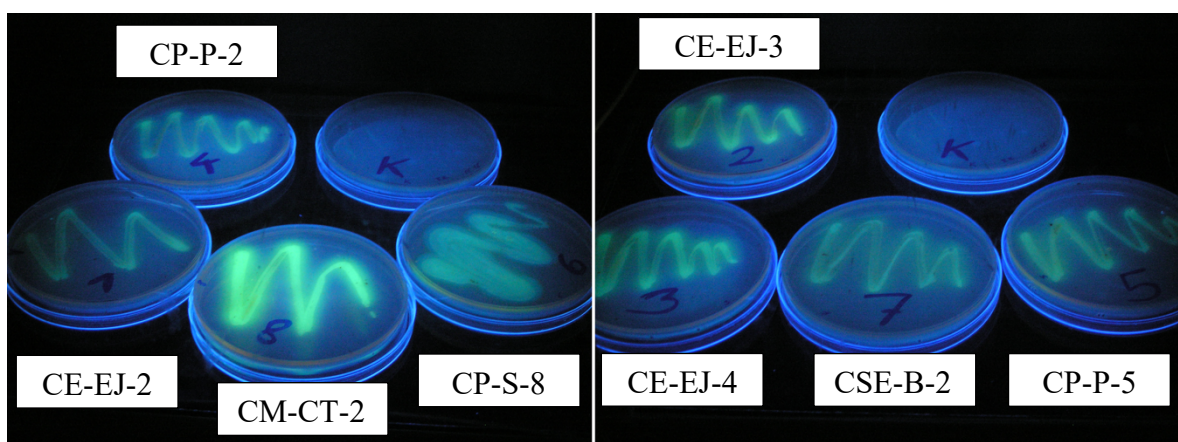


**24. ábra** Sziderofór termelés vizsgálatának eredményeként megfigyelt sárga zónák CAS agaron a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek esetén

#### 5.10.6.2 Fluoreszcens pigmenttermelés vizsgálatának eredményei

A fluoreszcens *Pseudomonas*-ok képesek zöldes-sárga fluoreszcens sziderofór termelésre (Trapet et al., 2016), így ennél a vizsgálatnál várható volt, hogy a sziderofór termelésnél pozitív eredményt adó törzseknél fluoreszcencia is detektálható lesz.

A *Pseudomonas* törzsek *Pseudomonas* F agaron történő tenyésztése után UV fény alá téve a petricsészéket a 25. ábra alapján elmondható, hogy mindegyik vizsgált törzs termelt fluoreszcens pigmenteket.



**25. ábra** A *Pseudomonas* törzsek fluoreszcens pigmenttermelése *Pseudomonas* F agaron

A *Pseudomonas*-ok között több fluoreszcens faj is ismert, amelyek közül többnek biokontroll tulajdonságot is tulajdonítanak (Vicentini et al., 2022) A fluoreszcens pszeudomonasz fajok közé tartozik például a *Ps. azotoformans* és a *Ps. lundensis* is (Circella et al., 2020; Molin et al., 1986). Pascual és munkatársai (2015) a *Ps. granadensis*-t is a *Ps. fluorescens* közeli rokonaként írták le, így ennél az izolátumnál is várható volt a fluoreszcencia megjelenése. A *Ps. extremaustralis* López és munkatársai (2009) eredményei alapján szintén képes fluoreszkáló pigmenttermelésére King B agaron, azonban a *Ps. rhizosphaerae*-t mikor először azonosították Peix és munkatársai (2003), akkor nem-pigmenttermelő pszeudomonaszként jellemezték.

#### 5.10.7 A felülúszók kromatográfiás vizsgálatának és frakcionálásának eredményei

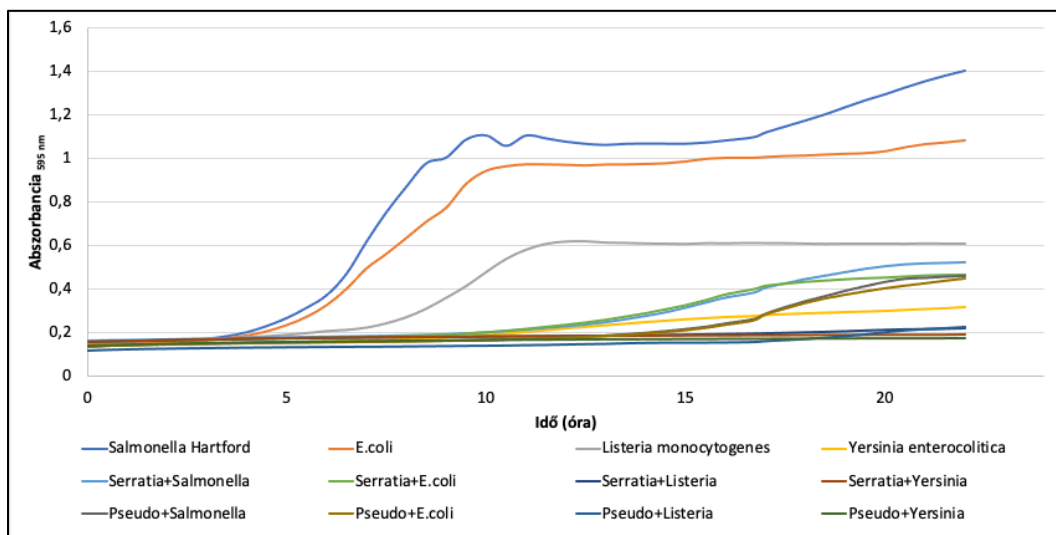
Az ebben a pontban ismertetett vizsgálatok során a *Ps. lundensis* CP-P-5 és a *S. marcescens* CSM-RMT-1 liofilizált felülúszóit vizsgáltam. A vizsgálatok célja a gátló komponensek elválasztása és meghatározása volt különböző módszerekkel. Bár a korábbi vizsgálatok során a CP-P-5 nem gátolta a *L. monocytogenes* növekedését, ezeknél a méréseknél leteszteltük a frakcionált felülúszókat ez ellen a patogén ellen is, így mind a két törzset vizsgáltunk mindegyik patogén baktérium ellen.

A két liofilizált felülúszó kivonatait etanolos és vizes extraxciót követően HPTLC-vel vizsgáltuk. A vizsgálat eredménye alapján az látszott, hogy túl nagy a kivonatok mátrixa, ráadásul aktívak voltak *Bacillus subtilis*-szal szemben a HPTLC-*B. subtilis* tesztben. A két törzs felülúszója nagyon hasonló összetételt mutatott, így ez is azt támasztotta alá, hogy a mátrix volt látható az eredményekben.

Ezt követően a frakcionálás (hexán, EtAc és EtOH) után ismételt HPTLC vizsgálat következett, amiben megvizsgáltuk a TSB táplevest is kontrollként. Ennek az eredménye alapján elmondható, hogy a nagyon poláris régióban nagyon sok fehérje, peptid volt, ami nagyon megterhelte a réteget, ezért olyan tápközegeket kerestünk a két törzshöz, amelyekben a gátló anyagok megfelelően tudnak termelődni, de az összetételük nem zavarja a mérést.

A *S. marcescens* esetében a minimál tápleves, a *Ps. lundensis* esetén pedig az Ásványi 0 és Ásványi 1 tápleves is megfelelőnek bizonyult gátló hatás szempontjából (26. ábra), azonban az Ásványi 0 tápleves túl sok cukrot tartalmazott és a mintakészítés során ragadóssá vált, így az Ásványi 1-es táplevessel dolgoztunk tovább. Később egy módosított Ásványi 2 táplevest is kipróbáltunk az utolsó frakcionáláskor, valamint a CP-P-5 korábban nem mutatott gátló hatást *L.*

*monocytogenes*-el szemben, az ásványi táptalajos tenyésztést követően azonban jó gátló hatás volt megfigyelhető ebben az esetben is a koncentrált felülúszók vizsgálata során. Így megállapítható, hogy a megváltozott tápközeg, amely nem tartalmazott fehérjéket, kedvezett a gátló hatás megjelenésének.

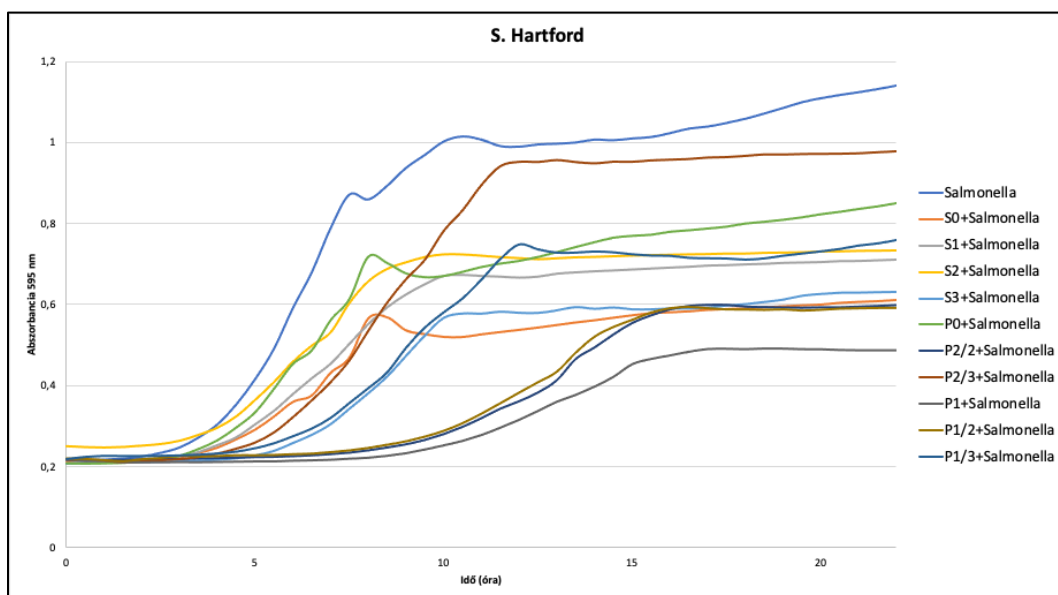


**26. ábra** Ásványi 1 és minimál táplevesben tenyésztett *Ps. lundensis* CP-P-5 és *S. marcescens* CSM-RMT-1 liofilizálással 10x-re koncentrált felülúszóinak gátló hatása *S. Hartford*, *E. coli*, *L. monocytogenes* és *Y. enterocolitica* ellen

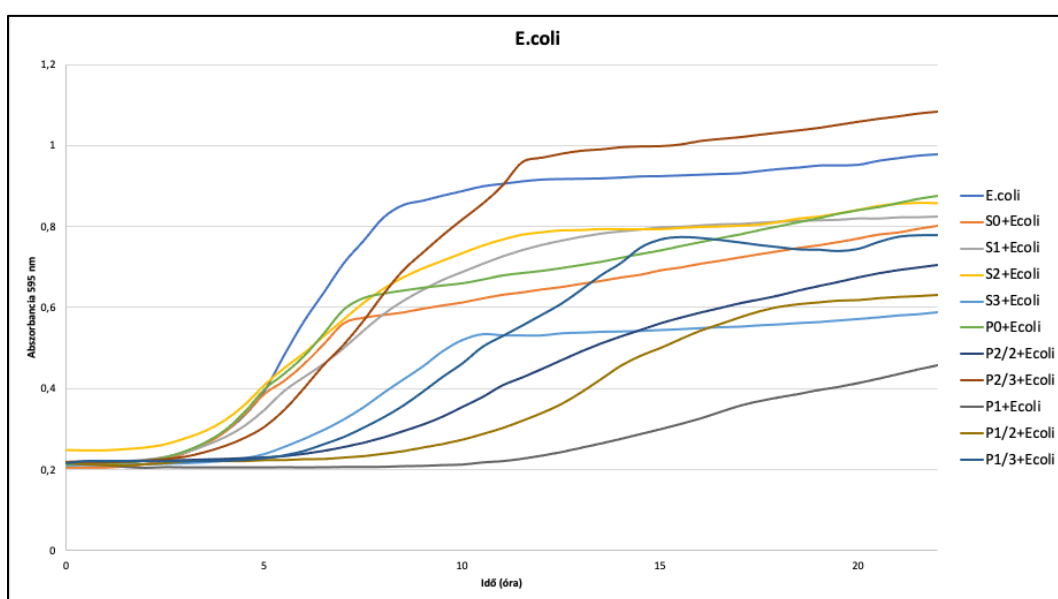
Ezt követően a megváltoztatott tápközeggel készített felülúszókat vizsgálva ismét hexán, EtAc és EtOH oldószerekkel kivonatoltunk, majd SPE-vel elválasztva azt láttuk, hogy az oldószerek nem tudták kivonni a gátló komponenst, és SPE során minden esetben a vizes fázisban voltak jelen a gátló komponensek, kivéve a *Ps. lundensis* CP-P-5 *Y. enterocolitica*-val szembeni vizsgálatokor. Ebben az esetben az EtOH és EtAc kivonatoknak maradt meg a gátló hatása (M7), azonban a nem kivonatolt kontroll mintákhoz képest csökkent a gátló hatást mutató vizes SPE fázisok hatása, tehát nem egyértelműen tartalmazta a gátlásokért felelős összes komponenst ez a fázis. Ez szintén az M7-es ábrákon látható. Ezek az eredmények is arra utalnak, hogy több komponens felelős a gátló hatásokért, amelyek javarészt vízben oldódnak, kivéve a *Ps. lundensis* CP-P-5 *Y. enterocolitica* ellen hatásos gátlóanyagát, ami a poláris szerves oldószerekben (EtOH és EtAc) oldódott jobban.

Az utolsó elvégzett SPE során készített minták gátló hatásának vizsgálati eredményei a 27-31. ábrákon láthatóak. Az Ásványi 1 táplevesben tenyésztett *Ps. lundensis*-ből készült felülúszók frakciói (P1, P1/2, P1/3) jobban tudták gátolni a *S. Hartford* szaporodását, az Ásványi 2 tápleves frakciói (P0, P2/2, P2/3) közül a P2/2-esnek volt a legjobb hatása és mind a két tápközeg esetében a 3. frakciónak volt a leggyengébb a gátló hatása. A *S. marcescens* esetében az S0 és az S3-as

frakció volt a legeredményesebb. Ez alapján a *S. Hartford* ellen ható gátló komponens a *Ps. lundensis* CP-P-5 és a *S. marcescens* CSM-RMT-1 esetében is poláros anyag lehet.



**27. ábra** *Ps. lundensis* CP-P-5 és *S. marcescens* CSM-RMT-1 liofilizálással 10x-re koncentrált felülúszóiból készült frakciók gátló hatása *S. Hartford* ellen

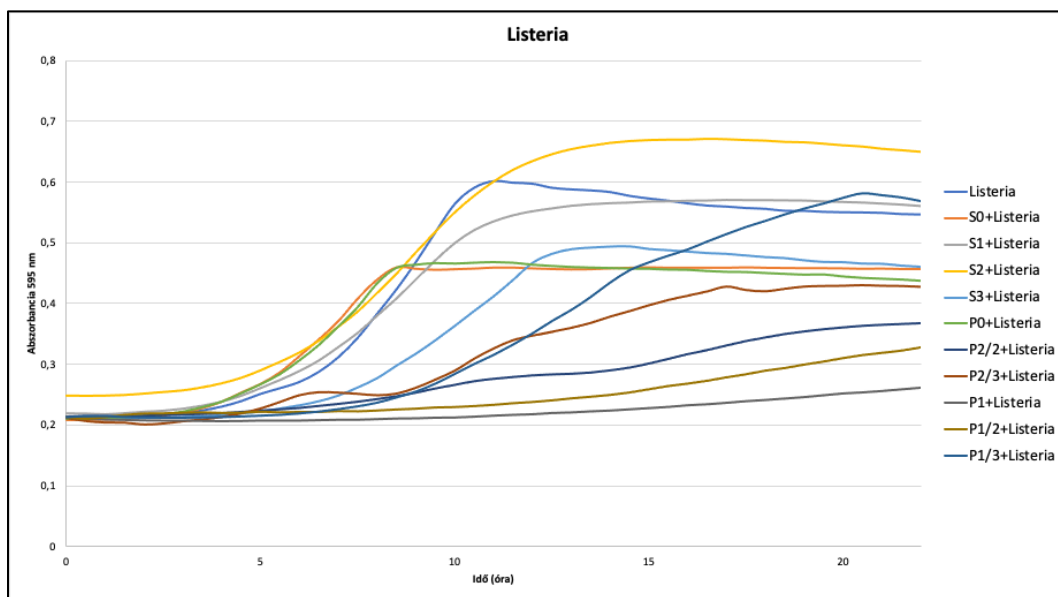


**28. ábra** *Ps. lundensis* CP-P-5 és *S. marcescens* CSM-RMT-1 liofilizálással 10x-re koncentrált felülúszóiból készült frakciók gátló hatása *E. coli* ellen

*E. coli*-val szemben a frakciók gátló hatásának megoszlása hasonlított a *S. Hartford*-nál látottakéhoz, gátló hatásosság szempontjából itt is a P1, P1/2 és a P2/2 volt a leghatékonyabb a *Ps. lundensis* CP-P-5 felülúszójából készült frakciók közül, valamint az S0 és S3 a *S. marcescens*

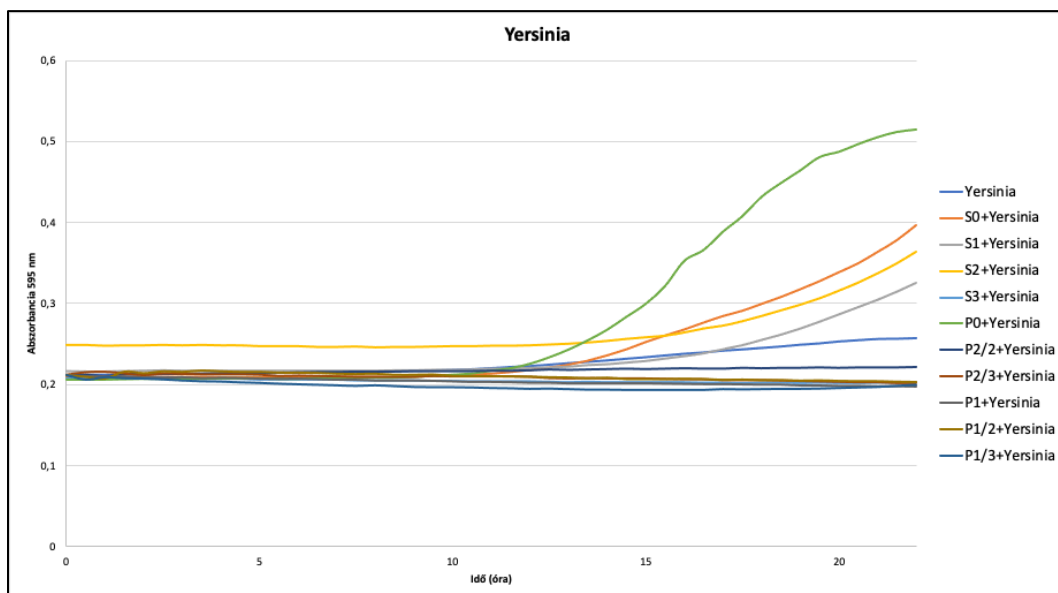


CSM-RMT-1 felülúszójából készült frakciók közül. Ezek alapján valószínű lehet, hogy a két patogén ellen ugyanazok az anyagok okozzák a gátló hatást.



**29. ábra** *Ps. lundensis* CP-P-5 és *S. marcescens* CSM-RMT-1 liofilizálással 10x-re koncentrált felülúszóiból készült frakciók gátló hatása *L. monocytogenes* ellen

*L. monocytogenes* ellen a korábbi patogéneknél nem hatásos P2/3 is tudott gátolni a *Ps. lundensis* CP-P-5 frakciói közül, valamint a P1, P1/2 és a P2/2 voltak itt is a leghatékonyabb frakciók. A *S. marcescens* CSM-RMT-1 frakciói közül itt is az S0 és S3 tudta gátolni a patogén szaporodását.



**30. ábra** *Ps. lundensis* CP-P-5 és *S. marcescens* CSM-RMT-1 liofilizálással 10x-re koncentrált felülúszóiból készült frakciók gátló hatása *Y. enterocolitica* ellen

*Y. enterocolitica* egyébként sem erős szaporodását egyértelműen az S3-as frakció tudta gátolni a *S. marcescens* CSM-RMT-1 frakciói közül, míg a *Ps. lundensis* CP-P-5 frakciói közül csak a P0-nak nem volt gátló hatása.

A felülúszók frakcióinak gátló hatás eredményeit látva elmondható, hogy biztosan több komponens felelős a gátló hatás kialakulásáért a *Ps. lundensis* CP-P-5 esetében, mivel a vizsgált frakciók közül többnek is volt gátló hatása. Ezért a továbbiakban érdemes lenne a gátló hatású frakciókat tovább vizsgálni a komponens meghatározása céljából.

A *S. marcescens* CSM-RMT-1 esetében egy frakció (S3) volt, amelyik minden esetben tudott valamilyen mértékű gátló hatást elérni a vizsgált patogénnel szemben, tehát itt valószínűbb, hogy a metanolos extrakcióból készült fázisban maradt a gátló komponens.

## **6. Következtetések és javaslatok**

Az élelmiszerek és azok feldolgozó környezete számos olyan mikroorganizmust tartalmaz, amelyek negatív hatással lehetnek a humán megbetegedést okozó patogén mikrobákra. Érdemes tehát az élelmiszerek környezetében természetesen előforduló mikroorganizmusokat is megvizsgálni, mert belőlük akár később biokontrollként (például felület fertőtlenítéshez, Tvele és munkatársai, 2011) alkalmazható anyagcseretermékek is kinyerhetők. Munkám során különböző élelmiszer nyersanyagokból és élelmiszerekkel érintkező felületekről izolált 78 baktérium közül 20 volt képes valamelyik vizsgált patogént (*S. Hartford*, *E. coli*, *Y. enterocolitica* vagy *L. monocytogenes*) gátolni.

A gátló hatással rendelkező izolátumok keresése során az agar felületén végzett kontakt gátlás eredményeit a sejtmentes felülűszókkal végzett vizsgálatok nem tudták alátámasztani, jóval kisebb mértékű gátló hatás volt megfigyelhető az extracelluláris metabolitokat tartalmazó felülűszók esetén. Ezekben a vizsgálatokban folyékony tápközeget alkalmaztam, így a mérsékelt gátlás arra is utalhat, hogy az inhibícióért felelős anyagcseretermékek nem voltak jelen megfelelő mennyiségben a táplevesben ahhoz, hogy negatív hatást gyakoroljanak a kórokozókra, míg a szilárd táptalajban ezek a vegyületek feldúsulhattak. Feltételezhető továbbá, hogy a gátló hatású metabolitok korlátozottan oldódhattak az alkalmazott folyékony közegben, ami ugyanezt a megfigyelést eredményezheti. Ennek megfelelően arra következtethetünk, hogy az antagonista vegyületeknek koncentrált formában kell jelen lenniük a környezetben a kórokozó hatékonyabb gátlásához.

A pH és a hőmérséklet gátló anyagok termelésére vonatkozó hatásának vizsgálatokor kapott eredmények rávilágítanak a kedvezőtlen környezeti paraméterek fontosságára a patogén baktériumok növekedésének gátlásában, valamint a környezeti tényezők és a biokontroll metabolitok additív hatására.

A proteolitikus enzimaktivitás vizsgálata után elmondható, hogy proteázok részt vehetnek a kórokozók gátlásában, de nem ezek a fő gátló vegyületek.

A celofános vizsgálat és a felülűszók töményített formában történő tesztelése szintén alátámasztja azt a megfigyelést, miszerint a gátló komponensek koncentráltabb jelenléte szükséges a gátló hatás megjelenéséhez. Emellett mindkét vizsgálat megerősíti azt a megfigyelést, hogy nem szükséges a patogén mikroorganizmus jelenléte a gátló anyag(ok) termelődéséhez, azaz nem a kórokozó jelenléte indukálja a gátlásért felelős metabolitok termelését és kiválasztását, hanem azok folyamatosan termelődnek és jutnak ki az extracelluláris térbe. A tenyésztési időt figyelembe véve

ezekben a vizsgálatokban a legerősebb gátló hatás általában 24 óra után volt tapasztalható, így valószínűsíthetően elsődleges metabolitok felelősek a gátló hatásért. Ezt a megfigyelést támasztják alá a kontakt inhibíciós vizsgálatokban már 24 órát követően megjelenő feltisztulási zónák is. Mindemellett a koncentrált felülúszók tesztelése során megfigyelhető erőteljesebb gátló hatás az egynapos tenyészetekből nyert felülúszók esetében a három- és a hatnapos tenyészetekhez képest szintén erre a tényre utal. A két legjelentősebb, illetve legszélesebb gátló hatással rendelkező törzs, a *Ps. lundensis* CP-P-5 és a *S. marcescens* CSM-RMT-1 együtt tenyésztéses vizsgálatai során tapasztalt gátló hatás is az inhibitor vegyületek primer metabolit voltára utal, mert mind a két esetben 24 óra után volt a legjelentősebb mértékű csökkenés a patogének számában az antagonista izolátumok jelenléte esetén.

Minden mikroorganizmusnak eltérő környezeti és tápanyag igényei vannak az optimális szaporodáshoz, amely tényezők befolyásolják az általuk kiválasztott primer metabolitok természetét és mennyiségét. Ezek alapján az általam gyűjtött izolátumokról sem lehet általánosságban megállapítani, hogy milyen körülmények között képesek optimálisan a gátló komponenseket termelni, ehhez tehát az izolátumokat egyesével kell megvizsgálni. A munkám során kapott eredmények alapján, a fentebb már említett két törzsre (*Ps. lundensis* CP-P-5 és *S. marcescens* CSM-RMT-1) koncentrálna a gátló hatásért felelős vegyületekkel kapcsolatban a következők megállapítások tehetők.

A vizsgált *S. marcescens* CSM-RMT-1 törzs gátló hatásáért felelős molekulák extracelluláris metabolitok, mivel a celofános és felülúszós vizsgálatoknál bebizonyosodott, hogy az antagonista törzs tenyésztését követően a baktérium sejtek eltávolítása után is tapasztalható a patogének gátlása mind szilárd agar felületén, mind táplevesben, vagyis az antagonista törzsek által termelt és kiválasztódott vegyületek ugyanolyan hatást fejtenek ki, mint maguk a sejtek. A prodigiozinnak nincs releváns szerepe a gátlásban, mivel a CSM-RMT-1 törzs nem képes ezt a pigmentet előállítani, mégis jó gátló hatással rendelkezik a vizsgált kórokozókkal szemben. Mindazonáltal a különböző hidrolitikus enzimek, amelyek képesek lebontani a célszervezetek esszenciális makromolekuláit, valószínűsíthetően a CSM-RMT-1 által termelt gátló anyagok között szerepelnek. Emellett ennek a törzsnek a genomjában megtalálható a *chiA* (kitináz kódoló) gén, és képes a kitináz termelésére is, amely enzim gombaellenes és antibakteriális hatású, így összességében elmondható, hogy ezen enzimek is felelősek lehetnek az antagonista hatásért. A kromatográfiás vizsgálatok során készített frakciók analízisét követően elmondható, hogy több komponens is felelhet a CSM-RMT-1 gátló hatásáért, ugyanakkor a legjelentősebb gátló hatással rendelkező vegyület metanolban oldható, így ennek további vizsgálatával közelebb lehetne jutni a gátló hatást adó metabolit meghatározásához. Az eredmények és megfigyelések alapján a

baktérium koncentrált sejtmertes felülúszója felhasználható lehet különböző patogén baktériumok antagonistájaként az élelmiszeriparban, akár biofertőtlenítőszer formájában az élelmiszerfeldolgozó területek felületein. Emellett kitináz termelése révén gombaellenes hatását is érdemes lehetne megvizsgálni. További elemzésekre van szükség annak ellenőrzésére is, hogy a diffúz fehérjék vagy más extracelluláris vegyületek hogyan befolyásolhatják az élelmiszerek vagy élelmiszer-nyersanyagok összetételét, amennyiben azok felhasználása az élelmiszeriparban megvalósulna.

Számos *Pseudomonas* alkalmazható biokontroll mikrobaként, mivel *in vitro* körülmények között gyorsan szaporodnak, biomasszát termelnek és bioaktív metabolitok széles spektrumát képesek előállítani (pl. antibiotikumok, sziderofórok, illékony és növekedésserkentő anyagok), emellett agresszív versenytársai lehetnek más mikroorganizmusoknak, és képesek alkalmazkodni a környezeti stresszhatásokhoz (Weller, 2007). Korábbi vizsgálatokban az élelmiszerekben előforduló patogén baktériumokra antagonista hatást kifejtő többféle *Pseudomonas* törzset izoláltak (Alegre és mtsai., 2013, Olanya és mtsai., 2014, Belák és Maráz, 2015, Oliveira és mtsai., 2015), amelyek többsége fluoreszcens *Pseudomonas* volt. Az általam izolált *Ps. lundensis* CP-P-5 is képes fluoreszcens pigmenteket termelni King B agaron, valamint sziderofór termelése is megfigyelhető volt CAS agarlemezeken felületén. A felülúszós vizsgálatok eredményei alapján ennél a törzsnél több komponens is felelős lehet a gátló hatásért. A különböző kezeléseknél a nem koncentrált felülúszókban a proteolitikus enzimek szubsztrátjai alacsony koncentrációban lehettek jelen, ezért ezekben az esetekben nem volt változás a gátló hatásban. Ugyanakkor a tízszeres koncentrációjú felülúszóknál a metabolitok feldúsultak, és elegendő mennyiségben voltak jelen az enzimatis lebonthatáshoz. Eltérő eredményeket adtak az enzimes, a hő- és a NaOH-kezelést követően végzett mérések az egyes patogének esetén, ami szintén azt a feltételezést támasztja alá, hogy több vegyület felelős a kórokozók gátlásáért. A kromatográfiás vizsgálatok során készült frakciók gátló hatása is ezt erősíti meg, továbbá arra enged következtetni, hogy a különböző poláros oldószerekben jól oldódó komponensek lehetnek az antagonista hatású metabolitok. Hasonlóan a *S. marcescens* biokontroll törzshöz a *Ps. lundensis* CP-P-5 is alkalmazható lehet az élelmiszeriparban egyes patogén baktériumok gátlására. Meg kell azonban említeni, hogy a baktériumsejtek közvetlen felhasználása az élelmiszerek romlásához vezethet, így a törzs által termelt és kiválasztott vegyületek felhasználása alternatív megoldást jelenthet.

Legjobb tudomásom szerint ez az első olyan tanulmány, amelyben egy *Ps. lundensis* törzset az élelmiszerekben előforduló patogén baktériumok potenciális antagonistájaként írtak le, azonban az antagonista hatásában részt vevő gátló vegyületek jellemzését mindenképp érdemes lenne tovább folytatni.

## **7. Új tudományos eredmények**

1. Első alkalommal kerültek izolálásra és leírásra élelmiszerekkel terjedő patogének ellen potenciális biokontroll törzsként alkalmazható *Macrococcus* és *Rothia* nemzetségből származó baktériumok, amelyek a *Macrococcus caseolyticus* és a *Rothia endophytica* fajokba sorolhatók. Ezen fajok eddig még nem szerepeltek a tudományos szakirodalomban, mint élelmiszer eredetű patogén baktériumok potenciális biokontroll baktériumai.
2. Elsőként írtam le egy vágóhídi környezetből izolált *Pseudomonas lundensis* biokontroll törzset, amely képes élelmiszer eredetű patogén baktériumok szaporodás gátlására. A gátlásban többféle extracelluláris metabolit is szerepet játszik: vegyületek, amelyek szerves oldószerekben oldódnak, és lehetnek köztük a baktérium által termelt siderofórok és proteázok is. Eredményeim alapján a CP-P-5 jelű *P. lundensis* koncentrált sejtmentes felülúszója felhasználható lehet különböző kórokozó baktériumok szaporodásának visszaszorítására élelmiszer-feldolgozó üzemekben.
3. Munkám során elsőként került izolálásra tejüzemi környezetből egy pigmentet nem termelő *Serratia marcescens* biokontroll törzs. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a gátló hatásért felelős vegyület(ek) extracelluláris metabolitok, amelyek metanollal extrahálható(k), valamint a CSM-RMT-1 jelű *S. marcescens* törzs proteáz és kitináz termelése is közrejátszhat az inhibícióban. Mindezek alapján a biokontroll hatású prodigiozin-negatív *S. marcescens* törzs koncentrált sejtmentes felülúszója felhasználható lehet különböző patogén baktériumok ellen az élelmiszeriparban.

## **8. Összefoglalás**

A termőföldtől az asztalig („from farm to fork”) szükséges a megfelelő minőség biztosítása a teljes élelmiszerlánc mentén. A patogén mikroorganizmusok jelenléte az élelmiszerben élelmiszerbiztonsági kockázatot jelent, így szükség lehet különböző tartósító eljárások alkalmazására, amelyek a romlást okozó mikroorganizmusok mellett a megbetegedést okozó mikrobákkal szemben is hatásosak kell, hogy legyenek.

Napjainkban a fogyasztói igények átalakulóban vannak, előtérbe kerültek a friss és egészséges élelmiszerek, a tartósítószer mentes élelmiszerek, valamint az úgynevezett „Ready to eat” RTE termékek, amelyek kényelmi funkciójuk miatt kedveltek. Ezeknél az élelmiszercsoportoknál különösen fontos a megfelelő minőségű alapanyag biztosítása, mert bizonyos esetekben a hagyományos tartósító eljárások nem alkalmazhatóak, így például egy fogyasztásra kész salátánál a hőkezelés vagy sózás nem jöhet szóba. Így kerülnek előtérbe a kíméletes tartósítási eljárások, amelyek egyik módja lehet a biológiai kontroll.

A biokontroll egy meghatározott szervezet alkalmazása egy másik szervezet populáció sűrűségének csökkentése végett. Alkalmazása a növényvédelem területén nem újkeletű, de az élelmiszereknél is előfordul régmúlta visszatekintő használata, ha a tejsavbaktériumok által fermentációval előállított termékekre gondolunk. Biokontroll organizmusként használhatóak baktériumok, gombák, fonalférgék, rovarok, atkák és vírusok is.

Különböző, a környezetünkben természetesen jelen lévő mikroorganizmusok képesek más, patogén vagy az élelmiszerek romlását okozó mikroorganizmusok visszaszorítására. Ezen tulajdonságukat felkutatva és felhasználva olyan eszközökhöz juthatunk, amely egyéb tartósító eljárások mellett egy másik alternatíva lehet az élelmiszerek biztonságosságának biztosítása szempontjából.

Számos biokontroll kutatás folyik napjainkban is. A kutatómunkám során élelmiszer feldolgozó környezetéből izoláltam olyan baktériumokat, amelyek gátló hatást mutattak az általam tesztelt, élelmiszerekben előforduló patogén baktériumok ellen.

Vizsgálataim alkalmával élelmiszerből és annak feldolgozó környezetéből négy különböző helyről (vágóhídról, zöldségfeldolgozó üzemből, tojásfeldolgozó üzemből és tejüzemből) összesen 78 izolátum került begyűjtésre. Ezek közül TSA és WL agarokon megfigyelt morfológiai tulajdonságaik alapján 64 csoportra szűkült az izolált baktériumok száma. Az izolátumok közül

négy volt képes a *Salmonella* Hartford-ot, 8 az *E. coli*-t, 7 a *L. monocytogenes*-t és 14 a *Y. enterocolitica*-t részlegesen vagy teljesen gátolni kontakt inhibíciós vizsgálatok során.

A gátló baktériumok közül KOH teszt alapján tizenegy Gram-negatívnak, míg kilenc Gram-pozitívnak bizonyult, ez az arány a molekuláris azonosítás eredményeit követően 10-10-re változott, mert a *Paennibacillus pabuli* (nem valósan) Gram-negativitást mutatott a gyorseszten. Az izolátumok sejtmertes felülúszóját tesztelve a gátló hatás minimálisnak mutatkozott, azonban a liofilizálással tízszeres töménységűre koncentrált felülúszók erősebb gátlásra voltak képesek, emellett a celofános vizsgálat során az is megfigyelhető volt, hogy nem volt szükség a sejtek jelenlétére a gátló hatáshoz. Ezek alapján a gátló komponens feltételezhetően olyan extracelluláris anyagcseretermék, amit az adott antagonista izolátum a patogén jelenléte nélkül is termel, és képes a szilárd tápközegben feldúsulva, illetve a 10x-es töménységű felülúszók révén gátló hatást kifejteni.

A gátló hatással rendelkező törzsek 16S rDNS szekvenciájuk alapján az alábbi nemzetségeket képviselték: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Macrococcus*, *Rothia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* és *Serratia*.

A gátló komponens meghatározásához elvégzett vizsgálatok során a törzsek proteáz aktivitását is megfigyeltem tejporos TGE agart alkalmazva három különböző hőmérsékleten (20°C, 25°C, 30°C) 24, 48 és 120 órás inkubálást követően. Ezek alapján egy kivétellel mindegyik vizsgált baktérium rendelkezett valamekkora proteáz aktivitással, amely közre játszhat a gátló hatás megjelenésében.

A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó nyolc törzs sziderofór aktivitását CAS agaron megvizsgálva elmondható, hogy mindegyik rendelkezett kelátképző tulajdonsággal, és fluoreszcens pigmenttermelésre is mind képes volt King B agaron vizsgálva.

Az egyik legjobb gátló hatással rendelkező törzs a CSM-RMT-1 volt, amely 16S rDNS szekvenciája alapján egy *Serratia marcescens* törzsnek bizonyult. A baktérium képes volt kitináz enzim termelésére, amit a *chiA*-specifikus PCR vizsgálat eredménye is megerősített. Ez a törzs mind a négy tesztelt élelmiszer patogén ellen mutatott gátló hatást az inhibíciós vizsgálatok során, valamint a koncentrált felülúszók teszteléskor is.

A másik jelentős antagonista hatással rendelkező törzs a *Ps. lundensis* CP-P-5 volt, amely a *L. monocytogenes* kivételével a többi tesztelt patogént képes volt gátolni, valamint a *S. Hartford* és később élelmiszerből izolált négy *S. enterica* ellen is a legerősebb gátló hatást mutatta. Ez a törzs a vizsgálataink alapján fluoreszcens pigmenttermelésre képes, és proteáz aktivitása mellett több



komponens is részt vehet a gátló hatásának kialakításában, amire a felülűzők enzimes és hőkezeléses eredményei, valamint a kromatográfiás frakcionálást követő gátló hatás vizsgálat eredményei is utáltak.

Összefoglalva elmondható, hogy az antagonista hatású izolátumok esetében a gátlás hatásmechanizmusa a különböző baktériumok esetében eltérő lehet, azonban közös bennük, hogy a hatásért olyan extracelluláris metabolitok lehetnek felelősek, amelyek már az exponenciális növekedési szakaszban is termelődnek, mivel a gátló hatások a legjobb eredményt adó izolátumok esetében már 24 óra után láthatóak voltak. Emellett érdemes azt is megjegyezni, hogy a különböző környezeti paraméterek, mint a hőmérséklet és pH, növelhetik a gátló hatást.

További vizsgálatokat követően javaslataim alapján biofertőtlenítőszerként felhasználhatóak lehetnek egyes, általam gyűjtött és vizsgált baktérium törzsek extracelluláris metabolitjai, vagy ezen vegyületek, akár egyéb tartósítási módszerekkel kombinálva, tartósításra is alkalmasak lehetnének bizonyos élelmiszerek esetén. Ehhez azonban további széleskörű vizsgálatok szükségesek.

## Summary

It is necessary to ensure good quality along the food chain, from farm to fork. The presence of pathogenic microorganisms in food poses a food safety risk and may require the use of different preservation methods, which must be effective against pathogens that cause disease in addition to the microorganisms that cause spoilage.

Today, consumer demands are changing, with a focus on fresh and healthy foods, preservative-free foods and ready-to-eat RTE products, which are popular for their convenience. For these food groups, it is particularly important to ensure the right quality of ingredients, as in some cases traditional preservation methods are not applicable, for example, heat treatment or salting of a ready-to-eat salad is out of the question. Thus, the focus is on gentle preservation methods, one of which could be biocontrol.

Biocontrol is defined as the use of a particular organism to reduce the population density of another organism. Its use is not new in the field of plant protection, but there is also a long history of its use in food, for example in the production of products by fermentation of lactic acid bacteria. Bacteria, fungi, nematodes, insects, mites and viruses can also be used as biocontrol organisms.

Various micro-organisms naturally present in our environment are able to control other micro-organisms that are pathogenic or cause food spoilage, in some cases by entering the human body. Exploring and exploiting these properties can provide a tool that can be an alternative to other preservation methods when food safety is a concern.

There is also a lot of biocontrol research going on nowadays. In my research, I have isolated bacteria from food processing environments that have shown inhibitory activity against the tested foodborne pathogenic microorganisms.

A total of 78 isolates were collected from food and its processing environment from four different food processing environment (slaughterhouse, vegetable processing plant, egg processing plant and dairy). From these, the number of bacteria isolated was narrowed down to 64 groups based on their morphological characteristics observed on TSA and WL agar. Of the isolates, 4 were able to partially or completely inhibit *Salmonella* Hartford, 8 *Escherichia coli*, 7 *Listeria monocytogenes* and 14 *Yersinia enterocolitica* in contact inhibition studies.

Of the inhibitory bacteria, 11 were found to be Gram-negative and 9 Gram-positive by KOH test, this ratio was changed to 10-10 after the results of molecular identification, because

*Paennibacillus pabuli* showed (false) Gram-negativity in the rapid test. When cell-free supernatants of the isolates were tested, the inhibitory effect was minimal, but supernatants concentrated to 10-fold concentration by lyophilisation showed stronger inhibition, and it was also observed in the cellophane assay that the presence of cells was not required for the inhibitory effect. These results suggest that the inhibitory component is an extracellular metabolite produced by the antagonist isolate in the absence of the pathogen, and that it is capable of exerting an inhibitory effect when enriched in the solid culture medium or by the 10x concentrations of supernatants.

Strains with inhibitory activity were represented by the following genera based on their 16S rDNA sequence: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Macrococcus*, *Rothia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* and *Serratia*.

The isolates were tested for the presence of an inhibitory component. For the determination of the inhibitory component, I examined the protease activity of the isolates using milk powder TGE agar at three different temperatures (20°C, 25°C, 30°C) after incubation for 24, 48 and 120 h. These results showed that all but one of the tested isolates had some protease activity, which may be involved in the inhibition effect.

When the siderophore activity of the 8 isolates of the genus *Pseudomonas* was examined on CAS agar, all of them possessed chelating properties and were all capable of producing fluorescent pigments when examined on King B agar.

One of the isolates with the best inhibitory activity was CSM-RMT-1, a *Serratia marcescens* strain, capable of producing chitinase enzyme, which was confirmed by the results of chiA-specific PCR assay. This isolate showed inhibitory activity against all four food pathogens tested in the inhibition assays as well as in the concentrated supernatant assays.

The other isolate, CP-P-5, which was able to inhibit all pathogens tested except *L. monocytogenes*, and also showed the strongest inhibitory activity against *S. Hartford* and 4 *S. enterica* isolated later from food. Based on the sequence of the 16S rDNA, this is a strain of *Pseudomonas lundensis*, which our tests have shown to be capable of fluorescent pigment production. In addition to its protease activity, several components may be involved in the formation of inhibitory effects, as suggested by the results of enzyme and heat treatment of supernatants and the results of the inhibitory effect assay after chromatographic fractionation.

In conclusion, the mechanism of action of the antagonistic isolates may differ between bacteria, but they have in common that extracellular metabolites produced already at the exponential growth

stage may be responsible for the effect, as the inhibitory effects are already visible after 24 h for the best performing isolates. It is also worth noting that different environmental parameters, such as temperature and pH, may increase the inhibitory effect.

Some of the isolates which I have collected and tested, or their metabolites, could be used as bio-disinfectants, after further investigation, even in combination with other preservation methods, to achieve a more favourable preservation effect.

## Mellékletek

### **M1. Irodalomjegyzék**

178/2002/EK rendelet (2002. január 28.) az élelmiszerjog általános elveiről és követelményeiről, az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság létrehozásáról és az élelmiszerbiztonságra vonatkozó eljárások megállapításáról

2073/2005/EK rendelet (2005. november 15.) az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól

4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről

852/2004/EK rendelet (2004. április 29.) az élelmiszer-higiéniáról

Abdelhamid, A.G. and El-DougDoug, N.K. (2020): ‘Controlling foodborne pathogens with natural antimicrobials by biological control and antivirulence strategies’, *Heliyon*, 6(9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05020>.

Ahari Mostafavi, H., Mahyar Mirmajlessi, S., Fathollahi, H., Shahbazi, S. and Mohammad Mirjalili, S. (2013): ‘Integrated effect of gamma radiation and biocontrol agent on quality parameters of apple fruit: An innovative commercial preservation method’, *Radiation Physics and Chemistry*, 91, pp. 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2013.02.020>.

Aldayel, M.F. (2019): ‘Biocontrol strategies of antibiotic-resistant, highly pathogenic bacteria and fungi with potential bioterrorism risks: Bacteriophage in focus’, *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), pp. 1227–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.08.002>.

Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., Figge, M.J. and Abadias, M. (2012): ‘An Enterobacteriaceae species isolated from apples controls foodborne pathogens on fresh-cut apples and peaches’, *Postharvest Biology and Technology*, 74, pp. 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.07.004>.

Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Figge, M.J. and Abadias, M. (2013): ‘Control of foodborne pathogens on fresh-cut fruit by a novel strain of *Pseudomonas graminis*’, *Food Microbiology*, 34(2), pp. 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.01.013>.

Allan-Wojtas, P., Goff, H.D., Stark, R. and Carbyn, S. (1999): ‘The effect of freezing method and frozen storage conditions on the microstructure of wild blueberries as observed by cold-stage

scanning electron microscopy’, *Scanning*, 21(5), pp. 334–347.  
<https://doi.org/10.1002/sca.4950210507>.

Amit, S.K., Uddin, Md.M., Rahman, R., Islam, S.M.R. and Khan, M.S. (2017): ‘A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing’, *Agriculture & Food Security*, 6(1), p. 51. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>.

Asaka, O. and Shoda, M. (1996): ‘Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14’, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), pp. 4081–4085.  
<https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4081-4085.1996>.

Atterbury, R.J. (2009): ‘Bacteriophage biocontrol in animals and meat products’, *Microbial Biotechnology*, 2(6), pp. 601–612. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00089.x>.

Aziz, M. and Yelamanchili, V.S. (2023): ‘*Yersinia Enterocolitica*’, in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499837/> Lekérdezés időpontja: 2023. 09. 05.

Bagul, U. and Sivakumar, S. (2016): ‘Antibiotic susceptibility testing: a review on current practices’, 6(3), pp. 11-17.

Bai, J., Kim, Y.-T., Ryu, S. and Lee, J.-H. (2016): ‘Biocontrol and Rapid Detection of Food-Borne Pathogens Using Bacteriophages and Endolysins’, *Frontiers in Microbiology*, 7.

Bale, J.S., van Lenteren, J. and Bigler, F. (2007): ‘Biological control and sustainable food production’, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363, pp. 761–76. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2182>.

Becker, D.M., Kinkel, L.L. and Schottel, J.L. (1997): ‘Evidence for interspecies communication and its potential role in pathogen suppression in a naturally occurring disease suppressive soil’, *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), pp. 985–990. <https://doi.org/10.1139/m97-142>.

Belák Á. (2009): *Élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktériumok kimutatása, PCR-alapú molekuláris azonosítása és tipizálása*. phd. Budapesti Corvinus Egyetem.

Belák Á. (2014): ‘A biológiai kontroll alkalmazási lehetőségei élelmiszer eredetű patogén baktériumok gátlására’, *Élelmiszervizsgálati közlemények*, LX. évf (3.).

Belák, Á. (2021): ‘Biológiai kontroll: alternatív lehetőségek az élelmiszer eredetű patogén baktériumok elleni védekezésben’. *Hungalimenteria 2021*, Budapest, 9 November.

Belák, Á. and Maráz, A. (2015): ‘Antagonistic Effect of Pseudomonas sp. CMI-1 on Foodborne Pathogenic *Listeria monocytogenes*’, *Food Technology and Biotechnology*, 53(2), pp. 223–230. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.02.15.3731>.

Bennett, J.W. and Bentley, R. (2000): ‘Seeing red: the story of prodigiosin’, *Advances in Applied Microbiology*, 47, pp. 1–32. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(00\)47000-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(00)47000-0).

Bharmal, M.-H.M. and Jahagirdar, N. (2012): ‘Study on Optimization of Prodigiosin Production by *Serratia marcescens* MSK1 Isolated From Air’, in. <https://www.semanticscholar.org/paper/STUDY-ON-OPTIMIZATION-OF-PRODIGIOSIN-PRODUCTION-BY-Bharmal-Jahagirdar/daf9ca3a4f7c2e21a45d4b93bb9f31203804b071>

Lekérdezés időpontja: 2023. 09. 04.

Bintsis, T. (2017): ‘Foodborne pathogens’, *AIMS microbiology*, 3(3), pp. 529–563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>.

Blackburn, D., Shapiro-Ilan, D.I. and Adams, B.J. (2016): ‘Biological control and nutrition: Food for thought’, *Biological Control*, 97, pp. 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.007>.

Bonham, K.S., Wolfe, B.E. and Dutton, R.J. (2017): ‘Extensive horizontal gene transfer in cheese-associated bacteria’, *eLife*. (szerk.) K. Handley, 6, p. e22144. <https://doi.org/10.7554/eLife.22144>.

Bonneau, A., Roche, B. and Schalk, I.J. (2020): ‘Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins’, *Scientific Reports*, 10(1), p. 120. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56913-x>.

Braga, R.M., Dourado, M.N. and Araújo, W.L. (2016): ‘Microbial interactions: ecology in a molecular perspective’, *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 4(1), pp. 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>.

Bratanis, E., Andersson, T., Lood, R. and Bukowska-Faniband, E. (2020): ‘Biotechnological Potential of *Bdellovibrio* and Like Organisms and Their Secreted Enzymes’, *Frontiers in Microbiology*, 11.

Brown, M. and Stringer, M. (2002): ‘13 - The future of microbiological risk assessment’, in Martyn Brown and Mike Stringer (szerk.) *Microbiological Risk Assessment in Food Processing*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 266–292. <https://doi.org/10.1533/9781855736689.2.266>.

Brurberg, M., Synstad, B., Klemsdal, S.S., van Aalten, D., Sundheim, L. and Eijsink, V. (2001): 'Chitinases from *Serratia marcescens*', *Recent Res Dev Microbiol*, 5, pp. 187–204.

Brurberg, M.B., Eijsink, V.G.H. and Nes, I.F. (1994): 'Characterization of a chitinase gene (*chiA*) from *Serratia marcescens* BJL200 and one-step purification of the gene product', *FEMS Microbiology Letters*, 124(3), pp. 399–404.

Buchanan, R. and Bagi, L. (1999): 'Microbial competition: Effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*', *Food Microbiology*, 16, pp. 523–529. <https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0264>.

Buckle, J. (2015): 'Chapter 7 - Infection', in J. Buckle (ed.) *Clinical Aromatherapy (Third Edition)*. St. Louis: Churchill Livingstone, pp. 130–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5440-2.00007-3>.

Burger, R. (2012): 'EHEC O104:H4 in Germany 2011: 'Large Outbreak of Bloody Diarrhea and Haemolytic Uraemic Syndrome by Shiga Toxin-producing *E.coli* via Contaminated Food, in *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary*. National Academies Press (US).

Carlin, F., Nguyen-The, C. and Morris, C.E. (1996): 'Influence of Background Microflora on *Listeria monocytogenes* on Minimally Processed Fresh Broad-Leaved Endive ( *Cichorium endivia* var. *latifolia* )', *Journal of Food Protection*, 59(7), pp. 698–703. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.7.698>.

Castellano, P., Pérez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C. and Vignolo, G.M. (2017): 'Strategies for Pathogen Biocontrol Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites: A Focus on Meat Ecosystems and Industrial Environments', *Microorganisms*, 5(3), p. 38. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030038>.

CDC Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED) (2010): *CDC - Multistate Outbreak of Salmonella Hartford and Baildon - August 4, 2010 - Salmonella*. <https://www.cdc.gov/salmonella/2010/restaurant-chain-a-8-4-10.html>

Lekérdezés időpontja: 2023. 09. 05.

Cebrián, E., Núñez, F., Álvarez, M., Roncero, E. and Rodríguez, M. (2022): 'Biocontrol of ochratoxigenic *Penicillium nordicum* in dry-cured fermented sausages by *Debaryomyces hansenii*



- and *Staphylococcus xylosus*', *International Journal of Food Microbiology*, 375, p. 109744. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109744>.
- Cebrián, E., Núñez, F., Gálvez, F.J., Delgado, J., Bermúdez, E. and Rodríguez, M. (2020): 'Selection and Evaluation of *Staphylococcus xylosus* as a Biocontrol Agent against Toxigenic Moulds in a Dry-Cured Ham Model System', *Microorganisms*, 8(6), p. 793. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060793>.
- Cheng, C.-M., Doyle, M.P. and Luchansky, J.B. (1995): 'Identification of *Pseudomonas fluorescens* Strains Isolated from Raw Pork and Chicken That Produce Siderophores Antagonistic towards Foodborne Pathogens', *Journal of Food Protection*, 58(12), pp. 1340–1344. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.12.1340>.
- Chernin, L., Brandis, A., Ismailov, Z. and Chet, I. (1996): 'Pyrrolnitrin Production by an Enterobacter agglomerans Strain with a Broad Spectrum of Antagonistic Activity Towards Fungal and Bacterial Phytopathogens', *Current Microbiology*, 32(4), pp. 208–212. <https://doi.org/10.1007/s002849900037>.
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R. and Oppenheim, A. (1990): 'Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria', *Plant and Soil*, 129(1), pp. 85–92. <https://doi.org/10.1007/BF00011694>.
- Chlebicz, A. and Ślizewska, K. (2018): 'Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), p. 863. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>.
- Circella, E., Schiavone, A., Barrasso, R., Camarda, A., Pugliese, N. and Bozzo, G. (2020): 'Pseudomonas azotoformans Belonging to Pseudomonas fluorescens Group as Causative Agent of Blue Coloration in Carcasses of Slaughterhouse Rabbits', *Animals: an open access journal from MDPI*, 10(2), p. 256. <https://doi.org/10.3390/ani10020256>.
- Cobo, F. (2022): 'Pathogenesis of Bacterial Infections and Bacterial Persistence', in, pp. 492–497. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00098-7>.
- Cook, K.A., Dobbs, T.E., Hlady, W.G., Wells, J.G., Barrett, T.J., Puhr, N.D., Lancette, G.A., Bodager, D.W., Toth, B.L., Genese, C.A., Highsmith, A.K., Pilot, K.E., Finelli, L. and Swerdlow, D.L. (1998): 'Outbreak of Salmonella serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice', *JAMA*, 280(17), pp. 1504–1509. <https://doi.org/10.1001/jama.280.17.1504>.

Cook, R.J. (1993): 'Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens', *Annual Review of Phytopathology*, 31, pp. 53–80. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.000413>.

Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C. and Fanning, S. (2014): 'Bacteria: Other Pathogenic Enterobacteriaceae – Enterobacter and Other Genera', in Y. Motarjemi (ed.) *Encyclopedia of Food Safety*. Waltham: Academic Press, pp. 433–441. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00104-9>.

Crump, J.A. and Wain, J. (2017): 'Salmonella', in S.R. Quah (ed.) *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, pp. 425–433. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00394-5>.

Dauthy, M.E. (1995): *Fruit and vegetable processing*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO agricultural services bulletin, 119).

Deák T., Kiskó G., Maráz A. and Mohácsiné Farkas Cs. (2006) *Élelmiszer-mikrobiológia*. (Szerk.) Deák T. Mezőgazda Kiadó.

Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D. and Jijakli, M.H. (2016): 'The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products', *Postharvest Biology and Technology*, 122, pp. 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>.

Dukare, A.S., Paul, S., Nambi, V.E., Gupta, R.K., Singh, R., Sharma, K. and Vishwakarma, R.K. (2019): 'Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(9), pp. 1498–1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>.

ECDC and EFSA (2023): 'Multi-country outbreak of Salmonella Virchow ST16 infections linked to the consumption of meat products containing chicken meat', *EFSA Supporting Publications*, 20(4), p. 7983E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.EN-7983>.

EFSA (2023): Food additives <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-additives#published-on-this-topic>, Lekérdezés időpontja: 2023. 06. 01.

EFSA and ECDC (2022): 'The European Union One Health 2021 Zoonoses Report', *EFSA Journal*, 20(12), p. e07666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>.

Ehuwa, O., Jaiswal, A.K. and Jaiswal, S. (2021): ‘Salmonella, Food Safety and Food Handling Practices’, *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(5), p. 907. <https://doi.org/10.3390/foods10050907>.

El-Banna and Winkelmann (1998): ‘Pyrrolnitrin from Burkholderia cepacia: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes’, *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), pp. 69–78. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00473.x>.

Emmert, E.A. and Handelsman, J. (1999): ‘Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective’, *FEMS microbiology letters*, 171(1), pp. 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13405.x>.

Espenhain, L., Riess, M., Müller, L., Colombe, S., Ethelberg, S., Litrup, E., Jernberg, C., Kühlmann-Berenzon, S., Lindblad, M., Hove, N.K., Torpdahl, M. and Mörk, M.J. (2019): ‘Cross-border outbreak of Yersinia enterocolitica O3 associated with imported fresh spinach, Sweden and Denmark, March 2019’, *Eurosurveillance*, 24(24), p. 1900368. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.24.1900368>.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC) (2018): ‘The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017’, *EFSA Journal*, 16(12), p. e05500. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>.

Farkas, J. (2001): ‘Future trends in food technology — novel food and transgenic food: A review’, *Acta Alimentaria*, 30(3), pp. 267–279. <https://doi.org/10.1556/AAlim.30.2001.3.4>.

Farkas J. and Mohácsiné Farkas C. (2014): ‘Baktériumok kommunikációja és annak élelmiszertudományi jelentősége; Bacterial communication and its importance in food science’, *Élelmiszervizsgálati közlemények*, 60(1), pp. 38–43.

Faust, K. and Raes, J. (2012): ‘Microbial interactions: from networks to models’, *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), pp. 538–550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>.

FDA (2023): ‘Investigations of Foodborne Illness Outbreaks’, *FDA* [Preprint]. <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/investigations-foodborne-illness-outbreaks> Lekérdezés időpontja: 2023. 09. 01.

Fellows, P.J. (2017): ‘1 - Properties of food and principles of processing’, in P.J. Fellows (ed.) *Food Processing Technology (Fourth Edition)*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing

Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 3–200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100522-4.00001-8>.

Fineran, P.C., Slater, H., Everson, L., Hughes, K. and Salmond, G.P.C. (2005): ‘Biosynthesis of tripyrrole and  $\beta$ -lactam secondary metabolites in *Serratia*: integration of quorum sensing with multiple new regulatory components in the control of prodigiosin and carbapenem antibiotic production’, *Molecular Microbiology*, 56(6), pp. 1495–1517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04660.x>.

Fischer, S.W. and Titgemeyer, F. (2023): ‘Protective Cultures in Food Products: From Science to Market’, *Foods*, 12(7), p. 1541. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods12071541>.

Földes, T., Bánhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L. and Szigeti, J. (2000): ‘Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms’, *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), pp. 840–846. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01184.x>.

Foster, T. (1996): ‘Staphylococcus’, in S. Baron (ed.) *Medical Microbiology*. 4th kiadás. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.

Freimoser, F.M., Rueda-Mejia, M.P., Tilocca, B. and Migheli, Q. (2019): ‘Biocontrol yeasts: mechanisms and applications’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), p. 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>.

Fu, R., Zhou, L., Feng, K., Lu, X., Luo, J. and Tang, F. (2021): ‘Effects of *Serratia marcescens* (SM1) and its interaction with common biocontrol agents on the termite, *Odontotermes formosanus* (Shiraki)’, *Journal of Forestry Research*, 32(3), pp. 1263–1267. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01122-w>.

Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N. and Lucas, R. (2010): ‘Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol’, *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), pp. 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.005>.

García-Anaya, M.C., Sepulveda, D.R., Sáenz-Mendoza, A.I., Rios-Velasco, C., Zamudio-Flores, P.B. and Acosta-Muñiz, C.H. (2020): ‘Phages as biocontrol agents in dairy products’, *Trends in Food Science & Technology*, 95, pp. 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.10.006>.

- Garvey, M. (2022): 'Bacteriophages and Food Production: Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety', *Antibiotics*, 11(10), p. 1324. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101324>.
- George, P. (1947): 'Reaction Between Catalase and Hydrogen Peroxide', *Nature*, 160(4054), pp. 41–43. <https://doi.org/10.1038/160041a0>.
- Gildea, L., Ayariga, J.A. and Robertson, B.K. (2022): 'Bacteriophages as Biocontrol Agents in Livestock Food Production', *Microorganisms*, 10(11), p. 2126. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112126>.
- Giolitti, G. and Bertani, M. (1953): 'A method for the microscopical study of actinomycetes', *Journal of Bacteriology*, 65(3), pp. 281–282. <https://doi.org/10.1128/jb.65.3.281-282.1953>.
- Giraffa, G. (2003): 'Functionality of enterococci in dairy products', *International Journal of Food Microbiology*, 88(2), pp. 215–222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1).
- Gomaa, E.Z. (2012): 'Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol', *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 50(1), pp. 103–111. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1343-y>.
- Gómez Ramírez, M., Rojas Avelizapa, L.I., Rojas Avelizapa, N.G. and Cruz Camarillo, R. (2004): 'Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases', *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), pp. 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.011>.
- Gonthier, A., Guérin-Faubleé, V., Tilly, B. and Delignette-Muller, M.L. (2001): 'Optimal growth temperature of O157 and non-O157 *Escherichia coli* strains', *Letters in Applied Microbiology*, 33(5), pp. 352–356. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.01010.x>.
- Gordee, R.S. and Matthews, T.R. (1969): 'Systemic antifungal activity of pyrrolnitrin', *Applied Microbiology*, 17(5), pp. 690–694. <https://doi.org/10.1128/am.17.5.690-694.1969>.
- Götz, F., Bannerman, T. and Schleifer, K.-H. (2006): 'The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*', in M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds) *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. New York, NY: Springer US, pp. 5–75. [https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3\\_1](https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_1).

Gould, G.W. (ed.) (1995): *New Methods of Food Preservation*. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2105-1>.

Gray, J.A., Chandry, P.S., Kaur, M., Kocharunchitt, C., Bowman, J.P. and Fox, E.M. (2018) ‘Novel Biocontrol Methods for *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Production Facilities’, *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 605. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00605>.

Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M.-F., Bielecka, M.K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O. and Lecuit, M. (2010): ‘Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*’, *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), pp. 136–138. <https://doi.org/10.3201/eid1601.091155>.

Haas, D. and Défago, G. (2005): ‘Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads’, *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), pp. 307–319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>.

Haas, D. and Keel, C. (2003): ‘Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease’, *Annual Review of Phytopathology*, 41, pp. 117–153. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656>.

Haas, D., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., OberhÄnsli, T., Schnider, U., Voisard, C., Wüthrich, B. and Defago, G. (1991): ‘Secondary Metabolites of *Pseudomonas Fluorescens* Strain CHA0 Involved in the Suppression of Root Diseases’, in H. Hennecke and D.P.S. Verma (eds) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Vol. 1: Proceedings of the 5th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Interlaken, Switzerland, September 9–14, 1990*. Dordrecht: Springer Netherlands (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture), pp. 450–456. [https://doi.org/10.1007/978-94-015-7934-6\\_68](https://doi.org/10.1007/978-94-015-7934-6_68).

Hammami, R., Fliss, I. and Corsetti, A. (2019): ‘Editorial: Application of Protective Cultures and Bacteriocins for Food Biopreservation’, *Frontiers in Microbiology*, 10.

Harris, A.K.P., Williamson, N.R., Slater, H., Cox, A., Abbasi, S., Foulds, I., Simonsen, H.T., Leeper, F.J. and Salmond, G.P.C. (2004): ‘The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation’, *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 11), pp. 3547–3560. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27222-0>.

Harvey, R.R., Heiman Marshall, K.E., Burnworth, L., Hamel, M., Tatoryn, J., Cutler, J., Meghnath, K., Wellman, A., Irvin, K., Isaac, L., Chau, K., Locas, A., Kohl, J., Huth, P.A., Nicholas, D., Traphagen, E., Soto, K., Mank, L., Holmes-Talbot, K., Needham, M., Barnes, A., Adcock, B., Honish, L., Chui, L., Taylor, M., Gaulin, C., Bekal, S., Warshawsky, B., Hobbs, L., Tschetter, L.R., Surin, A., Lance, S., Wise, M.E., Williams, I. and Gieraltowski, L. (2017): 'International outbreak of multiple Salmonella serotype infections linked to sprouted chia seed powder - USA and Canada, 2013-2014', *Epidemiology and Infection*, 145(8), pp. 1535–1544. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000504>.

Hernandez, S.M., Keel, K., Sanchez, S., Trees, E., Gerner-Smidt, P., Adams, J.K., Cheng, Y., Ray, A., Martin, G., Presotto, A., Ruder, M.G., Brown, J., Blehert, D.S., Cottrell, W. and Maurer, J.J. (2012): 'Epidemiology of a Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Typhimurium Strain Associated with a Songbird Outbreak', *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), pp. 7290–7298. <https://doi.org/10.1128/AEM.01408-12>.

Hilbert, F., Scherwitzel, M., Paulsen, P. and Szostak, M.P. (2010): 'Survival of Campylobacter jejuni under Conditions of Atmospheric Oxygen Tension with the Support of Pseudomonas spp', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), pp. 5911–5917. <https://doi.org/10.1128/AEM.01532-10>.

Holdbac honlap (2023): <https://www.dupontnutritionandbiosciences.com/products/holdbac.html>, Lekérdezés időpontja: 2023. 01. 13.

Hossain, M.I., Sadekuzzaman, M. and Ha, S.-D. (2017): 'Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review', *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 100(Pt 1), pp. 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.077>.

Hu, D.X., Withall, D.M., Challis, G.L. and Thomson, R.J. (2016): 'Structure, Chemical Synthesis, and Biosynthesis of Prodiginine Natural Products', *Chemical Reviews*, 116(14), pp. 7818–7853. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00024>.

Hugh, R. and Leifson, E. (1953): 'The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria', *Journal of Bacteriology*, 66(1), pp. 24–26. <https://doi.org/10.1128/jb.66.1.24-26.1953>

Hussain, M.A. and Dawson, C.O. (2013): 'Economic Impact of Food Safety Outbreaks on Food Businesses', *Foods*, 2(4), pp. 585–589. <https://doi.org/10.3390/foods2040585>.

- Jajere, S.M. (2019): 'A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance', *Veterinary World*, 12(4), pp. 504–521. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>.
- Janisiewicz, W.J., Conway, W.S. and Leverentz, B. (1999): 'Biological control of postharvest decays of apple can prevent growth of Escherichia coli O157:H7 in apple wounds', *Journal of Food Protection*, 62(12), pp. 1372–1375. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.12.1372>.
- Kazi, M. and Annapure, U.S. (2016): 'Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens', *Journal of Food Science and Technology*, 53(3), pp. 1355–1362. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1996-8>.
- Khanna, A., Khanna, M. and Aggarwal, A. (2013): 'Serratia Marcescens- A Rare Opportunistic Nosocomial Pathogen and Measures to Limit its Spread in Hospitalized Patients', *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 7(2), pp. 243–246. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5010.2737>.
- Knolhoff, A.M., Zheng, J., McFarland, M.A., Luo, Y., Callahan, J.H., Brown, E.W. and Croley, T.R. (2015): 'Identification and Structural Characterization of Naturally-Occurring Broad-Spectrum Cyclic Antibiotics Isolated from Paenibacillus', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(10), pp. 1768–1779. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1190-2>.
- Konishi H., Fujiya M. and Kohgo Y. (2013): 'Traffic Control of Bacteria-Derived Molecules: A New System of Host-Bacterial Crosstalk', *International Journal of Cell Biology*, 2013, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/757148>.
- Kovacs, N. (1956): 'Identification of Pseudomonas pyocyanea by the Oxidase Reaction', *Nature*, 178(4535), pp. 703–703. <https://doi.org/10.1038/178703a0>.
- Kurnianto, M.A., Kusumaningrum, H.D., Lioe, H.N. and Chasanah, E. (2021): 'Partial Purification and Characterization of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances Produced by Streptomyces sp. Isolated from the Gut of Chanos chanos', *BioMed Research International*, 2021, p. 7190152. <https://doi.org/10.1155/2021/7190152>.
- Law, J.W.-F., Ser, H.-L., Khan, T.M., Chuah, L.-H., Pusparajah, P., Chan, K.-G., Goh, B.-H. and Lee, L.-H. (2017): 'The Potential of Streptomyces as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, Magnaporthe oryzae (Pyricularia oryzae)', *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00003>.



- Leisner, J.J., Vogensen, F.K., Kollmann, J., Aided, B., Vandamme, P., Vancanneyt, M. and Ingmer, H. (2008): 'alpha-Chitinase activity among lactic acid bacteria', *Systematic and Applied Microbiology*, 31(2), pp. 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.03.003>.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C.P. and Camp, M.J. (2006): 'Biocontrol of the Food-Borne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Poona on Fresh-Cut Apples with Naturally Occurring Bacterial and Yeast Antagonists', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), pp. 1135–1140. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1135-1140.2006>.
- Li, P., Kwok, A.H.Y., Jiang, J., Ran, T., Xu, D., Wang, W. and Leung, F.C. (2015): 'Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential', *PloS One*, 10(4), p. e0123061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123061>.
- Lianou, A., Panagou, E.Z. and Nychas, G.-J.E. (2016): '1 - Microbiological Spoilage of Foods and Beverages', in P. Subramaniam (ed.) *The Stability and Shelf Life of Food (Second Edition)*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 3–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00001-0>.
- Liao, C.-H. and Sapers, G.M. (1999): 'Influence of Soft Rot Bacteria on Growth of *Listeria monocytogenes* on Potato Tuber Slices†', *Journal of Food Protection*, 62(4), pp. 343–348. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.4.343>.
- Liu, C.-L., Lan, C.-Y., Fu, C.-C. and Juang, R.-S. (2014): 'Production of hexaoligochitin from colloidal chitin using a chitinase from *Aeromonas schubertii*', *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, pp. 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.028>.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J. and Austin, F.W. (2005): 'Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains', *FEMS Microbiology Letters*, 243(2), pp. 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.025>.
- Liu, J.-K. and Jurtshuk, P. (1986): 'N,N,N'-N'-Tetramethyl-~-Phenylenediamine-Dependent Cytochrome Oxidase Analyses of *Bacillus* Species'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38, pp. 38-46. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-1-38>
- López, N.I., Pettinari, M.J., Stackebrandt, E., Tribelli, P.M., Pötter, M., Steinbüchel, A. and Méndez, B.S. (2009): '*Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) producer

isolated from an antarctic environment’, *Current Microbiology*, 59(5), pp. 514–519. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9469-9>.

LPSN Yersinia (2023): <https://lpsn.dsmz.de/genus/yersinia>, Lekérdezés időpontja: 2023. 09. 16.

Maes, S., Heyndrickx, M., Vackier, T., Steenackers, H., Verplaetse, A. and Reu, K.D. (2019): ‘Identification and Spoilage Potential of the Remaining Dominant Microbiota on Food Contact Surfaces after Cleaning and Disinfection in Different Food Industries’, *Journal of Food Protection*, 82(2), pp. 262–275. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-226>.

Maiwald, M. (2004): ‘Broad-range PCR for detection and identification of bacteria’, *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*, pp. 379–390.

Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus) 2-1/1969 számú irányelv A Veszélyelemzés, Kritikus Szabályozási Pontok (HACCP) rendszer és alkalmazásának útmutatója (2003)

Martín, I., Rodríguez, A., Delgado, J. and Córdoba, J.J. (2022): ‘Strategies for Biocontrol of *Listeria monocytogenes* Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites in Ready-to-Eat Meat- and Dairy-Ripened Products’, *Foods*, 11(4), p. 542. <https://doi.org/10.3390/foods11040542>.

Mazhar, S., Hill, C. and McAuliffe, O. (2018): ‘The Genus *Macrococcus*: An Insight Into Its Biology, Evolution, and Relationship With *Staphylococcus*’, *Advances in Applied Microbiology*, 105, pp. 1–50. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.002>.

McIntyre, L., Hudson, J., Billington, C. and Withers, H. (2007): ‘Biocontrol of foodborne bacteria: Past, present and future strategies’, *Food New Zealand*, 7, pp. 25–32.

McIntyre, L., Hudson, J.A., Billington, C. and Withers, H. (2012): ‘Biocontrol of Foodborne Bacteria’, in A. McElhatton and P.J. do Amaral Sobral (eds) *Novel Technologies in Food Science: Their Impact on Products, Consumer Trends and the Environment*. New York, NY: Springer (Integrating Food Science and Engineering Knowledge into the Food Chain), pp. 183–204. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7880-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7880-6_8).

Medeiros, S., Monteiro-Júnior, J., Sales, G., Grangeiro, T. and Nogueira, N. (2018): ‘Chitinases as Antibacterial Proteins: A Systematic Review’, *Journal of Young Pharmacists*, 10, pp. 144–148. <https://doi.org/10.5530/jyp.2018.10.33>.

Medina, M. and Nuñez, M. (2011): '11 - Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in milk and dairy products', in C. Lacroix (ed.) *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 267–296. <https://doi.org/10.1533/9780857090522.3.267>.

Mendoza, I.C., Luna, E.O., Pozo, M.D., Vásquez, M.V., Montoya, D.C., Moran, G.C., Romero, L.G., Yépez, X., Salazar, R., Romero-Peña, M. and León, J.C. (2022): 'Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables', *LWT*, 165, p. 113714. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113714>.

Mesías, F.J., Martín, A. and Hernández, A. (2021): 'Consumers' growing appetite for natural foods: Perceptions towards the use of natural preservatives in fresh fruit', *Food Research International*, 150, p. 110749. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110749>.

Mishra, J. and Arora, N.K. (2018): 'Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture', *Applied Soil Ecology*, 125, pp. 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.004>.

Mogren, L., Windstam, S., Boqvist, S., Vågsholm, I., Söderqvist, K., Rosberg, A.K., Lindén, J., Mulaosmanovic, E., Karlsson, M., Uhlig, E., Håkansson, Å. and Alsanius, B. (2018): 'The Hurdle Approach-A Holistic Concept for Controlling Food Safety Risks Associated With Pathogenic Bacterial Contamination of Leafy Green Vegetables. A Review', *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 1965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01965>.

Mohamed, Z.K., El-Sayed, S.A., Radwan, T. and El-Wahab, G.S.G. (2009): 'Potency evaluation of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agents for root-knot nematodes in Egypt', *Journal of Applied Sciences Research*, 5, pp. 93–102.

Molin, G., Ternström, A. and Ursing, J. (1986): 'Notes: *Pseudomonas lundensis*, a New Bacterial Species Isolated from Meat', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(2), pp. 339–342. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-2-339>.

Móricz, Á.M., Ott, P.G., Häbe, T.T., Darcsi, A., Böszörményi, A., Alberti, Á., Krüzselyi, D., Csontos, P., Béni, S. and Morlock, G.E. (2016): 'Effect-Directed Discovery of Bioactive Compounds Followed by Highly Targeted Characterization, Isolation and Identification, Exemplarily Shown for *Solidago virgaurea*', *Analytical Chemistry*, 88(16), pp. 8202–8209. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02007>.

Murdoch, S.L., Trunk, K., English, G., Fritsch, M.J., Pourkarimi, E. and Coulthurst, S.J. (2011): ‘The Opportunistic Pathogen *Serratia marcescens* Utilizes Type VI Secretion To Target Bacterial Competitors’, *Journal of Bacteriology*, 193(21), pp. 6057–6069. <https://doi.org/10.1128/jb.05671-11>.

Nadai, C., Junior, W.J.F.L., Favaron, F., Giacomini, A. and Corich, V. (2018): ‘Biocontrol activity of *Starmerella bacillaris* yeast against blue mold disease on apple fruit and its effect on cider fermentation’, *PLOS ONE*, 13(9), p. e0204350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204350>.

Nagórska, K., Bikowski, M. and Obuchowski, M. (2007): ‘Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent.’, *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), pp. 495–508. [https://doi.org/10.18388/abp.2007\\_3224](https://doi.org/10.18388/abp.2007_3224).

Nelson, G.E. and Greene, M.H. (2020): ‘Enterobacteriaceae’, in *Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9. Elsevier, pp. 2669–2685.

Okulate, M.A. (2009) ‘Antimicrobial activity of bioactive compounds produced by *Bacillus* species’. Final Report for Microbial Diversity Course. <https://www.coursehero.com/file/93235944/13BolajiFinalReportpdf/> Lekérdezés időpontja: 2023. 09. 03.

Olanya, O.M., Ukuku, D.O. and Niemira, B.A. (2014): ‘Effects of temperatures and storage time on resting populations of *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas fluorescens* in vitro’, *Food Control*, 39, pp. 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.006>.

Oliveira, M., Abadias, M., Colás-Medà, P., Usall, J. and Viñas, I. (2015): ‘Biopreservative methods to control the growth of foodborne pathogens on fresh-cut lettuce’, *International Journal of Food Microbiology*, 214, pp. 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.015>.

Oliveira, M., Ferreira, V., Magalhães, R. and Teixeira, P. (2018): ‘Biocontrol strategies for Mediterranean-style fermented sausages’, *Food Research International*, 103, pp. 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.048>.

Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, I. (1987): ‘Rhizosphere colonization by *Serratia marcescens* for the control of *Sclerotium rolfsii*’, *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6), pp. 747–751. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90058-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90058-7).

Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, I. (1988): ‘The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*’, *Phytopathology*, 78, pp. 84–87.

- Pakbin, B., Brück, W.M. and Rossen, J.W.A. (2021): 'Virulence Factors of Enteric Pathogenic Escherichia coli: A Review', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), p. 9922. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>.
- Parani, K., Shetty, G.P. and Saha, B.K. (2011): 'Isolation of Serratia marcescens SR1 as a Source of Chitinase Having Potentiality of Using as a Biocontrol Agent', *Indian Journal of Microbiology*, 51(3), pp. 247–250. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0065-x>.
- Pascual, J., García-López, M., Bills, G.F. and Genilloud, O. (2015): 'Pseudomonas granadensis sp. nov., a new bacterial species isolated from the Tejada, Almijara and Alhama Natural Park, Granada, Spain', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt 2), pp. 625–632. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.069260-0>.
- van Pée, K.-H. (2012): 'Chapter 2 - Biosynthesis of Halogenated Alkaloids', in H.-J. Knölker (ed.) *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Academic Press, pp. 167–210. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398282-7.00002-3>.
- Peix, A., Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C. and Velázquez, E. (2003): 'Pseudomonas rhizosphaerae sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 6), pp. 2067–2072. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02703-0>.
- Pelyuntha, W., Chaiyasut, C., Kantachote, D. and Sirilun, S. (2019): 'Cell-free supernatants from cultures of lactic acid bacteria isolated from fermented grape as biocontrol against Salmonella Typhi and Salmonella Typhimurium virulence via autoinducer-2 and biofilm interference', *PeerJ*, 7, p. e7555. <https://doi.org/10.7717/peerj.7555>.
- Peterson, J.W. (1996): 'Bacterial Pathogenesis', in S. Baron (ed.) *Medical Microbiology*. 4th edn. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Popa, G.L. and Papa, M.I. (2021): 'Salmonella spp. infection - a continuous threat worldwide', *Germs*, 11(1), pp. 88–96. <https://doi.org/10.18683/germs.2021.1244>.
- Purkayastha, G.D., Mangar, P., Saha, A. and Saha, D. (2018): 'Evaluation of the biocontrol efficacy of a Serratia marcescens strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea', *PLOS ONE*, 13(2), p. e0191761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191761>.
- Ramaiah, N., Hill, R.T., Chun, J., Ravel, J., Matte, M.H., Straube, W.L. and Colwell, R.R. (2000): 'Use of a chiA probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay(1)',

*FEMS microbiology ecology*, 34(1), pp. 63–71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00755.x>.

Ramos, G.L.P.A., Vigoder, H.C. and Nascimento, J.S. (2021): ‘Technological Applications of *Macroccoccus caseolyticus* and its Impact on Food Safety’, *Current Microbiology*, 78(1), pp. 11–16. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02281-z>.

Rodríguez-Sánchez, S., Ramos, I.M., Rodríguez-Pérez, M., Poveda, J.M., Seseña, S. and Palop, M.L. (2022): ‘Lactic acid bacteria as biocontrol agents to reduce *Staphylococcus aureus* growth, enterotoxin production and virulence gene expression’, *LWT*, 170, p. 114025. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114025>.

Roselló, G., Bonaterra, A., Francés, J., Montesinos, L., Badosa, E. and Montesinos, E. (2013): ‘Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*’, *European Journal of Plant Pathology*, 137(3), pp. 621–633. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0275-7>.

Roy, P., Ahmed, N.H. and Grover, R.K. (2014): ‘Non-pigmented strain of *serratia marcescens*: an unusual pathogen causing pulmonary infection in a patient with malignancy’, *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 8(6), pp. DD05-06. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8629.4513>.

Ruzin, S.E. (1999): *Plant Microtechnique and Microscopy*. USA: Oxford University Press.

Saima, K.M. and Roohi, A.I.Z. (2013) ‘Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase’, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(1), pp. 39–46. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.03.001>.

Sancho-Madriz, M.F. (2003): ‘Preservation of Food’, in B. Caballero (ed.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, pp. 4766–4772. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00968-8>.

Sandhya, C., Adapa, L.K., Nampoothiri, K.M., Binod, P., Szakacs, G. and Pandey, A. (2004): ‘Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation’, *Journal of Basic Microbiology*, 44(1), pp. 49–58. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310284>.

Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987): ‘Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores’, *Analytical Biochemistry*, 160(1), pp. 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).

Shelobolina, E.S., Sullivan, S.A., O'Neill, K.R., Nevin, K.P. and Lovley, D.R. (2004): 'Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), pp. 2959–2965. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2959-2965.2004>.

Shimkets, L.J. (2015): 'Development, Prokaryotic: Variety and Versatility☆', in *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02310-2>.

Simoncini, N., Spadola, G. and Battilani, P. (2014): 'Autochthonous yeasts as potential biocontrol agents in dry-cured meat products', *Food Control*, 46, pp. 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.030>.

Singh, S. and Shalini, R. (2016): 'Effect of Hurdle Technology in Food Preservation: A Review', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), pp. 641–649. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761594>.

Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Gardini, F. and Lanciotti, R. (2015): 'Innovative strategies based on the use of bio-control agents to improve the safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables', *Trends in Food Science & Technology*, 46(2, Part B), pp. 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.014>.

Stenberg, J.A., Sundh, I., Becher, P.G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P.A., Friberg, H., Gil, J.F., Jensen, D.F., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehmann, G., Vetukuri, R.R. and Viketoft, M. (2021): 'When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications', *Journal of Pest Science*, 94(3), pp. 665–676. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7>.

Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J.L. and Liu, J. (2016): 'Recent advances and current status of the use of heat treatments in postharvest disease management systems: Is it time to turn up the heat?', *Trends in Food Science & Technology*, 51. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.004>.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. and Kumar, S. (2013): 'MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0', *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp. 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

Tariq, A.L. and Reyaz, A.L. (2015): 'Characterization of an Indigenous *Serratia marcescens* Strain TRL Isolated From Fish Market Soil and Cloning of its *chiA* gene'.

Techer, C., Baron, F. and Jan, S. (2014): 'Spoilage of Animal Products | Microbial Milk Spoilage', in C.A. Batt and M.L. Tortorello (eds) *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, pp. 446–452. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00443-2>.

Thambugala, K.M., Daranagama, D.A., Phillips, A.J.L., Kannangara, S.D. and Promptuttha, I. (2020): 'Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, p. 604923. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>.

Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., Mazurier, S., Lemanceau, P., Wendehenne, D. and Besson-Bard, A. (2016): 'The *Pseudomonas fluorescens* Siderophore Pyoverdine Weakens *Arabidopsis thaliana* Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions', *Plant Physiology*, 171(1), pp. 675–693. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01537>.

Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E. and Montesinos, E. (2008): 'Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria', *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), pp. 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.065>.

Tsukatani, T., Suenaga, H., Higuchi, T., Shiga, M., Noguchi, K. and Matsumoto, K. (2011): 'Distinction of Gram-positive and -negative bacteria using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium salts with a selection medium', *The Journal of General and Applied Microbiology*, 57(6), pp. 331–339. <https://doi.org/10.2323/jgam.57.331>.

Tu, S., Qiu, X., Cao, L., Han, R., Zhang, Y. and Liu, X. (2010): 'Expression and characterization of the chitinases from *Serratia marcescens* GEI strain for the control of *Varroa destructor*, a honey bee parasite', *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(2), pp. 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.02.002>.

Twele, R.P.S., Panno, L.C., Lobo, M.E.C., Contreras, C.S.B., Perez, J.R.F., Rademacher, M.H., Rios, Y.I.N. and Hinojosa, C. del C.V. (2010): 'Surface sanitizer for the food industry based on three new lactic acid bacteria that have antagonistic action against *Listeria monocytogenes*, the microorganism that causes listeriosis in humans'. <https://patents.google.com/patent/US20100239561/en> Lekérdezés időpontja: 2023. 09. 10.



Vaaje-Kolstad, G., Horn, S.J., Sørli, M. and Eijsink, V.G.H. (2013): 'The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*--a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides', *The FEBS journal*, 280(13), pp. 3028–3049. <https://doi.org/10.1111/febs.12181>.

Van Looveren, M., Ison, C.A., Ieven, M., Vandamme, P., Martin, I.M., Vermeulen, K., Renton, A. and Goossens, H. (1999): 'Evaluation of the Discriminatory Power of Typing Methods for *Neisseria gonorrhoeae*', *Journal of Clinical Microbiology*, 37(7), pp. 2183–2188. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.7.2183-2188.1999>.

Vandini, A., Temmerman, R., Frabetti, A., Caselli, E., Antonioli, P., Balboni, P.G., Platano, D., Branchini, A. and Mazzacane, S. (2014): 'Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products', *PloS One*, 9(9), p. e108598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108598>.

Varsha, K.K. and Nampoothiri, K.M. (2016): 'Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures', *Food Control*, 69, pp. 61–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.032>.

Vassart, G., Georges, M., Monsieur, R., Brocas, H., Lequarre, A.S. and Christophe, D. (1987): 'A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA', *Science (New York, N.Y.)*, 235(4789), pp. 683–684. <https://doi.org/10.1126/science.2880398>.

Veliz, E.A., Martínez-Hidalgo, P. and Hirsch, A.M. (2017): 'Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol', *AIMS Microbiology*, 3(3), pp. 689–705. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.689>.

Verma, V., Joshi, K. and Mazumdar, B. (2012): 'Study of Siderophore Formation in Nodule-Forming Bacterial Species', *Research Journal of Chemical Sciences*, 2(11), pp. 26–29.

Vicentini, S.N.C., de Carvalho, G., Krug, L.D., Nunes, T.C., da Silva, A.G., Moreira, S.I., Gonçalves, L.M. de D.P., Silva, T.C. and Ceresini, P.C. (2022) 'Bioprospecting Fluorescent *Pseudomonas* from the Brazilian Amazon for the Biocontrol of Signal Grass Foliar Blight', *Agronomy*, 12(6), p. 1395. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061395>.

Wang, K., Yan, P. and Cao, L. (2014): 'Chitinase from a Novel Strain of *Serratia marcescens* JPP1 for Biocontrol of Aflatoxin: Molecular Characterization and Production Optimization Using Response Surface Methodology', *BioMed Research International*, 2014, p. e482623. <https://doi.org/10.1155/2014/482623>.

Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S. and Regue, M. (1997): 'Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170', *Journal of Bacteriology*, 179(22), pp. 7111–7117. <https://doi.org/10.1128/jb.179.22.7111-7117.1997>.

Weiland-Bräuer, N. (2021): 'Friends or Foes-Microbial Interactions in Nature', *Biology*, 10(6), p. 496. <https://doi.org/10.3390/biology10060496>.

Weller, D.M. (2007): 'Pseudomonas Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years', *Phytopathology*®, 97(2), pp. 250–256. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0250>.

WHO (2018): E.coli. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>, Lekérdezés időpontja: 2022. 12. 17.

WHO (2020): Food safety <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> , Lekérdezés időpontja: 2022. 11. 01

Williamson, N.R., Fineran, P.C., Leeper, F.J. and Salmond, G.P.C. (2006): 'The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines', *Nature Reviews Microbiology*, 4(12), pp. 887–899. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1531>.

Wilson, J.W., Schurr, M.J., LeBlanc, C.L., Ramamurthy, R., Buchanan, K.L. and Nickerson, C.A. (2002): 'Mechanisms of bacterial pathogenicity', *Postgraduate Medical Journal*, 78(918), pp. 216–224. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.918.216>.

Xiong, Z.-J., Zhang, J.-L., Zhang, D.-F., Zhou, Z.-L., Liu, M.-J., Zhu, W.-Y., Zhao, L.-X., Xu, L.-H. and Li, W.-J. (2013): 'Rothia endophytica sp. nov., an actinobacterium isolated from *Dysophylla stellata* (Lour.) Benth', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 11), pp. 3964–3969. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052522-0>.

Yang, H., Cheng, J., Hu, L., Zhu, Y. and Li, J. (2012): 'Mechanisms of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens*', *African Journal of Microbiology Research*, 6(21), pp. 4427–4437. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1545>.

Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J. and Chen, J. (2023): 'Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease', *Frontiers in Microbiology*, 14.

Zagorec, M. and Champomier-Vergès, M.-C. (2017): 'Chapter 6 - Meat Microbiology and Spoilage', in F. Toldra' (ed.) *Lawrie's Meat Science (Eighth Edition)*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 187–203. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100694-8.00006-6>.

Zhao, Y. (2005): '2 - Pathogens in fruit', in W. Jongen (ed.) *Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 44–88. <https://doi.org/10.1533/9781845690243.1.44>.

Zumla, A. (2010): 'Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases', *The Lancet. Infectious Diseases*, 10(5), pp. 303–304. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70089-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70089-X).

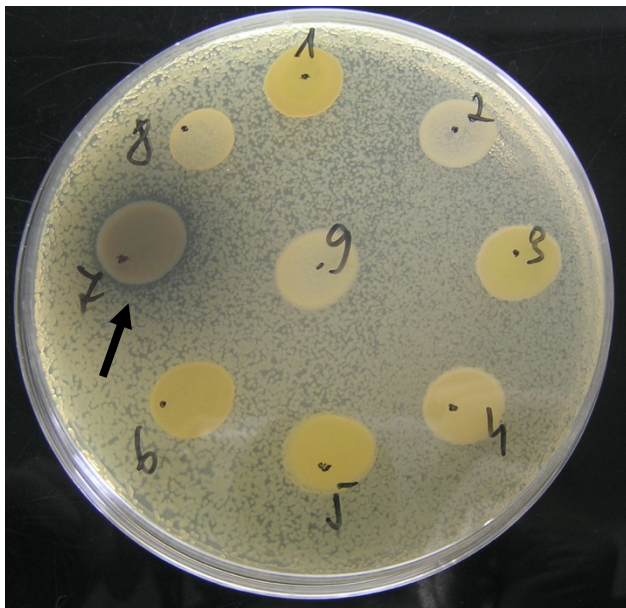
## M2. Az izolált baktériumok morfológiai jellemzése WL Nutrient agaron

Izolálás helye	Izolátum kódja	WL morfológia (486)
Vágóhíd	CP-T-1	fényes kívül fehér közepén zöld ép szélű domború telepek
	CP-T-2	nem nőtt rendszeren
	CP-T-3*	fényes kívül fehér közepén zöld ép szélű domború telepek (CP-T-1)
	CP-T-5	nem nőtt rendszeren (CP-T-2)
	CP-MJ-1	középen zöld kívül sárga fényes ép szélű domború telepek
	CP-MJ-4	középen zöld kívül sárga fényes ép szélű domború telepek (CP-MJ-1)
	CP-MJ-6	sárgászöld fényes apró telepek (CP-P-1)
	CP-MJ-7	középen zöld kívül sárga fényes ép szélű domború telepek (CP-MJ-1)
	CP-P-1	sárgászöld fényes apró telepek
	CP-P-2	fehér fényes ép szélű domború telepek
	CP-P-3	nem nőtt rendszeren
	CP-P-4	gyenge zöldeskék fényes (CP-P-7)
	CP-P-5	sárga-türkiz fényes domború ép szélű telepek
	CP-P-7	gyenge zöldeskék fényes domború
	CP-P-8	gyenge apró fehér fényes telepek
	CP-S-1	szélén fehér közepén zöld domború elfolyt fényes telepek
	CP-S-2	sötétzöld matt apró telepek
	CP-S-3	fényes domború kívül sárga belül zöld ép szélű telepek
	CP-S-4	sárgászöld fényes apró telepek (CP-P-1)
CP-S-8	középen sötétebb zöld enyhén domború fényes telepek	
Zöldségfeldolgozó üzem	T1Z	fényes sötétzöld domború ép szélű telepek
	C2Z	nem nőtt rendszeren
	T5Z	kívül fehér közepén zöld hullámosan szövött felszínű fényes elfolyt telepek
	3/1Z	gyenge fehér domború ép szélű fényes
	6/1Z	sötétzöld fényes domború telepek
	6/2Z	gyenge kék fényes
Tojásfeldolgozó üzem	CE-E-1	gyenge türkiz
	CE-E-2	gyenge méregzöld
	CE-PT-1	gyenge fehér fényes
	CE-PT-2	narancessárga fényes ép szélű telepek
	CE-PT-3	világos kék fényes ép szélű telepek
	CSE-T-1	gyenge fűzöld telepek
	CSE-T-2	gyenge fehér fényes apró telepek
	CSE-T-3	gyenge fehér
	CSE-T-4	kívül fehér közepén zöld hullámosan szövött felszínű fényes telepek
	CSE-T-5	gyenge fehér fényes
	CE-B-1	gyenge világos kék fényes telepek
	CSE-B-1	zöldesbarna fényes domború telepek
	CSE-B-2	sárgászöld fényes telepek sárga zónával
	CSE-B-3	zöld fényes telepek
	CE-EJ-1	fehér fényes domború ép szélű telepek
CE-EJ-2	sárgás kék fényes telepek sárga zónával	

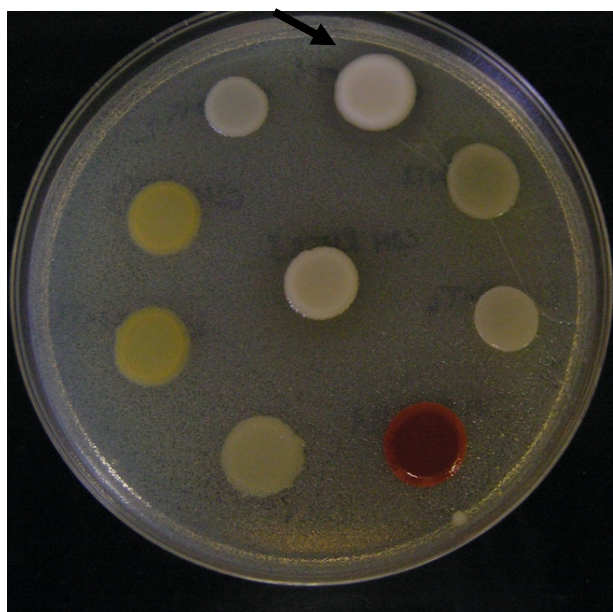
	CE-EJ-3	zölde sárga fényes domború ép szélű telepek
	CE-EJ-4	világoskék fényes domború telepek
Tejüzem	CM-CT-1	fűzöld viaszosfényű lapos telepek
	CM-CT-2	türkiz apró fényes ép szélű domború
	CM-MTT-1	zöldefehér elfolyt fényes épszélű (CSM-RMT-2)
	CM-MTT-2	fehér fényes csipkés szélű enyhén domború
	CM-SMT-1	gyenge zöld fényes
	CM-ST-1	nem nőtt (CSM-PMT-4)
	CM-ST-2	sárgászöld sárga zónával
	CM-RMTT-1	kívül fehér közepén zöld nyálkás fényes domború
	CM-RMTT-2	fehér enyhén domború csipkés szélű fényes
	CM-RMTT-3	barnászöld fényes domború ép szélű
	CSM-BCT-1	gyenge zöld fényes
	CSM-BCT-2	fehér fényes domború
	CSM-BCT-3	fehér fényes domború (CSM-BCT-2)
	CSM-BCT-4	gyenge zöld
	CSM-BCT-5	nem nőtt (CSM-RMT-3)
	CSM-RMT-1	fehér türkiz fényes épszélű feltisztulási zónával
	CSM-RMT-2	kívül fehér belül türkiz fényes ép szélű domború
	CSM-RMT-3	nem nőtt
	CSM-RMT-4	gyenge fehér
	CSM-PMTII-1	sárgászöld gyenge fényes
	CSM-PMT-1	sötétzöld fényes ép szélű (CSM-PM-1)
	CSM-PMT-2	fűzöld fényes telepek sárga zónával
	CSM-PMT-3	türkiz apró fényes épszélű domború (CM-CT-2)
	CSM-PMT-4	nem nőtt
	CSM-PMT-5	kívül sárga belül zöld fényes ép szélű sárga zónával
	CSM-PMT-6	zöld fényes ép szélű
	CSM-PM-1	sötétzöld fényes ép szélű
	CSM-PM-2	gyenge fehér
	CSM-PM-3	nem nőtt
	CSM-PM-4	gyenge zöldekkék fényes
	CSM-RMTII-1	fehér türkiz domború ép szélű zónával
	CSM-RMTII-2	sárga apró fényes ép szélű
CSM-RMTII-3	sárga apró fényes ép szélű (CSM-RMTII-2)	
CSM-RMTII-4	türkiz kívül fehér domború ép szélű	

\*A szürke betűvel írt kódok kerültek kizárásra, a morfológia leírásánál zárójelben látható melyik izolátummal egyezett meg.

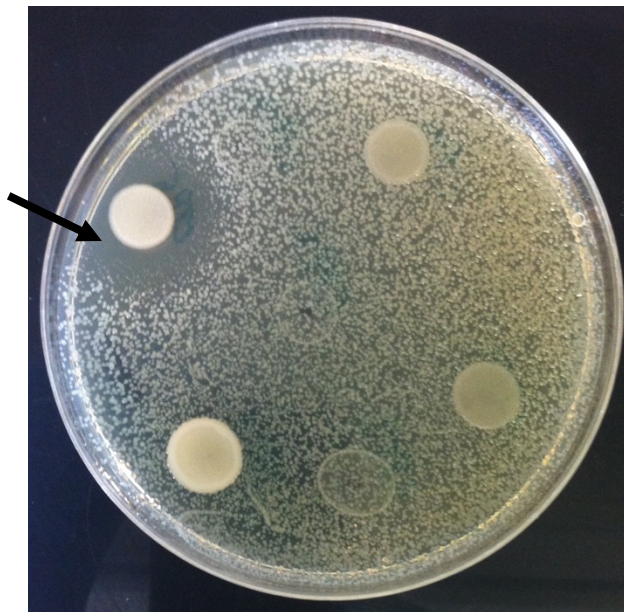
**M3. Példák gátló hatás esetén megjelenő feltisztulási zónákra az agarlemezek felületén**



*P. azotoformans* CM-CT-2 feltisztulási zónája *E. coli*-val szemben végzett gátló hatás vizsgálat során 15 °C-on 6 napos tenyésztést követően



*S. marcescens* CSM-RMT-1 feltisztulási zónája *L. monocytogenes*-szel szemben végzett gátló hatás vizsgálat során 20 °C-on 1 napos tenyésztést követően



Feltisztulási zóna a *P. lundensis* CP-P-5 jelű izolátum körül *S. Harford*dal együtt tenyésztve 20 °C-on 1 napos tenyésztést követően



Feltisztulási zóna a CSM-RMT-1 (fehér színű makrokolónia) és CSM-RMT-II-1 jelű (piros színű makrokolónia) *S. marcescens* izolátumok körül *Y. enterocolitica*-val együtt tenyésztve 25 °C-on 6 napos tenyésztést követően

**M4. Fiziológiai tesztek eredményei az inkubációs idő végén a 20 vizsgált antagonista baktérium esetében**

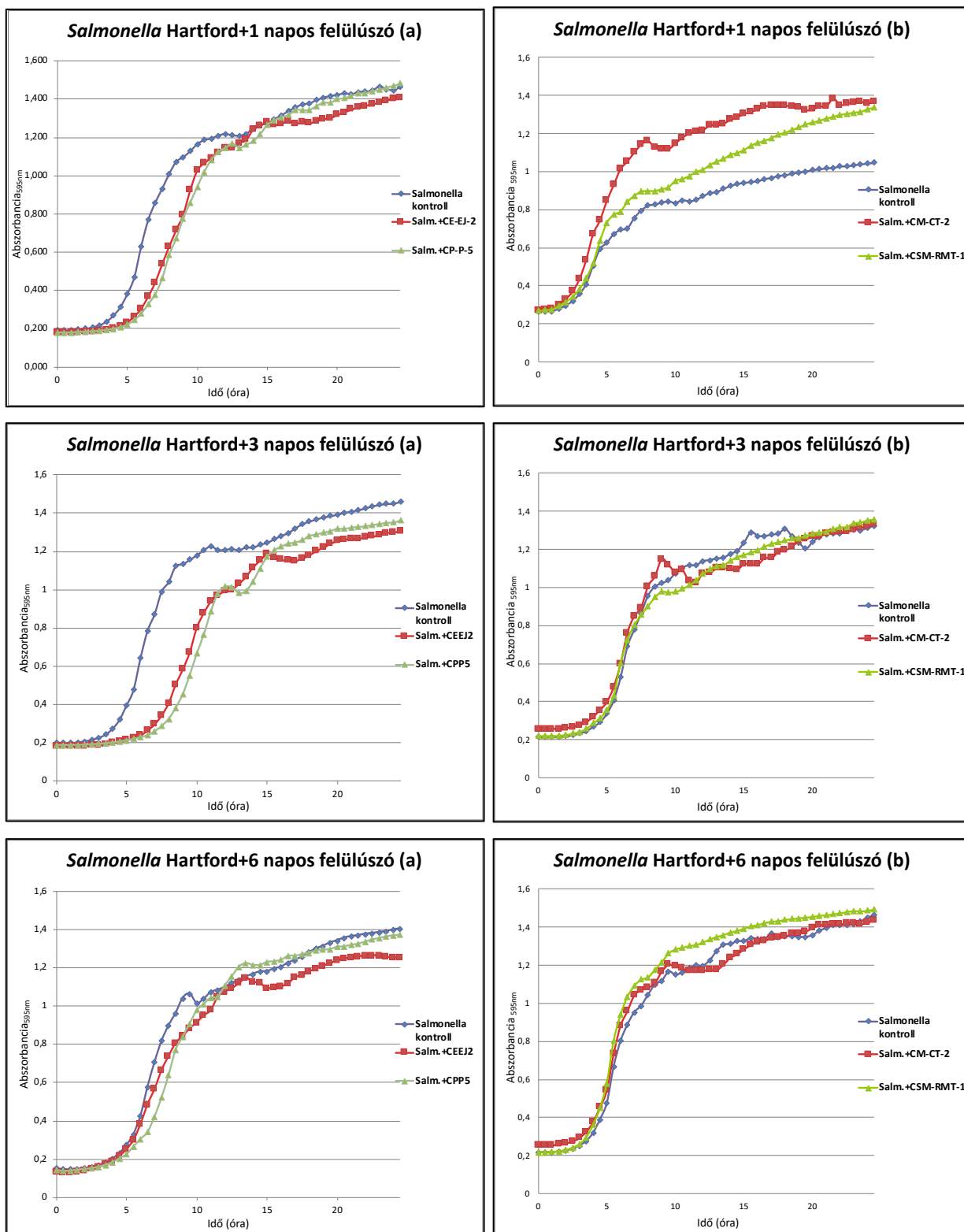
Forrás	Kód	pH							hőmérséklet (°C)							
		3	4	5	6	7	8	9	5	10	15	20	25	30	37	42
Zöldség	6/2 Z	+	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	C2Z	+	+++	+++	+++	+++	++	++	+	++	+++	+++	+++	+++	++	++
Hús	CP-P-2	+	+++	+++	+++	+++	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+	-
	CP-P-5	+	+	+	++	+++	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	-	-
	CP-P-8	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	++	+++	+++	++	+
	CP-S-8	+	+	+	+	+++	+++	+	+	+	++	++	+++	+++	-	-
Tojás	CSE-B-2	+	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+
	CE-B-1	+	+	++	+	+++	+	++	+	+	++	++	+++	+++	+	+
	CE-PT-1	+	+	+	++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+	+
	CE-EJ-2	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	+
	CE-EJ-3	+	+++	+++	+++	+++	+	+	++	++	++	++	++	+++	+	+
	CE-EJ-4	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+	++	++	++	++	+++	+	+
	CSE-T-1	+	+	+	+	+++	+++	+++	+	++	+	+	+++	++	+++	+
	CSE-T-3	+	+	+	+	+++	++	++	+	+	++	++	+++	++	+++	++
	CSE-T-4	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+	++	++	+++	++	+++	+++
CE-E-1	+	+	+	+	+	++	++	++	+	++	++	+++	++	+++	++	
Tej	CM-CT-2	+	++	++	++	+++	+++	+	+	++	++	+++	+++	+++	+	-
	CM-SMT-1	-	-	++	++	++	+++	++	-	+	++	+++	+++	+++	+	+
	CSM-RMT-1	+	++	++	++	+++	++	++	+	++	++	+++	+++	+++	+	+
	CSM-RMTII-1	+	+	+	+	+++	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+	+

-: nincs növekedés, +: gyenge növekedés, ++: közepes növekedés, +++: erős növekedés

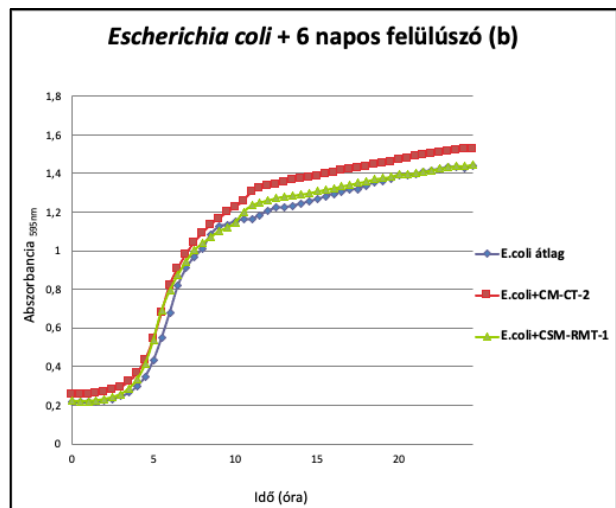
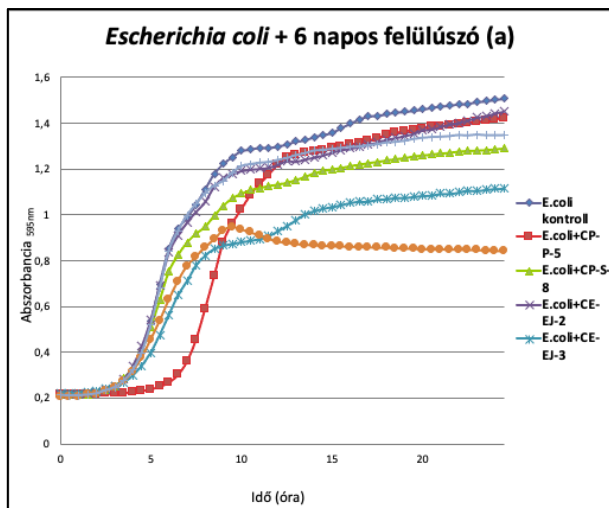
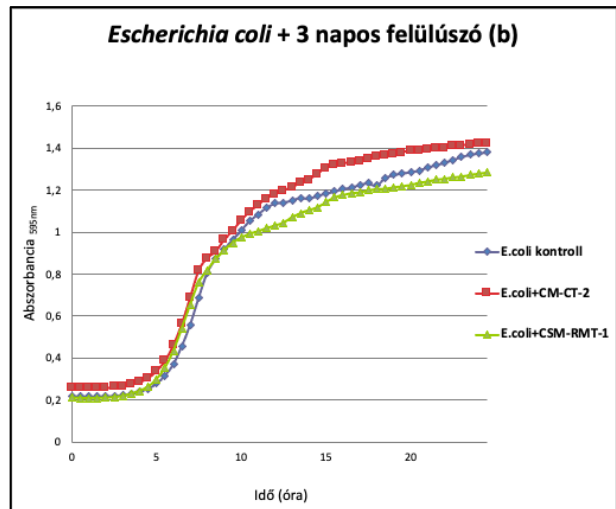
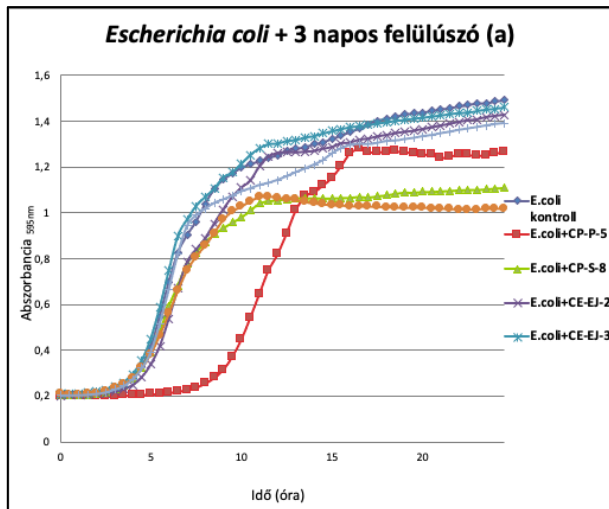
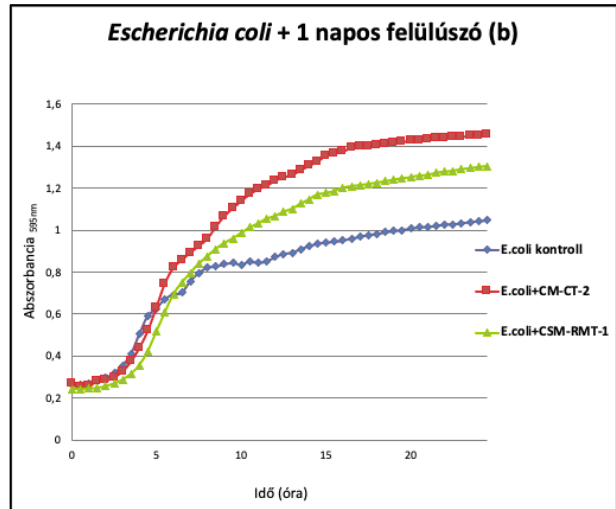
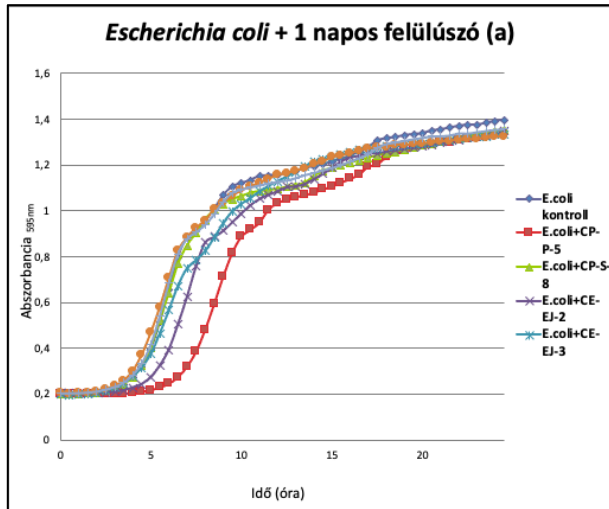


**M5. Sejtmentes felülúszók gátló hatásának vizsgálata során kapott növekedési görbék *S. Hartford* (I.), *E. coli* (II.), *L. monocytogenes* (III.) és *Y. enterocolitica* (IV.) szaporodását vizsgálva. Az első (a) és második (b) körben gyűjtött izolátumok külön mérésekkel, külön kontrollokkal készültek**

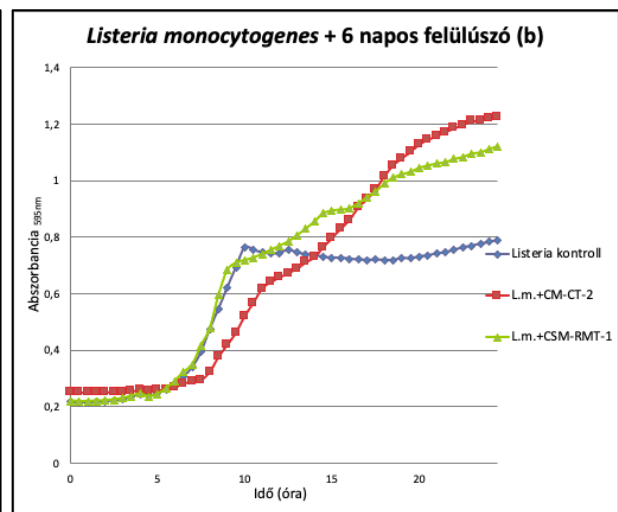
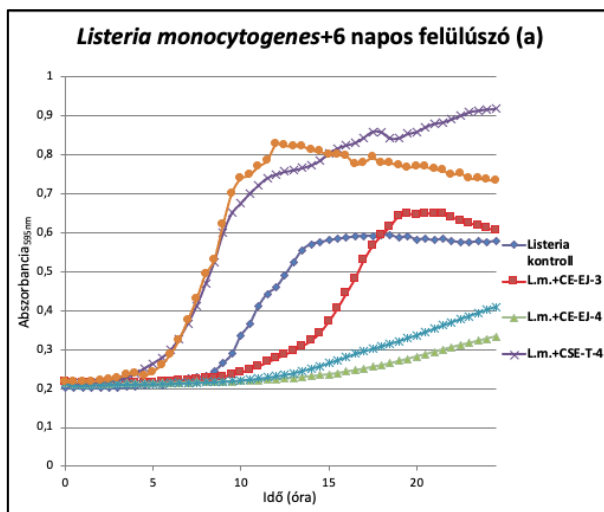
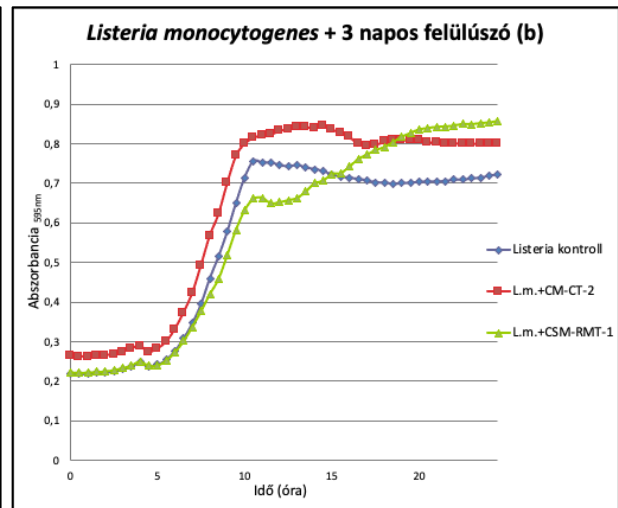
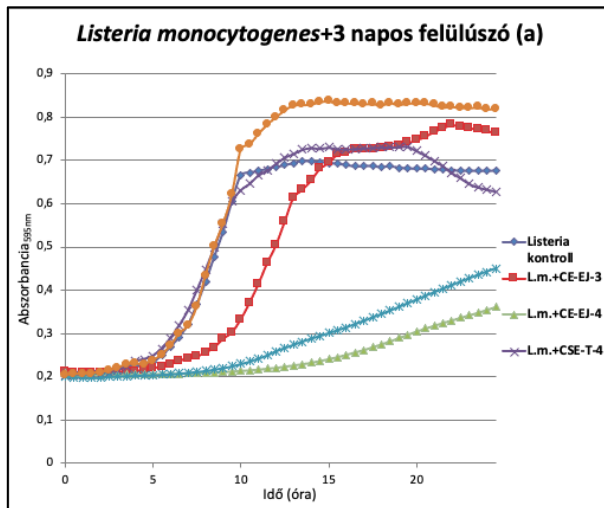
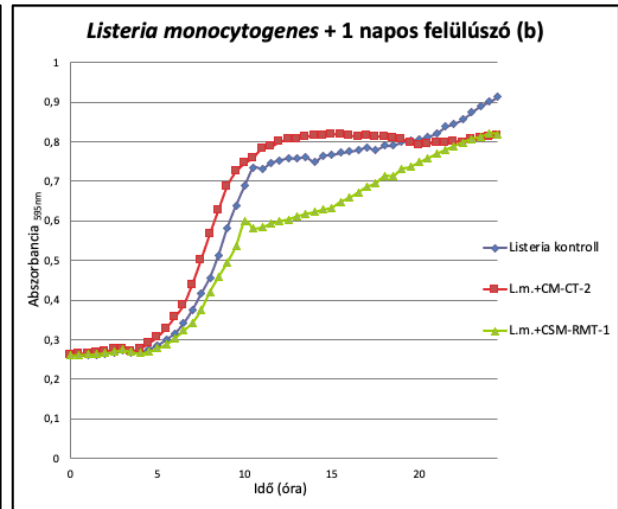
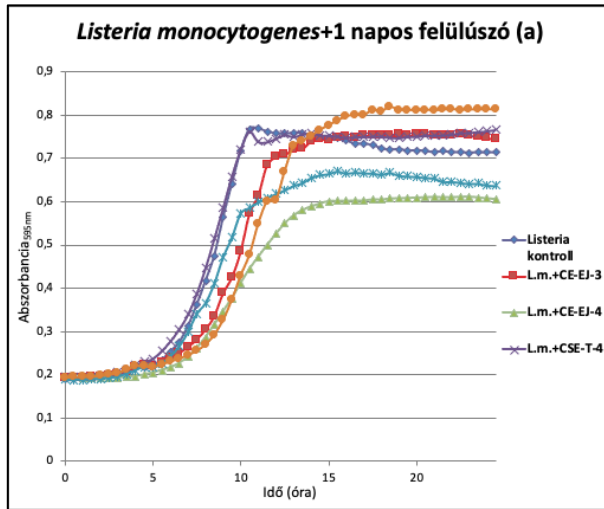
**I. *Salmonella Hartford***



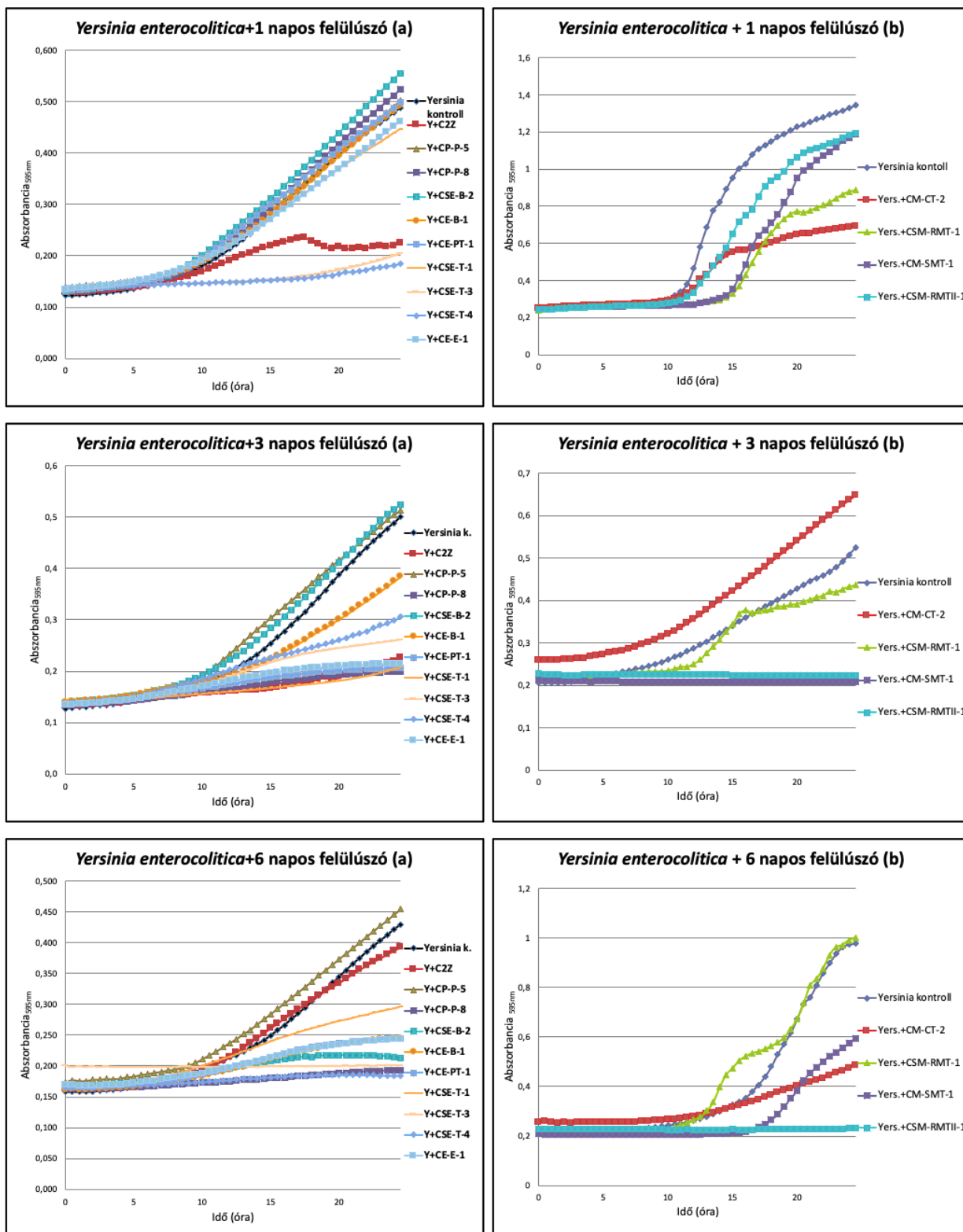
## II. *Escherichia coli*



### III. *Listeria monocytogenes*



#### IV. *Yersinia enterocolitica*

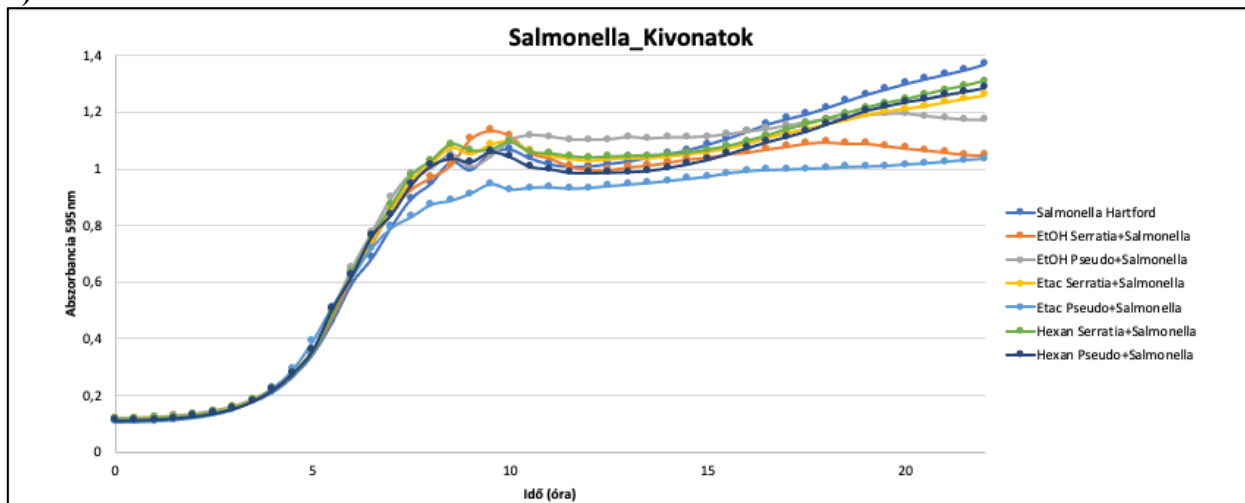


**M6. Gátló hatással rendelkező izolátumok proteáz aktivitás vizsgálata során mért feltisztulási zónák mm-ben 24, 48 és 120 órás inkubálást követően**

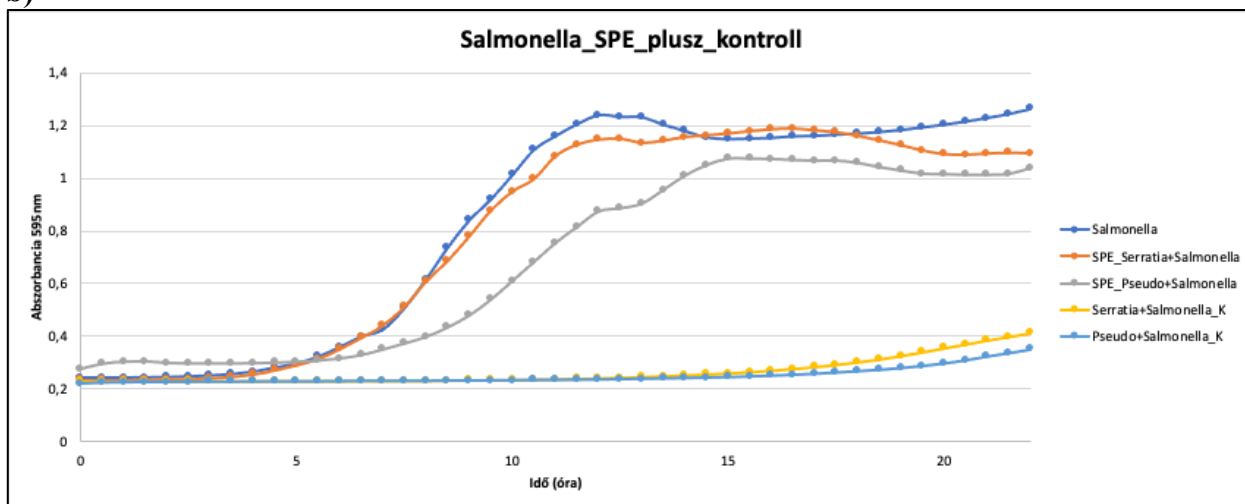
Forrás	Kód	24 óra			48 óra			120 óra		
		20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
Zöldség	6/2 Z	2	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	6,5	3	15
	C2Z	2,5	5	5	6,5	9,5	8	14,5	11,5	15
Hús	CP-P-2	2,5	4	3,5	6	7,5	6,5	11	10	11
	CP-P-5	3,33	4	1,83	6,17	7,33	6	17,67	15,17	10
	CP-P-8	0	0	0	0	0,5	0	2	1,5	5
	CP-S-8	2	4	3,5	6	7	7	11,5	12,5	12,5
	CSE-B-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tojás	CE-B-1	0	1	1	0,5	1	1	1	6,5	4
	CE-PT-1	0	1	1,5	1	1,5	0	2	0	0
	CE-EI-2	2,17	2,17	0,5	2,67	2,67	1,67	4,33	4,33	3,33
	CE-EI-3	0	0	0	2	0,5	0	6	1	0
	CE-EI-4	3	4	4,5	6	8	8	14	14	14
	CSE-T-1	0	0	2,5	1,5	4,5	4,5	5	10	6,5
	CSE-T-3	0	0	0,5	0	0	0,5	0	0	2
	CSE-T-4	0	1	2	0	4	5,5	4	9	15
Tej	CM-CT-2	3,33	4	3,83	6	7	6,17	11,67	12	11,67
	CM-SMT-1	0,5	3	4,5	4,5	7,5	9,5	12	16	9,5
	CSM-RMT-1	4,33	4	5,67	5,83	6,33	9,33	14,67	16,33	16,33
	CSM-RMTII-1	4	3,5	3,83	7,5	8,83	9,67	15,17	16	16,5

M7. *Ps. lundensis* (CP-P-5) és *S. marcescens* (CSM-RMT-1) ásványi és minimál tápelesben készített felülúszóinak frakcióiból (a), SPE-ből (b) és SPE vizes fázisából (c) mért gátló hatása *S. Hartford* (I), *E. coli* (II), *L. monocytogenes* (III) és *Y. enterocolitica* (IV) ellen

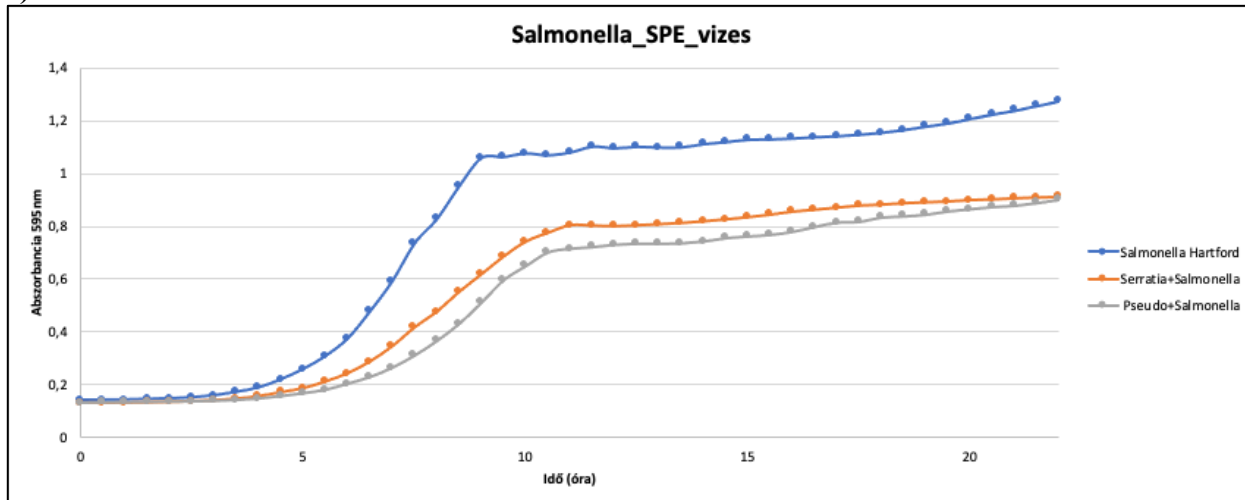
I.  
a)



b)

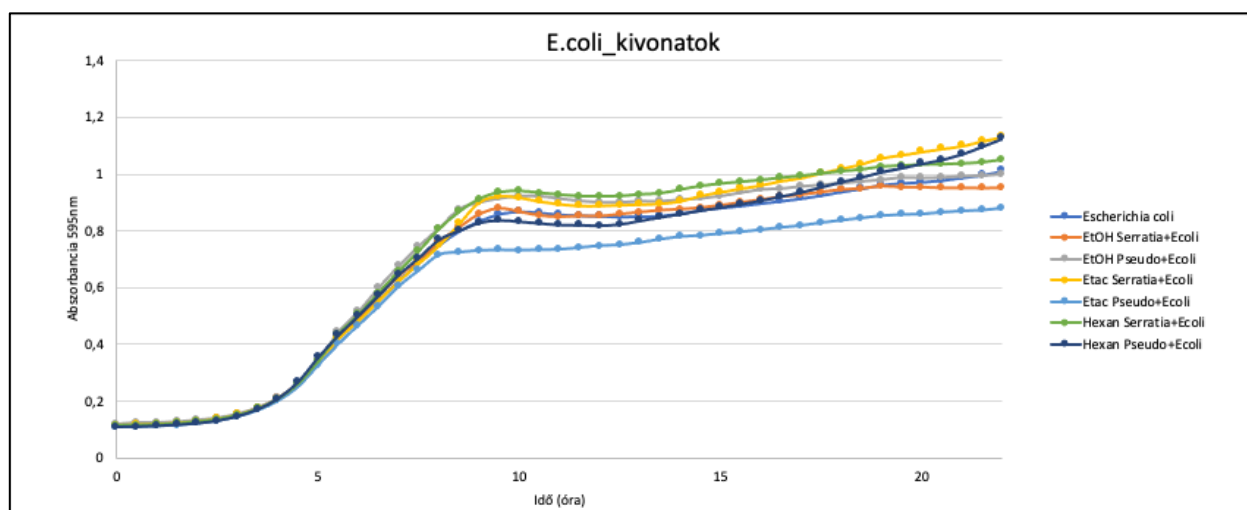


c)

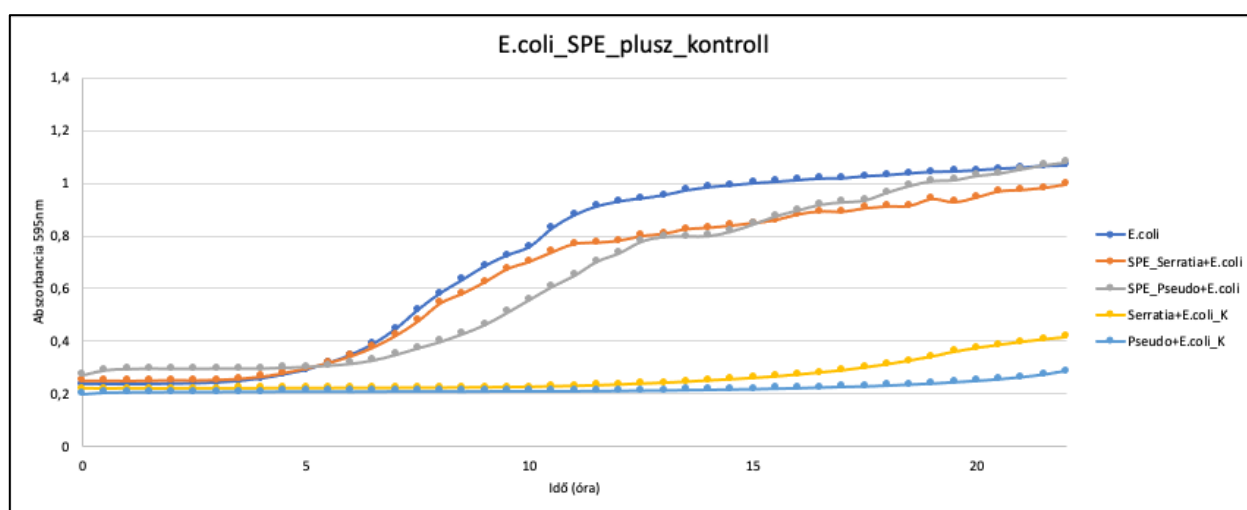


## II.

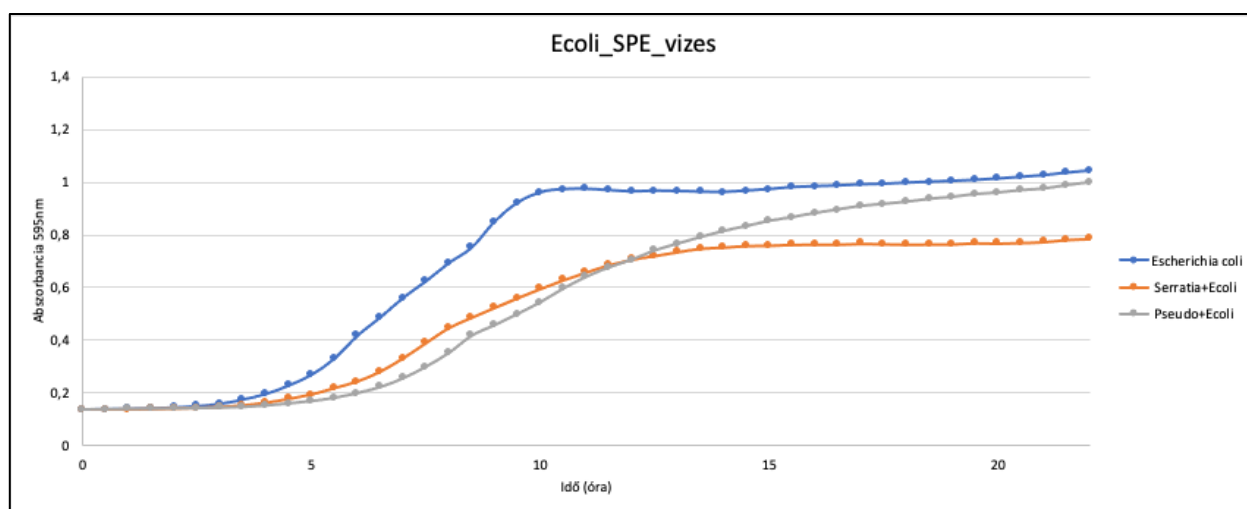
a)



b)

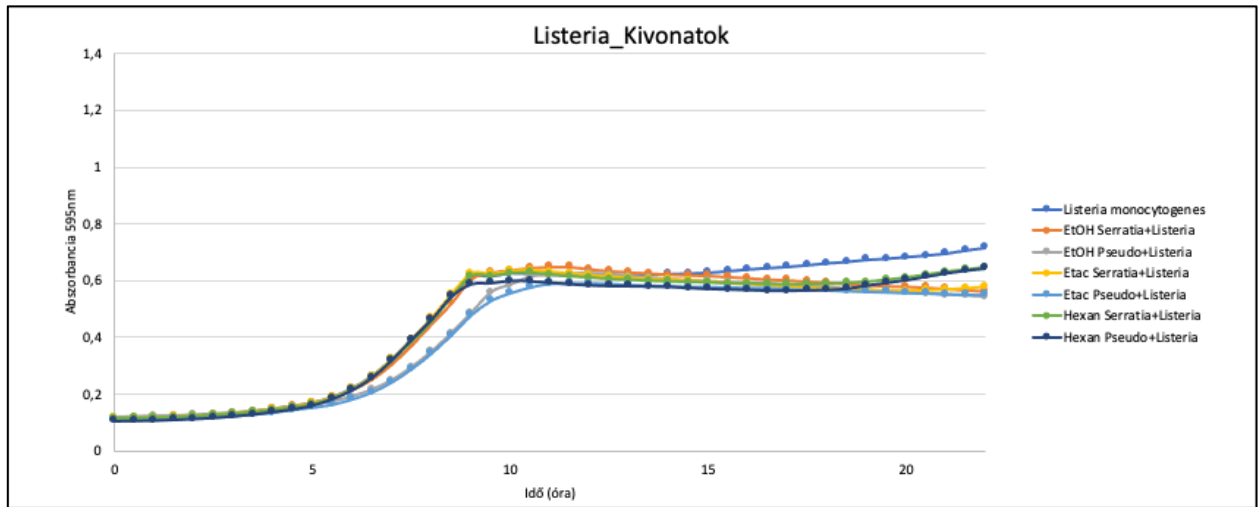


c)

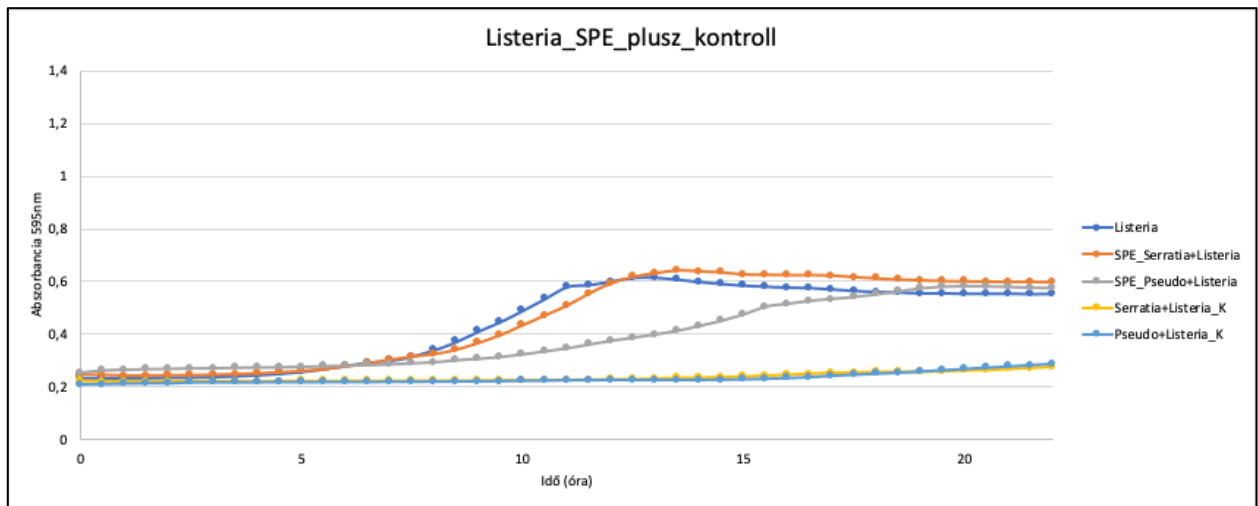


### III.

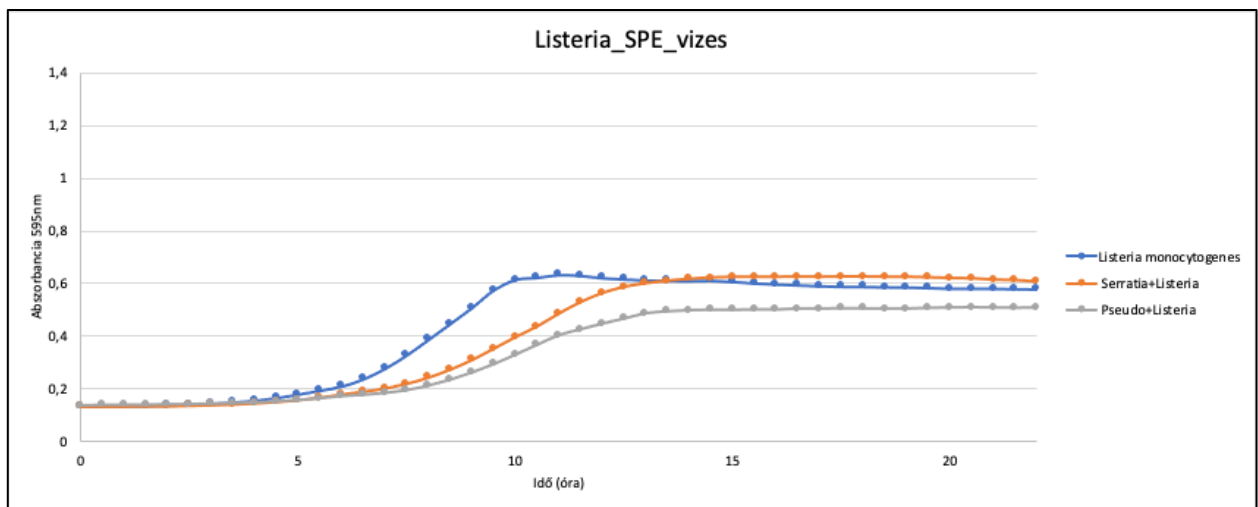
a)



b)



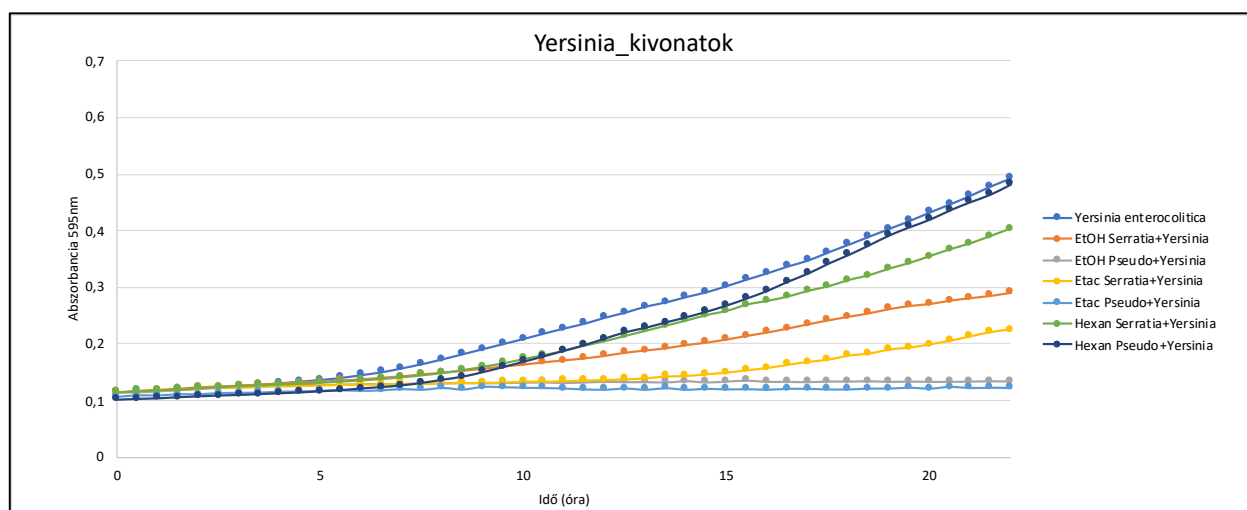
c)



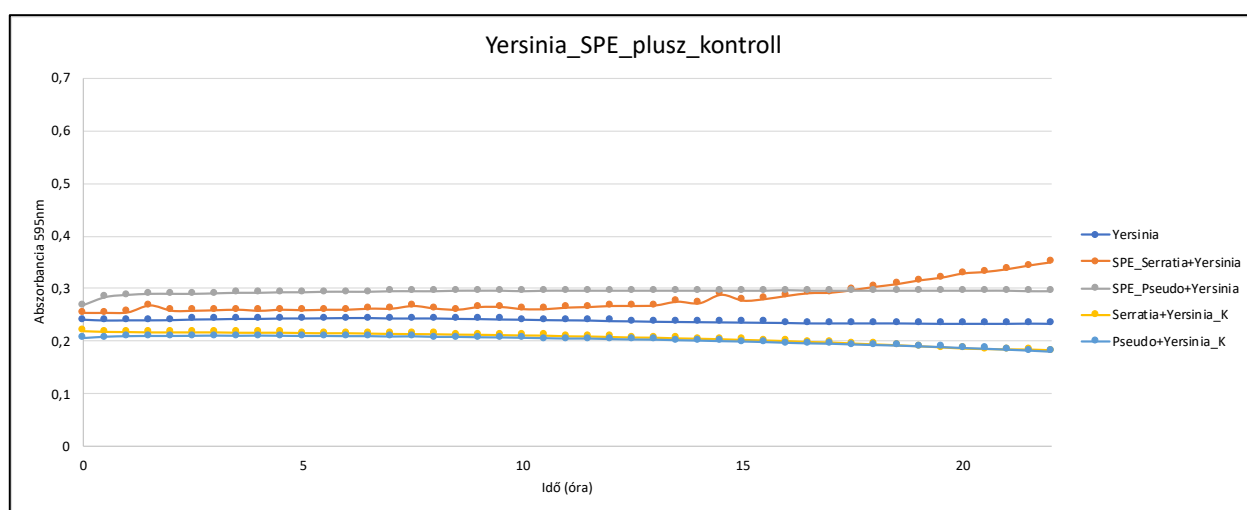


#### IV.

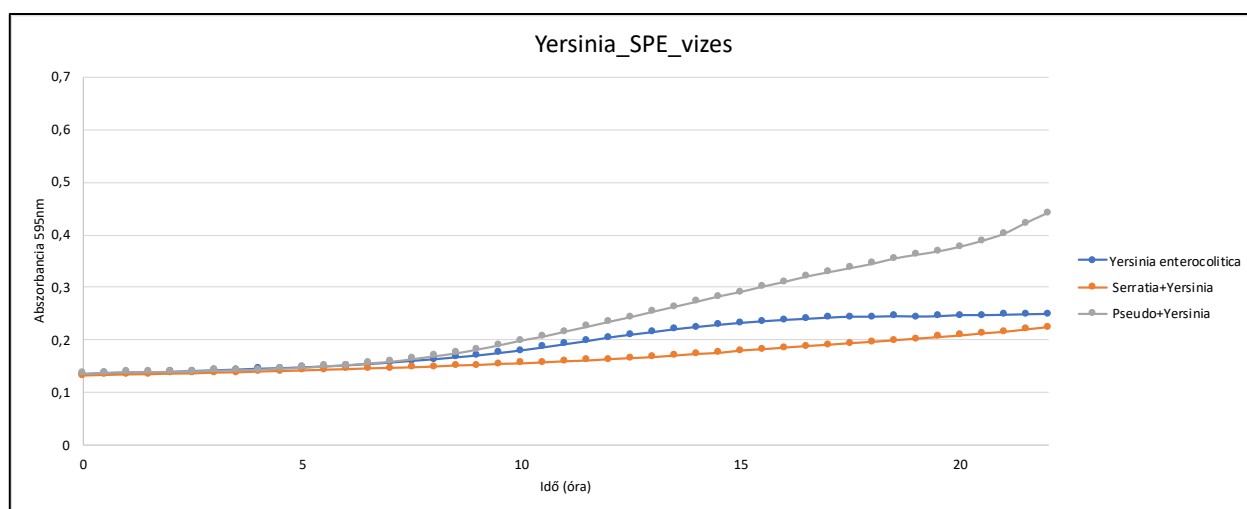
a)



b)



c)



## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr Belák Ágnesnek azt a sok segítséget, amit kaptam a doktori munkám során.

Hálás vagyok az egész Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék összes dolgozójának, hogy munkám során mindenki kedvesen és segítőkészen fordult hozzám bármilyen kérdésem és kérésem során.

Köszönöm a Családomnak a segítséget és támogatást, köszönöm Férjemnek és Gyermekeinek Bendegúznak, Samunak és Ardónak a türelmet és kitartást, amivel lehetővé tették a dolgozat megírását.