

# **DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

Baráti-Deák Bernadett

Budapest

2023



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, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet  
Táplálkozástudományi Tanszék

**Témavezető(k):** **Dr. Belák Ágnes**  
egyetemi docens, PhD  
MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet  
Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## 1. A munka előzményei, célkitűzések

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

Az élelmiszerek előállítása során törekedni kell a megfelelő minőségű, biztonságos termékek létrehozására. Az élelmiszerbiztonsági tényezők mellett a fogyasztói igények is meghatározók, amelyek visszahatnak az iparra. Ennek eredményeként az elmúlt évtizedben egyre több olyan termék jelent meg a boltok polcain, amelyek ezt az irányt is igyekeznek kielégíteni.

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

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 alkalmazhatóságuknak megalapozása a gátló hatásmechanizmusuk minél pontosabb meghatározásával.

Céljaim elérésének érdekében munkám során az alábbi lépéseket valósítottam meg:

- baktériumok izolálása élelmiszerfeldolgozó környezetből és élelmiszer nyersanyagokból;
- 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 gyorstesztékkel és molekuláris biológiai vizsgálatokkal, valamint a törzsek tipizálása DNS-alapú eljárással;
- a gátlás hátterében álló mechanizmusok felderítése: proteáz aktivitás vizsgálattal; sziderofór termelés teszteléssel; prodigiosin termelés vizsgálattal; kitináz termelés teszteléssel;
- a legerősebb gátló hatást mutató törzsek további analízise:
  - a sejtmentes felülúszók vizsgálatával különböző kezelések mellett,
  - együtt tenyésztéses vizsgálatokkal;
- a gátló hatás vizsgálata élelmiszer eredetű *Salmonella enterica* ellen;
- a gátló hatás kimutatásához egyéb módszerekkel történtő vizsgálatok elvégzése:
  - celofános vizsgálattal;
  - liofolizálással koncentrált felülúszó hatásának meghatározásával;
- a gátló komponens(ek) vizsgálata kromatográfias módszerek segítségével.

## 2. Anyag és módszer

### 2.1 A munka során felhasznált patogén baktériumok

A vizsgálataimhoz a következő patogén baktériumokat használtam fel: *Listeria monocytogenes* (CCM 4699), *Salmonella* Hartford (NCAIM B1310), *Yersinia enterocolitica* (HNCMB 98002), *Escherichia coli* (NCAIM B01909).

### 2.2 Baktériumok izolálása és fenntartása

A felületi minták, amelyekből a munka során vizsgált baktériumok izolálása történt, két különböző módszerrel kerültek levételre. A sima, egyenes felületek esetében TSA-t tartalmazó Contact slide-okat alkalmaztam, míg a nehezen hozzáférhető, nem egyenletes felületekhez mintavevő tampont (TSB levesben) használtam.

A mintákat az alábbi helyekről gyűjtöttem:

- vágóhíd,
- tojásfeldolgozó üzem,
- tejüzem,
- zöldségfeldolgozó üzem.

A levett mintákat 25 °C-on 24 órán át inkubáltam, majd a TSB levesből tovább oltottam TSA-ra. A különböző morfológiával rendelkező baktériumokból tiszta tenyészeteket készítettem, amelyek steril paraffinolajjal lezárt TSA ferde agarokon, 4 °C-on kerültek tárolásra.

Az izolált baktériumok csoportosítása és az azonos morfológiával rendelkezők kiszűrése céljából elvégeztem az izolátumok WL agaron történő tenyésztését is. A hasonló morfológiájú telepek csoportosítását követően végül minden csoportokból egy-egy izolátumot választottam ki a további vizsgálatok céljából.

### 2.3 Kontakt inhibíció vizsgálata agar spot módszerrel

A gátló hatással rendelkező izolátumok kiszűréséhez agar spot módszert használtam. A 2.1. pontban ismertetett patogén baktériumok egy napos tenyészetéből steril vízben szuszpenziókat készítettem, majd 1 ml-nyi (kb.  $10^4$ - $10^5$  CFU/ml) szuszpenziókat TSA lemezekre pipettáztam, egyenletesen eloszlattam, majd a felesleget eltávolítottam. A lemezek felületét kiszárítottam, majd az izolátumokból készített sejtszuszpenziókból 10 µl-t (körülbelül  $10^6$  sejtet) az

agarlemezek felületére pipettáztam. A leoltott lemezeket 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 és 42 °C-on inkubáltam 6 napig, a gátláshoz szükséges optimális hőmérséklet és a gátlóhatás kifejtéséhez szükséges idő meghatározása miatt. A gátlást a vizsgált izolátumok makrokolóniái körül a patogének feltisztulási zónái jelezték. 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.

Elvégeztem a kontakt inhibíció vizsgálatot különböző pH értékű (pH 4, 5, 6, 7, 8, 9) táptalajokon is. A lemezeket 20 °C és 30 °C-on inkubáltam 24 órán keresztül. Ebbe a vizsgálatba csak az előzetes tesztelés, azaz a „screening” során gátló hatást mutató izolátumok kerültek bevonásra.

#### **2.4 Biokémiai és fiziológiai tesztek**

A fiziológiai paraméterek közül a hőmérséklet (5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 és 42 °C) és pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, és 9) hatását vizsgáltam az izolátumok szaporodására nézve, míg a biokémiai vizsgálatok közül KOH tesztet, valamint kataláz és oxidáz tesztet végeztem el.

#### **2.5 Molekuláris tipizálás RAPD-PCR módszerrel**

A gátló hatású izolátumok klonális hasonlóságának vizsgálatához molekuláris tipizálást végeztem RAPD-PCR módszerrel az OPE 18 (Belák, 2009), az M13 (Vassart et al., 1987) és a D8635 (Van Looveren et al., 1999) primereket felhasználva. 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.

#### **2.6 Antagonista hatású izolátumok azonosítása**

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

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 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.

## **2.7 Gátló hatás vizsgálata együtt tenyésztési módszerrel táplevesben és tejben**

A kontakt inhibíciós vizsgálatok során két, *Salmonella Hartford*-dal szemben gátló hatást mutató törzset, a *Pseudomonas lundensis* CP-P-5-öt és a *Serratia marcescens* CSM-RMT-1-et vizsgáltam ugyanezen *Salmonella*-val, illetve egy tojásléből izolált *S. enterica* törzsszel való együtt tenyésztéssel TSB levesben a következő patogén:gátló mikroorganizmus koncentráció arányokkal: 1:1, 1:10, 1:100 és 1:1000. A legkisebb koncentráció  $10^1$  sejt/ml-t jelentett. A tenyészeteket 6 napon keresztül inkubáltam 25 °C-on statikus körülmények között. Az első, második, harmadik és hatodik napon kioltást végeztem a tenyészetekből TSA és a patogénnek megfelelő szelektív Harlequin tápagar (Lab M Limited) felületére szélesztéssel két párhuzamos leoltással.

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

## **2.8 Sejtmentes felülúszó gátló hatásának vizsgálata**

A sejtmentes felülúszó gátló hatásának vizsgálatával az extracelluláris gátló metabolitok termelését vizsgáltam mikrotenyészetek segítségével. A screening során gátló hatást mutató törzsek TSB levesben tenyésztett kultúráiból előállított egy-, három- és hatnapos sejtmentes felülúszók gátló hatását Multiskan Ascent készülékkel vizsgáltam, mikrotiter lemezes tenyésztési módszerrel. 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.



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

A vizsgálatot elvégeztem két, a *Salmonella* Hartfordot gátló törzzsel (*Ps. lundensis* CP-P-5 és *Ps. lundensis* CE-EJ-2) annak érdekében, hogy meghatározzam a megváltozott tenyésztési körülmények hatását az antagonista vegyület(ek) termelődésére. A tenyésztés az alábbiak szerint történt: statikus és rázatott (180 rpm, 25 °C) inkubálási körülmények között TSB leves mellett TGE táplevesben. Az így tenyésztett sejtek esetében is megvizsgáltam a kinyert sejtmentes felülúszók gátló hatását.

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

Statikus körülmények között 24 órán át TSB levesben inkubált *P. lundensis* CP-P-5 törzsből nyert sejtmentes felülúszóinál az alábbiakban felsorolt kezeléseket alkalmaztam, majd vizsgáltam a kezelt felülúszók hatását *Salmonella* Hartford szaporodására az előzőekben ismertetett módon: proteáz kezelés 37 °C-on 90 percig (proteínáz 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 és 30 perces forralással, valamint 121 °C -on 15 percig tartó autoklávozással, kb 1,2 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 törzs esetében a liofilizált felülúszókkal is elvégzésre kerültek.

### 2.8.3 Liofilizálással koncentrált sejtmentes felülúszó vizsgálata

A kiválasztott gátló hatású törzsek 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.

## 2.9 Celofános vizsgálat

A vizsgálat Giolitti és Bertani (1953) által leírtak alapján történt, kisebb módosításokkal. Steril, kb. 4 cm átmérőjű celofánkorongokat helyeztem TSA lemezekre, majd 10 µl-t az antagonista izolátum vizes szuszpenziójából (kb. 10<sup>6</sup> sejt) a celofán közepére cseppenttem. 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.

A gátló komponens meghatározására tett kísérletként meghatároztam a gátló komponens tartalmazó agar darabok extraktumainak UV spektrumát is. A celofános tenyésztési módszerrel készült 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.

## **2.10 Antibiotikum rezisztencia vizsgálat**

A gátló hatású törzsek antibiotikum-érzékenységének meghatározásához a Bagul és Sivakumar (2016) által leírt kvalitatív korongdiffúziós érzékenységi vizsgálati módszert alkalmaztam kloramfenikol, ceftadizim, imipenem, eritromicin, nalidixinsav, meropenem, norfloxacin, kolisztin-szulfát, ciprofloxacim, piperacillin és amikacin antibiotikumok esetén. Az inkubálást a vizsgált törzsek hőmérsékleti optimumán, azaz 25 °C -on végeztem el, az eredményeket pedig 24 óra után olvastam le.

## **2.11 A gátló komponens meghatározásához elvégzett vizsgálatok**

### **2.11.1 Proteáz aktivitás vizsgálata**

A gátló hatású törzsek proteolitikus aktivitását tejporos TGE agar segítségével vizsgáltam. Az törzsekből 0,5 McFarland standardnak megfelelő sűrűségű sejtszuszpenziót (10 µl) pipettáztam a tejporos TGE lemezek felületére, amelyeket ezt követően 20, 25 és 30 °C-on inkubáltam. A megjelenő feltisztulási zónákat egy-, két- és ötnapos inkubáció után olvastam le.

### **2.11.2 Sziderofór termelés vizsgálata**

A sziderofór-termelődést Schwyn és Neilands (1987) módszere alapján, Verma és mtsai. (2012) által leírtak szerint vizsgáltam CAS agarlemezeket használva az alapközeg módosításával. A CAS-lemezek elkészítéséhez az elkészített Kings B agarhoz kevertem a külön elkészített CAS festéket. A CAS-agarlemezeket ezt követően oltottam le, majd 25 °C-on 24 órán át inkubáltam. A leolvasás során a kék CAS-agon 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.

### 2.11.3 Kitináz termelés vizsgálata

#### 2.11.3.1 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) cseppenttem, majd háromnapos, 30 °C-on történő inkubációt követően váltak értékelhetővé a feltisztulási zónák kitináz aktivitás megléte esetén.

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

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

### 2.11.4 Prodigiozin termelés vizsgálata

#### 2.11.4.1 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 extrakció EtOH-val szobahőmérsékleten 24 órán át történt, majd centrifugálást követően 37%-os sósavat vagy ammóniát 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).

#### 2.11.4.2 Prodigiozin termelésért felelős gének PCR analízise

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

### 2.11.5 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.

## 2.12 Kromatográfias vizsgálatok

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

### 2.12.1 HPTLC vizsgálat

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

### 2.12.2 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. Ezek alapján a következő tápközegekben tenyésztettem a baktériumokat: a *S. marcescens* CSM-RMT-1 törzset minimál táplevesben, a *Ps. lundensis* CP-P-5 törzset Ásványi 0 (folyékony ásványi tápközeg), Ásványi 1 (folyékony ásványi tápközeg fruktóz szénforrással) és Ásványi 2 (módosított ásványi tápközeg) közegekben.

A különböző eljárásokkal kapott frakciók gátló hatását újból megvizsgáltam mikrokultúrás módszerrel, így láthatóvá vált, melyik frakcióban maradhettek jelen a gátló komponensek.

### 2.12.3 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.

A következő vizsgálathoz a felülúszók frakcionálása egy C18 SPE oszlopon (500 mg Merck Lichrolut) történt.

A harmadik vizsgálathoz a felülúszók liofilizátuma egymás után egyre polárisabb oldószerrel volt kivonva, a maradék pedig vízben lett feloldva, így készültek a különböző frakciók, amelyek gátló hatását megvizsgálhattam.

### 3 Eredmények és azok megbeszélése

#### 3.1 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 telep morfológia vizsgálata után mind a TSA, mind a WL táp agarok felületén hasonló morfológiát mutató izolátumokból csak egy lett kiválasztva a további vizsgálatokhoz, így végül 64 baktériumot teszteltem le gátlóhatás szempontjából: 13-at a sertés vágóhídról, 6-ot a zöldségfeldolgozó üzemből, 18 izolátumot a tojás feldolgozó üzemből, és 27-et a tejfeldolgozó üzemből.

A munka során kiválasztott izolálási helyek mindegyikén nagy számú és különböző morfológiájú baktérium volt 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, azonban még így is nagyszámú, eltérő telep morfológiájú baktérium jellemezte ezen mintavételi helyeket is.

#### 3.2 Az élelmiszer eredetű patogén baktériumok szaporodását gátló izolátumok szelektálása

Az élelmiszer alapanyagokból és a feldolgozó környezetükből gyűjtött izolátumok antagonista hatását agar spot módszerrel vizsgáltam *L. monocytogenes*, *Salmonella* Hartford, *Y. enterocolitica* és *E. coli* ellen. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a vizsgált 64 izolátumból 20 volt képes gátolni a vizsgált kórokozók legalább egyikét. 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 patogén növekedésére volt negatív hatással, 13 pedig csak az egyik kórokozót tudta gátolni valamelyik vizsgált hőmérsékleten a hatnapos inkubáció alatt.

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.

### **3.3 A gátló hatással rendelkező izolátumok jellemzése és azonosítása**

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

Összegezve megállapítható, hogy az izolátumok neutrofil és mezofil sajátosságúak: optimális pH-értékük 7 körüli, míg optimális növekedési hőmérsékletük 25 °C közelében van.

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.

A molekuláris tipizálás eredményei alapján elmondható, hogy a legjobban értékelhető mintázatok a D8635 primerrel sikerült elérni. 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.

A törzsek azonosítása miniatűr identifikációs tesztekkel és a 16S rRNS-t kódoló 16S rDNS-gének szekvencia elemzésével történt. A két módszer szignifikánsan eltérő eredményeket adott (1. táblázat).

**1. 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>Satph. 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%)

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 gátlóhatással rendelkező baktériumok hét különböző nemzetséghez tartoztak: *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Macrococcus*, *Staphylococcus* és *Rothia*. *Pseudomonas* strains have been previously described and studied as potential biocontrol bacteria, but such studies of bacteria belonging to the other genera are only sparsely described in the literature.



### 3.4 Együtt tenyésztési vizsgálatok

Az együtt tenyésztési vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a tesztelt antagonista törzsek képesek voltak a *Salmonella* sejtek szaporodását mérsékelni, jelentős számcsökkenés 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.

### 3.5 Sejtmentes felülúszók gátló hatásának vizsgálata

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 detektálni. A spot módszer és a sejtmentes felülúszók 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 folyadéktenyésztésben - ahol az extracelluláris metabolitok hatását vizsgáltam - csak 2, 4, 3 és 13 izolátum volt negatív hatással a patogének szaporodási képességére.

A megváltoztatott tenyésztési körülmények nem segítették a gátló komponens termelődését, ezért a továbbiakban is statikus körülmények között TSB levesben tenyésztett baktériumokat használtam a vizsgálatokhoz.

A gátló hatások megfigyelésére irányuló vizsgálatok alapján négy törzs került kiválasztásra a további kísérletek elvégzéséhez. Ezeknek volt a kontakt inhibíciós tesztek és a felülúszós vizsgálatok során is 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.

### 3.6 Koncentrált sejtmentes felülúszók gátló hatásának vizsgálata

A sejtmentes felülúszók gátlóhatás vizsgálatának eredményei alapján valószínűsíthető volt, hogy a gátló komponensek folyékony tápközegben nem tudnak megfelelően koncentrálni, így liofilizálással próbáltam töményebb felülúszókat létrehozni. A liofilizálással koncentrált felülúszók hatásának eredményei 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 gátlóhatásokért, valamint, hogy leghatékonyabbnak az egy- és a háromnapos tenyészetek felülúszói bizonyultak, kivéve a CM-CT-2 jelű *Ps. azotoformans* törzsnél, ugyanis ott az egynapos felülúszó gátló hatása csak a 24 órás tenyésztési idő első felében volt nagyobb, mint a három és hatnapos tenyészetekből készült felülúszóknak, majd később megközelítette a kontroll patogének szaporodási görbéit, vagy akár túl is nőtt rajtuk.

### 3.7 Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

A vizsgálatot azért végeztem el, mert bár a gátló hatással bíró sejtmentes felülúszók nem tartalmazzák a baktérium sejteket, de előfordulhat, hogy a sejtszuszpenzióban lizált sejtek is megtalálhatók, amelyek genetikai anyaga a szűrletbe kerülhet, és ezek az 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.

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 alegységére 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.

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.

### **3.8 A kiválasztott antagonista törzsek gátló hatásának vizsgálata tojásporból izolált *Salmonella enterica* törzsek ellen**

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 tapasztaltak. Mind a négy újonnan izolált szalmonellát (S1, S2, S3, S4) legalább részben gátolta a négy antagonista törzs 15 °C és 20 °C esetén, és nem volt nagy különbség a *Salmonella* törzsekre gyakorolt gátló hatások között. A gátlási zónák 24 óra elteltével jelentek meg, és a hatnapos inkubáció végére a kórokozók nem tudtak túlszaporodni az antagonistákon.

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.

### **3.9 Celofános módszerrel meghatározott gátlóhatás eredményei**

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

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. 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 ezenfelül 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 gátlóhatás eléréséhez.

### **3.10 A gátlóhatású komponens jellemzése és meghatározása érdekében végzett vizsgálatok eredményei**

#### 3.10.1 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.

#### 3.10.2 Proteáz aktivitás vizsgálatának eredményei

A *Ps. rhizosphaerae* CSE-B-2 törzs kivételével mindegyik antagonista baktérium rendelkezett valamilyen mértékű proteáz aktivitással, és az inkubációs idő előrehaladtával a feltisztulási zónák 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. A növekvő proteolitikus aktivitással párhuzamosan növekvő gátló hatásra is számítani lehetne a törzsek esetében, a kontakt inhibíciós vizsgálatok során megfigyelt eredmények azonban nem erre utaltak, 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.

#### 3.10.3 Gátló hatás vizsgálata különböző pH értékek mellett

Az eredmények 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 törzs azonban képes volt teljesen meggátolni a szaporodását.

Az eredmények alapján akár a gát-technológia egyik elemeként a biokontroll vegyületként alkalmazható anyagcseretermékeknek még szélesebb felhasználási köre lehetséges, mint kéméletes tartósító eljárás.

### 3.10.4 A sejtmentes felülúszók gátló hatása különböző kezelések után

A kezelések változatos hatásait a *Ps. lundensis* CP-P-5 és a *S. marcescens* CSM-RMT-1 esetében a 2. táblázat tartalmazza összefoglalva.

**2. 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	(+)	+		-
α-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	(+)	(+)	-	-
α-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 vizsgált törzsek felülúszóinál nem volt egyértelműen megállapítható, hogy hőérzékeny komponens, vagy fehérje eredetű összetevő játszik-e szerepet a gátló hatás kialakulásában. Az eredmények alapján több anyag felelős a gátlásért, ami patogénekként is különbözhet.

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

Az egyik legjobb gátló hatással rendelkező izolátum 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 tesztelésekor is.

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

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

A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó izolátumok közül a legjelentősebb 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 *Sa. 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 felülúszók enzimes és hőkezeléses eredményei, valamint a kromatográfiás frakcionálást követő gátló hatás vizsgálat eredményei is utaltak.

#### 3.10.7 Kromatográfiás vizsgálatok és frakciók eredményei

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 patogénekkal szemben, itt valószínűbb, hogy a metanolos extrakcióból készült fázisban maradt a gátló komponens.

#### 4. Következtetések és javaslatok

Az élelmiszerek és azok feldolgozó környezete számos olyan mikroorganizmust tartalmaz, amelyek negatív hatással lehetnek a humán megbetegedést okozó patogén mikrobákra. Érdeemes tehát az élelmiszerek környezetében természetesen előforduló mikroorganizmusokat is megvizsgálni, mert belőlük akár később biokontrollként (például felület fertőtlenítéshez, Twele 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 felülűszók tesztelése során megfigyelhető erőteljesebb gátló hatás az egynapos tenyészetekből nyert felülűszók 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 felülűszós 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 sejtmentes felülúszója felhasználható lehet különböző patogén baktériumok antagonistájaként az élelmiszeriparban, akár biofertőtlenítőszer formájában az élelmiszer-feldolgozó 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 agarlemezek felületén. A felülúszós vizsgálatok eredményei alapján ennél a törzsnél több komponens is felelős lehet a gátló hatásért. A különböző kezelések során 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.

## 5. Új tudományos eredmények

1. Első alkalommal kerültek izolálásra és leírásra élelmiszerekkel terjedő patogének ellen potenciális biokontroll törzsként alkalmazható *Macrocooccus* és *Rothia* nemzetségből származó baktériumok, amelyek a *Macrocooccus 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 sziderofórok és proteázok is. Eredményeim alapján a CP-P-5 jelű *P. lundensis* koncentrált sejtmentes felülűszója 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 metabolit(ok), amely(ek) 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 felülűszója felhasználható lehet különböző patogén baktériumok ellen az élelmiszeriparban.

## Hivatkozások

Bagul, U. és Sivakumar, S. (2016) ‘Antibiotic susceptibility testing: a review on current practices’, *International Journal of Pharmacy* 6(3):11-17.

Belák Á. (2009) *Élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktériumok kimutatása, PCR-alapú molekuláris azonosítása és tipizálása*. Doktori értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem. <https://phd.lib.uni-corvinus.hu/386/> Lekérdezés időpontja: 2023. 09. 02.

Belák, Á. és Maráz, A. (2015): Antagonistic Effect of *Pseudomonas* sp. CMI-1 on Foodborne Pathogenic *Listeria monocytogenes*, *Food Technology and Biotechnology*, 53(2), pp. 223–230.

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

Lekérdezés időpontja: 2023. 09. 03.

Giolitti, G. és Bertani, M. (1953) ‘A method for the microscopical study of actinomycetes’, *Journal of Bacteriology*, 65(3), pp. 281–282

Harris, A.K.P. *et al.* (2004): The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation’, *Microbiology (Reading, England)*, 150(11), pp. 3547–3560.

Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*)’, *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 3.

Leisner, J.J. *et al.* (2008) ‘alpha-Chitinase activity among lactic acid bacteria’, *Systematic and Applied Microbiology*, 31(2), pp. 151–156.

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

Móricz, Á.M. *et al.* (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.

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.

Oliveira, M. *et al.* (2015): Biopreservative methods to control the growth of foodborne pathogens on fresh-cut lettuce, *International Journal of Food Microbiology*, 214, pp. 4–11.

Ramaiah, N. *et al.* (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.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013): ‘MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0’, *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp. 2725–2729.

Twele, R.P.S. *et al.* (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.).

Van Looveren, M. *et al.* (1999) ‘Evaluation of the Discriminatory Power of Typing Methods for *Neisseria gonorrhoeae*’, *Journal of Clinical Microbiology*, 37(7), pp. 2183–2188.

Vassart, G. *et al.* (1987) ‘A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA’, *Science (New York, N.Y.)*, 235(4789), pp. 683–684.

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.

Weller, D.M. (2007): *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years, *Phytopathology*, 97(2), pp. 250–256.

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

## 6. Publikációk

### Impaktfaktorral rendelkező folyóiratcikkek

**Baráti-Deák, B.,** Da Costa A., Giseli C.a, Perjéssy, J., Klupács, A., Zalán, Zs., Mohácsi-Farkas, Cs., Belák, Á., (2023) Inhibition of Foodborne Pathogenic Bacteria by Excreted Metabolites of *Serratia marcescens* Strains Isolated from a Dairy-Producing Environment. *Microorganisms* 11(2): 403. IF: 4,926

**Baráti-Deák B.,** Mohácsi-Farkas Cs., Belák Á. (2020) Searching for Antagonistic Activity of Bacterial Isolates Derived from Food Processing Environments on Some Food-borne Pathogenic Bacteria. *Acta Alimentaria* 49: 415–423. IF: 0,458

**Baráti-Deák B.,** Belák Á., Mohácsi-Farkas Cs. (2020) Characterisation of *Pseudomonas lundensis* CP-P-5 as a potential antagonist of food-borne pathogenic bacteria. *Acta Alimentaria* 50(2): 219-227. IF: 0,458

### Konferencia kiadványok

**Deák, B.,** Belák, Á. (2015) Antagonistic effect of microorganisms isolated from food processing environment on food-borne pathogenic bacteria (17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 8-10 July 2015, Budapest; *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62(Supplement): 143.)

**Deák, B.,** Belák, Á. (2015) Effect of bacterial isolates from food producing environment on food-borne pathogenic bacteria (focusing on *Salmonella* Hartford) (Food Science Conference 2015 – Integration of science in food chain, 18-19 November 2015, Budapest, Hungary; In: Engelhardt T., Dalmadi I., Baranyai L., Mohácsi-Farkas Cs. (eds.): Book of proceedings. pp. 56-60, ISBN:978-963-503-603-5)

**Deák, B.,** Belák, Á. (2016) Tejipari eredetű baktériumok antagonista hatásának vizsgálata élelmiszerbiztonsági szempontból (Tavaszi szél konferencia – Doktoranduszok Országos

Szövetsége, 2016. április 15-17., Budapest; Keresztes Gábor (szerk.): Tavaszi szél 2016 Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia Absztraktkötet, 4.o., ISBN 978-615-5586-04-0)

**Deák, B.** (2016) Biokontroll és élelmiszerbiztonság (XLVIII. Konzervipari Napok, 2016. május 2-3.)

**Deák, B.,** Belák, Á. (2016) Effect of bacterial isolates from food producing environment on food-borne pathogenic bacteria (4th International ISEKI\_Food Conference, 6-8 July 2016, Vienna, Austria; Book of abstracts p. 251)

**Deák, B.,** Belák, Á. (2017) Effect of food related bacterial isolates on some food-borne pathogenic bacteria (5<sup>th</sup> Central European Forum for Microbiology, 18-20 October 2017, Keszthely; Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 64 (Supplement) p. 119. ISSN 1217-8950)

**Deák, B.,** Erdős, Z., Belák, Á. (2017) Élelmiszerből és annak feldolgozó környezetéből izolált *Pseudomonas* törzsek antagonista hatásának vizsgálata (Tavaszi szél konferencia – Doktoranduszok Országos Szövetsége, 2017. március 31- április 2., Miskolc; Dr Keresztes Gábor, Kohus Zsolt, Szabó P. Katalin, Tokody Dániel (szerk.): Tavaszi szél 2017 Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia Absztraktkötet 5.o. ISBN 978-615-5586-14-9)

**Deák, B.,** Somogyi, G., Belák, Á. (2017) Élelmiszerfeldolgozó környezetéből izolált baktériumok antagonista hatása *Yersinia enterocolitica* ellen (Hungalimentaria 2017, Budapest, Absztraktkönyv, 62.o.)